Centro de Ciências Agrárias
Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Desenvolvimento de ingrediente simbiótico por fermentação de soro de leite e do subproduto da agroindústria de suco de laranja por grãos de Kefir e cultura probiótica

Eduardo Vinicius Baptista

Londrina - PR
2010

Centro de Ciências Agrárias
Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

Desenvolvimento de ingrediente simbiótico por fermentação de soro de leite e do subproduto da agroindústria de suco de laranja por grãos de Kefir e cultura probiótica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Aluno: Eduardo Vinicius Baptista
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina - PR
2010

EDUARDO VINICIUS BAPTISTA

DESENVOLVIMENTO DE INGREDIENTE SIMBIÓTICO POR FERMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE E DO SUBPRODUTO DA AGROINDÚSTRIA DE SUCO DE LARANJA POR GRÃOS DE KEFIR E CULTURA PROBIÓTICA

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Sandra Garcia (orientadora)
Universidade Estadual de Londrina

_____

Prof.Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez
DCTA/CCA/UEL

_____

Prof.Dr. Cláudio Takeo Ueno
UTFPR/Londrina

Londrina, 27 de agosto de 2010.

À minha mãe, Maria Aparecida, e minha irmã, Rachel Rossine, pela ajuda em todos os momentos difíceis e amor que têm por mim.

A minha noiva Isabella, por todo o amor, carinho, dedicação, estímulo, paciência e compreensão pelo meu ser.

“Seja humilde, pois, até o sol com toda sua grandeza se põe e deixa a lua brilhar.”

“Não cruze os braços diante de uma dificuldade, pois o maior homem do mundo morreu de braços abertos!”

“Preocupe-se mais com a sua consciência do que com sua reputação. Porque sua consciência é o que você é, e a sua reputação é o que os outros pensam de você. E o que os outros pensam, é problema deles.”

“As vezes construímos sonhos em cima de grandes pessoas... O tempo passa... e descobrimos que grandes mesmo eram os sonhos e as pessoas pequenas demais para torná-los reais!”

(Robert Nesta Marley)

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z; Onde X = trabalho; Y = lazer; e Z = manter a boca fechada.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por sempre me ajudar, em todos os momentos, me amparando e permitindo que eu finalizasse este projeto.

À minha irmã, pela sua ajuda e dedicação.

A minha noiva maravilhosa que por todas as vezes esteve ao meu lado, me ajudando e me aturando com minhas manias.

À minha orientadora, Prof. Dra. Sandra Garcia.

À SACCO, pela cultura Lyofast MT 036 LV, e Dominic Anfiteatro, pelos grãos de Kefir, que foram fundamentais para a realização da pesquisa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

BAPTISTA, EDUARDO VINICIUS. **Desenvolvimento de ingrediente simbiótico por fermentação de soro de leite e do subproduto da agroindústria de suco de laranja por grãos de Kefir e cultura probiótica.** 2010. 69f. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O mercado para produtos com diferenciado conteúdo de nutrientes continua a crescer. Neste contexto, este trabalho objetivou desenvolver um ingrediente simbiótico a base de subprodutos de agroindústrias. Para isto, foi utilizado soro de leite reconstituído em 7% (p/v), o qual foi fermentado com 10 e 1% (p/v) das culturas de grãos de Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV, respectivamente, sob temperatura de 25°C por 24 horas. Após o processo fermentativo, o bagaço de laranja, previamente esterilizado por 15 minutos a 121°C, foi adicionado ao soro fermentado na proporção 1:1 (p/v) com a finalidade de fornecer fibras e auxiliar o processo de secagem, que foi realizada à temperatura de 40°C. Análises de viabilidade celular, pH, umidade, Aw, exopolissacarídeos e pectina foram realizadas antes e após a secagem. As contagens de bactérias lácticas, de *Lactococcus* spp. e de leveduras foram determinadas utilizando os Agar MRS, M17 e BDA, respectivamente; as análises de pH, umidade e Aw foram realizadas segundo métodos oficiais; os percentuais de pectina foram determinados através do KIT Pectin Identification – Megazyme; e a quantificação de exopolissacarídeos como EPS-equivalente. A estabilidade dos microorganismos foi avaliada durante 3 meses de armazenamento. As amostras foram mantidas em saches BOPP metalizado e estocadas sob temperatura de 25°C. Durante o armazenamento, análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas a cada 30 dias. Tanto no ingrediente simbiótico fermentado pelos grãos de Kefir quanto no fermentado pela cultura Lyofast, a contagem de bactérias lácticas e de *Lactococcus* spp. foi mantida em 10^7 UFC/g. A contagem de leveduras no ingrediente simbiótico fermentado pela cultura Lyofast foi de 10^5 UFC/g e no ingrediente simbiótico fermentado com o Kefir foi de 10^7 UFC/g. Foi realizado o teste sensorial de aceitação, no qual 10% (p/p) dos ingredientes simbióticos foram adicionados em uma barra de cereais com formulação caseira. Para as bactérias lácticas, a viabilidade celular encontrada em ambos os ingredientes simbióticos foi similar, atingindo ao final do período 7,07 e 7,22 ciclos log/g para Lyofast e Kefir, respectivamente. Para os *Lactococcus* spp. foram encontrados os valores de 7,8 ciclos log/g para a Lyofast e 7,62 ciclos log/g para o Kefir. No ingrediente simbiótico fermentado por grãos de kefir as leveduras estavam presentes em números de 7,53 ciclos log/g e no ingrediente simbiótico fermentado com a cultura Lyofast 5,53 ciclos log/g. No teste de aceitação foi verificado que as 3 amostras analisadas apresentaram notas semelhantes, sem diferença estatística a um nível de 95% de confiança ($p=0,05$). As barras de cereais adicionadas dos ingredientes simbióticos desenvolvidos foram bem aceitas pelos consumidores com índices de aceitação de 93% para Lyofast e 91% para Kefir. Os ingredientes simbióticos desenvolvidos no presente trabalho podem ser uma alternativa para a reutilização dos subprodutos testados e para a diversificação de produtos com propriedades funcionais.

Palavras-chave: Probiótico. Prebiótico. Bagaço de laranja. Soro em pó. Kefir.

BAPTISTA, EDUARDO VINICIUS. DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC INGREDIENT BY FERMENTATION OF WHEY AND BY-PRODUCT OF ORANGE JUICE INDUSTRY BY KEFIR GRAINS AND FREEZE-DRIED PROBIOTIC CULTURE**. 2010. 69P. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, LONDRINA, 2010.**

ABSTRACT

The market for healthy products or with a diversity of nutrients continues to grow. In this context, this study aimed to develop a ingredient symbiotic based on byproducts of agro-industry with a functional potential. For this, milk whey reconstituted at 7 % (w/v) was fermented with 10 and 1 % (w/v) by Kefir grains and Lyofast MT 036 LV, respectively, at a temperature of 25°C for 24 hours. After the fermentative process, the Orange peel, sterilized for 15 minutes at 121 °C, was added to fermented whey in the ratio 1:1 (w/v) in order to provide fiber and help the drying process, which was performed at a temperature of 40°C for 2-3 days. Samples for determination of cell viability, pH, moisture, Aw, exopolysaccharides and pectin were taken before and after drying process. Lactic acid bacteria (LAB), *Lactococcus* spp. and yeasts counts were determined using MRS Agar, M17 and BDA, respectively; the pH, moisture and Aw were performed according to official methods, the percentage of pectin were determined by Kit Pectin Identification – Megazyme, and quantification of exopolysaccharides as EPS-equivalent. The stability of microorganisms presents in the symbiotic ingredients was evaluated during three months of storage. Samples were kept in BOPP metalized sachets and stored at 25°C. During storage, microbiological and physical-chemical testes were performed every 30 days. In both symbiotic ingredients fermented by kefir grains as the fermented ingredient by culture Lyofast, LAB counts and *Lactococcus* spp. were maintained at 10^7 CFU/g. The yeast count in the symbiotic ingredient fermented by Lyofast culture was 10^5 CFU/g and for the ingredient fermented with Kefir was 10^7 CFU/g. Sensory testing was performed for acceptance, in which 10% (w/w) of the ingredient was added to a homemade cereal bar formulation. For LAB, cell viability in both symbiotic ingredients was similar, reaching at the end of the storage period 7,07 and 7,22 log cycles/g for Lyofast and Kefir, respectively. For *Lactococcus* spp. were found values of 7.8 log cycles/g for Lyofast and 7,62 log cycles/g for Kefir. Yeasts, had a greater survival in the ingredient symbiotic fermented with Kefir grains (7,53 log cycles/g) and lowest for the fermented ingredient increased with the Lyofast culture (5,53 log cycles/g). In acceptance testing, it was found that the three samples analyzed had similar notes, but with a statistical difference at the 95% confidence (*p=0,05*). Both ingredients symbiotic developed were well accepted by consumers with acceptance rate of 93% and 91% for Lyofast and Kefir respectively. The symbiotic ingredients developed in this study could be an alternative for the reuse of products tested and to the diversification of products with functional properties.

Key-words: Probiotics. Prebiotics. Orange peel. Whey. Kefir

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lista das espécies (por ordem alfabética) que integram os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. 9
Figura 2 - reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo aos seus efeitos sobre a saúde. 16
Figura 3 - Volume anual de soro de leite produzido no mundo (1995-2005). 20
Figura 4 - Processo de preparo do soro fermentado com a cultura Lyofast MT 036 LV. 25
Figura 5 - Processo de preparo do soro fermentado com a cultura de grãos de Kefir. 26
Figura 6 - Processo de secagem após adição do soro fermentado ao bagaço de laranja esterilizado. 27
Figura 7 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de bactérias lácticas após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir. 36
Figura 8 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para as células viáveis de *Lactococcus* spp. após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir. 37
Figura 9 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para as células viáveis de leveduras após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir. 38
Figura 10 - Soro de leite fermentado com as culturas de grãos de Kefir (A) e Lyofast MT 036 LV (B)) a 25°C por 24 horas. 39
Figura 11 - Bagaço de laranja esterilizado a 121°C por 15 minutos. 40
Figura 12 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de bactérias lácticas pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem. 41
Figura 13 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de *Lactococcus* spp. pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem. 42
Figura 14 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas de Leveduras pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem. 43
Figura 15 - Ingrediente simbiótico desidratado fermentado com grãos de Kefir (A) e

com a cultura Lyofast MT 036 LV (B).....45
Figura 16 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de bactérias lácticas durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV. 46
Figura 17 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de *Lactococcus* spp. durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV. 47
Figura 18 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de leveduras durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal do soro de leite integral. 24
Tabela 2 - Média de determinações realizadas em duplicatas para análise de pH do soro de leite fermentado com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir. 39
Tabela 3 - Médias de determinações realizadas em duplicatas da concentração de exopolissacarídeos pós fermentação e pós adição do bagaço de laranja e secagem. 41
Tabela 4 - Médias de determinações realizadas em duplicata para o pH das culturas fermentadas antes e após a adição do bagaço de laranja no processo de secagem. 43
Tabela 5 - Percentual de pectina do bagaço de laranja in natura e após sua adição ao soro fermentado com os grãos de Kefir e com a cultura Lyofast MT 036 LV para o processo de secagem. 44
Tabela 6 - Médias de determinações realizadas em duplicatas para o percentual de umidade do bagaço in natura, do soro fermentado acrescido de bagaço de laranja e do produto final para as diferentes culturas. 44
Tabela 7 - Médias de determinações realizadas em duplicatas da concentração de exopolissacarídeos pós fermentação, pós adição do bagaço de laranja e secagem e durante 3 meses de armazenamento. 48
Tabela 8 - Análise de bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras presente na porção (10g) fornecida aos consumidores. 49
Tabela 9 - Análise de microorganismos patogênicos e indicadores e respectivos padrões microbiológicos exigidos pela legislação vigente para “Leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados em pó” 50
Tabela 10 - Médias de aceitação do teste de escala hedônica para as amostras 1, 2 e 3. 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 5

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
2.1 Probióticos 7
2.1.1 Kefir 11
2.1.2 Bactérias Lácticas (BAL) 12
2.1.2.1 Lactococcus lactis spp. 13
2.1.3 Leveduras 14
2.2 Prebióticos 15
2.2.1 Fibras 17
2.2.1.1 Pectina 18
2.3 Soro de leite 19
2.4 Bagaço de laranja 20

3 OBJETIVOS 22
3.1 Objetivo Geral 22
3.2 Objetivos Específicos 22

4 MATERIAIS E MÉTODOS 23
4.1 Materiais 23
4.1.1 Kefir 23
4.1.2 Bagaço de laranja 24
4.1.3 Soro de Leite em pó 24
4.2 Métodos 25
4.2.1 Preparo e fermentação das culturas 25
4.2.2 Secagem dos substratos 26
4.2.3 Viabilidade celular 27
4.2.3.1 Contagem de bactérias lácticas 28
4.2.3.2 Contagem de *Lactococcus* spp. 28
4.2.4 Contagem de Leveduras 29
4.2.5 Armazenamento 29
4.2.6 Determinação de pectina total no bagaço de laranja 30
4.2.7 Quantificação de Exopolissacarídeos (EPS) 30

4.2.8 Análises físico-químicas 31
4.2.9 Análise microbiológica 32
4.2.10 Análise sensorial 32

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
5.1 Fermentação do soro de leite 36
5.2 Adição do bagaço de laranja e sobrevivência à secagem 39
5.3 Armazenamento 46
5.4 Análises Microbiológicas 50
5.5 Análise sensorial 51

6 CONCLUSÕES 54

REFERÊNCIAS 55

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, com a crescente procura dos consumidores por melhores condições de vida e saúde, a indústria de alimentos tem focado na produção de novos produtos com características funcionais. Devido às propriedades que estes produtos apresentam, como redução do colesterol, diminuição da absorção de gorduras, melhora do funcionamento do trato intestinal (OLIVEIRA *et al*., 2002), entre outras, os consumidores estão cada vez mais preocupados em obter informações sobre os alimentos funcionais, assim como mudar seus hábitos alimentares. Com isso, o mercado para produtos com apelo saudável ou com diferenciado conteúdo de nutrientes (baixa caloria, enriquecidos com fibras, etc.) continua a crescer. No contexto de busca de novos produtos funcionais, os probióticos e prebióticos têm sido estudados como ingredientes em vários alimentos.

Os probióticos são microorganismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003), sendo as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as mais utilizadas como probióticos. Neste aspecto, destaca-se a utilização dos grãos de Kefir que são constituídos de uma microbiota variada, tendo como principais constituintes bactérias do gênero lactobacilos e leveduras (*Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida e Picchia)*. Estes grânulos são tradicionalmente utilizados para produção de leites fermentados de baixo teor alcoólico (ANFITEATRO, 2000) e apresentam algumas culturas com propriedades probióticas.

Já os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006). Esses componentes atuam mais freqüentemente no intestino grosso, embora também possam ter algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (GIBSON, ROBERFROID, 1995; ROBERFROID, 2001; GILLILAND, 2001; MATTILA-SANDHOLM *et al*., 2002). Dentre os prebióticos, destacam-se diversos tipos de fibras que podem ser classificadas como solúveis, insolúveis ou mistas, podendo ser fermentáveis ou não-fermentáveis.

A nova definição de fibra da dieta sugere a inclusão de oligossacarídeos e de outros carboidratos não-digeríveis (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Dentro do grupo de fibras solúveis e fermentáveis encontra-se a pectina, a qual não é digerida pela α-amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do trato gastrointestinal (CARABIN, FLAMM, 1999), e pode ser obtida de diversos extratos vegetais.

O Brasil é o maior produtor mundial e maior exportador de suco de laranja (LOPES *et al.*, 2006). O bagaço da laranja é um dos resíduos que em sua maioria é destinado à alimentação animal; porém, grande parte é destinada a aterros e usinas de compostagem, sendo considerado um problema ambiental. Sendo o bagaço da laranja um resíduo obtido da extração industrial de suco e rico em pectina (BELITZ e GROSCH, 1997; EL NAWAWI e SHEHATA, 1987), uma possível forma de reaproveitamento economicamente interessante deste resíduo é a utilização da pectina, um polissacarídeo estrutural que é utilizado como ingrediente espessante e estabilizante (BOBBIO e BOBBIO, 1995), além de apresentar propriedades prebióticas (FOOKS, FULLER, GIBSON, 1999).

A indústria de queijo tem como subproduto o soro de leite, o qual corresponde a cerca de 80 % do volume total do leite utilizado na cadeia de produção do queijo. O soro é reutilizado por algumas indústrias para a recuperação de nutrientes, síntese de enzimas, formulação de alguns produtos lácteos, etc. (SOORO, 2009). Sendo um subproduto altamente poluente, com uma BOD – demanda bioquímica de oxigênio cerca de 175 vezes maior do que a BOD de efluentes de esgoto (SMITHERS, 2008), sendo assim um subproduto que requer muita atenção.

Diante de todas as informações relatadas acima, este trabalho teve como objetivo a fermentação do soro de leite com grãos de Kefir e com uma cultura liofilizada de microorganismos probióticos e utilização do bagaço de laranja, resíduo da indústria de suco, como aditivo de sabor, aroma e fibras, para a produção de um novo produto com características funcionais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROBIÓTICOS

Determinados grupos de bactérias, principalmente as láticas, além de atuarem favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, fazem parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos no hospedeiro, sendo denominados de microrganismos probióticos. Um microrganismo probiótico deve necessariamente sobreviver às condições adversas do estômago e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER, GIBSON, 1998) e desta forma realizar diversas funções que proporcionam benefícios ao hospedeiro.

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, a microbiota impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos prejudiciais. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação dos microrganismos patógenos, com conseqüente infecção bacteriana (ZIEMER, GIBSON, 1998).

Segundo Goldin (1998), a palavra probiótico foi introduzida por Lilly e Stillwell, em 1965, para descrever microorganismos que desempenham atividades benéficas. Hoje em dia, podem ser encontradas varias outras definições para estes microrganismos, sendo a mais aceita atualmente a de que probióticos são microorganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003).

Dentre as diversas espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Figura 1), somente algumas são consideradas probióticas, sendo utilizadas em uma ampla quantidade de produtos com características funcionais. Porém no Brasil somente os *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade

rhamnosus, L. casei variedade *defensis*, *L. paracasei, Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum*, e *Enterococcus faecium* são considerados probióticos (ANVISA, 2007).

Lactobacillus		*Bifidobacterium*
L. acetotolerans	*L. jensenii*[a]	*B. adolescentis*[a]
L. acidophilus[a]	*L. johnsonii*	*B. angulatum*[a]
L. agilis	*L. kandleri*	*B. animalis*
L. alimentarius	*L. kefir*	*B. asteroides*
L. amylophilus	*L. kefiranofaciens*	*B. bifidum*[a]
L. amylovorus	*L. malefermentans*	*B. boum*
L. avarius	*L. mali*	*B. breve*[a]
L. bifermentans	*L. minor*	*B. catenulatum*[a]
L. brevis[a]	*L. murinus*	*B. choerinum*
L. buchneri[a]	*L. oris*[a]	*B. coryneforme*
L. casei subsp. *casei*[a]	*L. parabuchneri*[a]	*B. cuniculi*
L. collinoides	*L. paracasei*[a]	*B. dentium*[a]
L. confusus	*L. pentosus*	*B. gallicum*
L. coryniformis	*L. pontis*	*B. gallinarum*
L. crispatus[a]	*L. plantarum*[a]	*B. globosum*[a]
L. curvatus	*L. reuteri*[a]	*B. indicum*
L. delbrueckii	*L. rhamnosus*[a]	*B. infantis*[a]
L. farciminis	*L. ruminis*	*B. lactis*
L. fermentum[a]	*L. sake*	*B. longum*[a]
L. fructivorans	*L. salivarius*[a]	*B. magnum*
L. fructosus	*L. sanfrancisco*	*B. merycicum*
L. gallinarum	*L. sharpeae*	*B. minimum*
L. gasseri[a]	*L. suebicus*	*B. pseudocatenulatum*[a]
L. graminis	*L. vaccinostercus*	*B. pseudolongum*
L. halotolerans	*L. vaginalis*[a]	*B. pullorum*
L. hamsteri	*L. viridescens*	*B. ruminantium*
L. helveticus		*B. saeculare*
L. hilgardii		*B. subtile*
L. homohiochii		*B. suis*
L. intestinalis		*B. thermophilum*

[a] espécies isoladas de fonte humana

Figura 1 - Lista das espécies (por ordem alfabética) que integram os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.
Fonte: GOMES e MALCATA, 1999.

As espécies probióticas apresentam diversos efeitos biológicos. Segundo Fuller (1989), há três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos. O

primeiro deles refere-se à supressão do número de células viáveis de microorganismos patogênicos mediante produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. De acordo com Naidu e Clemens (2000), o espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

Diversos autores vêm sugerindo possíveis efeitos benéficos de culturas probióticas sobre a saúde do hospedeiro. Entre esses efeitos benéficos, merecem destaque o controle das infecções intestinais, o estímulo da motilidade intestinal, com conseqüente alívio da constipação intestinal, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, o efeito anticarcinogênico e o estímulo do sistema imunológico, pelo aumento da produção de anticorpos e da atividade fagocítica contra patógenos no intestino e em outros tecidos do hospedeiro, além da exclusão competitiva e da produção de compostos antimicrobianos (SANDINE *et al*., 1972; GILLILAND, SPECK, 1977; KIM, GILLILAND, 1983; FULLER, 1989; GILLILAND, 1989; TEJADA-SIMON *et al*., 1999; GOMES, MALCATA, 1999; SHORTT, 1999; SREEKUMAR, HOSONO, 2000; NAIDU, CLEMENS, 2000).

É interessante citar também que as bactérias probióticas só apresentam efeitos benéficos no ambiente intestinal quando presentes em um número mínimo. Por exemplo, o número de *L. rhamnosus* para reduzir significativamente a ocorrência da chamada diarréia dos viajantes é de 10^9 UFC/g (OKSANEN *et al*., 1990). Assim, considerando um consumo de produtos probióticos de 100 g, estes devem conter pelo menos 10^7 UFC de bactérias probióticas viáveis por grama no momento da compra do produto. Este é o número recomendável por diversos autores (RYBKA, FLEET, 1997; VINDEROLA, RENHEIMER, 2000). Porém, na legislação brasileira o número estaria entre 10^6-10^7 células viáveis por mL ou g do produto na porção diária (ANVISA, 2007).

2.1.1 Kefir

O Kefir é derivado da palavra Keif oriunda da Turkia e significa “bem-estar”, devido à sensação e aos benefícios que ele promove à saúde humana. Pode ser produzido com leite fresco e é considerado uma cultura *starter*, sendo utilizado em diversos processos, como por exemplo, a fabricação de pães. O Kefir apresenta cerca de 40 componentes aromáticos e podem conter até 2% de álcool; entretanto, apenas 0,05% a 0,1% de álcool é produzido realmente em 1 dia de fermentação com os grãos de Kefir. Ele é considerado um alimento funcional, devido à capacidade de promover benefícios à saúde e resistência a doenças, e também por apresentar componentes nutricionais (ANFITEATRO, 2000),

A origem do Kefir vem das montanhas Caucasianas, possivelmente no nordeste de Ossetia, onde tribos locais têm preparado esta “bebida” por cerca de 1000 anos. Estas pessoas são conhecidas pela sua longevidade e boa saúde e o Kefir é apontado como um dos maiores contribuintes para isto. O Kefir é conhecido como bebida dos profetas pelas tribos locais e também como os grãos do profeta Mohamed (TRUM, 1973).

O Kefir é uma suspensão de microrganismos simbiontes formada por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido lácticas - BAL) e de leveduras, ambas encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas BAL (DINIZ et al., 2003).

Os grãos de Kefir produzem uma bebida fermentada utilizada no ocidente por suas propriedades sensoriais, uso tradicional na medicina popular e também devido ao fato de alguns microorganismos presentes no Kefir apresentarem propriedades probióticas. O produto fermentado resulta em uma solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol. Macroscopicamente, o Kefir apresenta-se como grãos gelatinosos, medindo de 3 a 20 mm de tamanho e com propriedades sensoriais definidas para cada combinação microbiológica (ANFITEATRO, 2000).

2.1.2 Bactérias Lácticas (BAL)

As bactérias lácticas (BAL) foram descritas por Orla-Jensen (1919) para designar um grupo fisiológico de Gram-positivos que fermentam carboidratos a ácido láctico e também a outros compostos como ácido acético, álcool e dióxido de carbono. Tem preferência por condições anaeróbias porém são aerotolerantes, não esporuladas e catalase negativas (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Dentre os principais gêneros, destacam-se *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus* e *Pediococcus*. Alguns autores sugerem que o gênero *Bifidobacterium* pertença ao grupo das bactérias lácticas, entretanto apresentam em seu DNA maiores quantidades de pares de G+C (guanina-citosina) e assim diferenças filogenéticas em relação aos outros gêneros (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Revisões taxonômicas destes gêneros sugerem que BAL compreendem: *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella, Lactosphaera e Paralactobacillus* (LEISNER *et al*., 2000).

Amplamente distribuídas, BAL tem sido utilizadas em todo o mundo para melhorar a preservação, características sensoriais e valor nutricional de uma ampla variedade de produtos. Isso porque algumas linhagens são capazes de converter açucares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor e também podem contribuir para melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da síntese de exopolissacarídeos (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002).

Algumas espécies de bactérias lácticas produzem substâncias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas (NAIDU et al., 1999). A ação antagonista de espécies de BAL contra microorganismos indesejáveis em alimentos tem sido descrita em vários trabalhos. Muitas BAL isoladas de leite e queijos apresentaram poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes, como *Staphylococcus spp*., *Listeria spp*., *Salmonella spp*., *Bacillus spp*., *Pseudomonas spp*. e coliformes (VAUGHAN et al., 1994; BRASHEARS e DURRE, 1999; URAZ et al., 2001; ALEXANDRE, 2002; CARIDI, 2003).

2.1.2.1 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis são bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), devido a sua capacidade de converter a lactose presente no substrato em ácido láctico via fermentação. Por isto, estas bactérias são utilizadas em diversos processos envolvendo alimentos fermentados (vegetais, leite e carne), onde são responsáveis pela preservação e características sensoriais, assim como pela cor, textura e sabor (MIYOSHI *et al.*, 2003).

Os *Lactococcus lactis* são mesófilos, com crescimento ótimo em temperatura de 30°C , sendo fermentadores microaerófilos (DUWAT *et al*., 2000). Estas bactérias são comumente encontradas na natureza, sob a superfície de plantas e animais, sendo muito utilizadas na Indústria de Laticínios para a produção de fermentados, como queijo e manteiga.

Alguns autores consideram determinadas espécies de *Lactococcus* spp. probióticas (SANDERS AND HUIS IN'T VELD, 1999; BLANDINO *et al.*, 2003; VINDEROLA e REINHEIMER, 2003, citados por ESPINOZA e GALLARDO-NAVARRO, 2010) . Em um estudo que visava verificar as características probióticas dos microorganismos encontrados nos grãos de Kefir oriundos da Turkia, através da produção de ácido lático, peróxido de hidrogênio, atividade antimicrobiana e produção de diacetil e acetaldeído, Yüksekdag, Beytali e Aslim (2004), verificaram que as linhagens de *Lactococcus cremoris* e *Lactococcus lactis* apresentaram propriedades que podem caracterizá-las como probióticas e de possível uso na produção de produtos com alto potencial funcional.

Considerando que os grãos de Kefir utilizados no trabalho contém 2 linhagens de *Lactococcus lactis*, é interessante ressaltar a sua importância na contribuição das propriedades sensoriais e probióticas do ingrediente simbiótico obtido que poderá ser utilizado em diversos tipos de alimentos.

2.1.3 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou gemulação, tem crescimento ótimo entre 25°C e 0°C e se desenvolvem bem em pH ácido. Elas apresentam alta diversidade fisiológica e por isso podem crescer em vários tipos de habitat (JACQUES e CASAREGOLA, 2008). Esta diversidade tem sido estudada para o desenvolvimento de um grande número de produtos, para produção de metabólitos industriais, e em vários processos biotecnológicos, como a produção de proteínas e enzimas. Algumas espécies de leveduras também são usadas como probióticos, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (POSTERATO et al., 2005).

As leveduras são heterotróficas e para seu crescimento requerem nutrientes minerais e quantidade significante de carbono. A maioria das leveduras cresce em uma ampla variação de valores de pH, o que permite a elas, em particular, colonizarem materiais que já apresentam processo fermentativo por bactérias (LACHANCE e STARMER, 1998). Leveduras são freqüentemente encontradas em alimentos manufaturados que contém gordura ou grande quantidade de açúcar. Em animais elas são encontradas na pele e também no trato gastrointestinal.

Alguns trabalhos citam propriedades probióticas da levedura *Saccharomyces boulardii,* onde em infecções experimentais, foram extensivamente estudadas. Ensaios em humanos, assim como estudos in vitro, mostraram que *a S. boulardii* apresenta papel protetor contra alguns patógenos entéricos que provocam diarréias (CZERUCKA e RAMPAL, 2002; MANSOUR-GHANAEI et al., 2003).

Além da *S. boulardii,* a *S.cerevisiae* também é relatada em alguns trabalhos como probiótica. Em um estudo feito com *S.cerevisiae* foi relatada a eficácia da mesma no combate a diarréias em humanos (KOVACS e BERK, 2000). Na dieta de ruminantes a *S. cerevisiae* é muito utilizada, pois ela estimula a atividade dos microorganismos benéficos do trato gastrointestinal, aumentando desta forma a digestibilidade de nutrientes e o potencial de produção dos animais (NEWBOLD et al., 1995; WOHLT et al., 1998).

2.2 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são “ingredientes alimentares não digeríveis por humanos que exercem um efeito benéfico no indivíduo, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de espécies bacterianas benéficas existentes no cólon (Figura 2), melhorando a saúde do hospedeiro”. Estes ingredientes, normalmente de natureza glicídica (geralmente oligossacarídeos), devem ser indigeríveis pelas enzimas digestivas, alçando o intestino grosso intactos, onde serão especificamente utilizados por grupos de microrganismos com propriedades benéficas claramente identificadas (MACFARLANE E CUMMINGS, 1999; ROBERFROID, 2002). Além disso devem induzir efeitos benéficos sistêmicos ou na luz intestinal do hospedeiro (MENTEN, 2001).

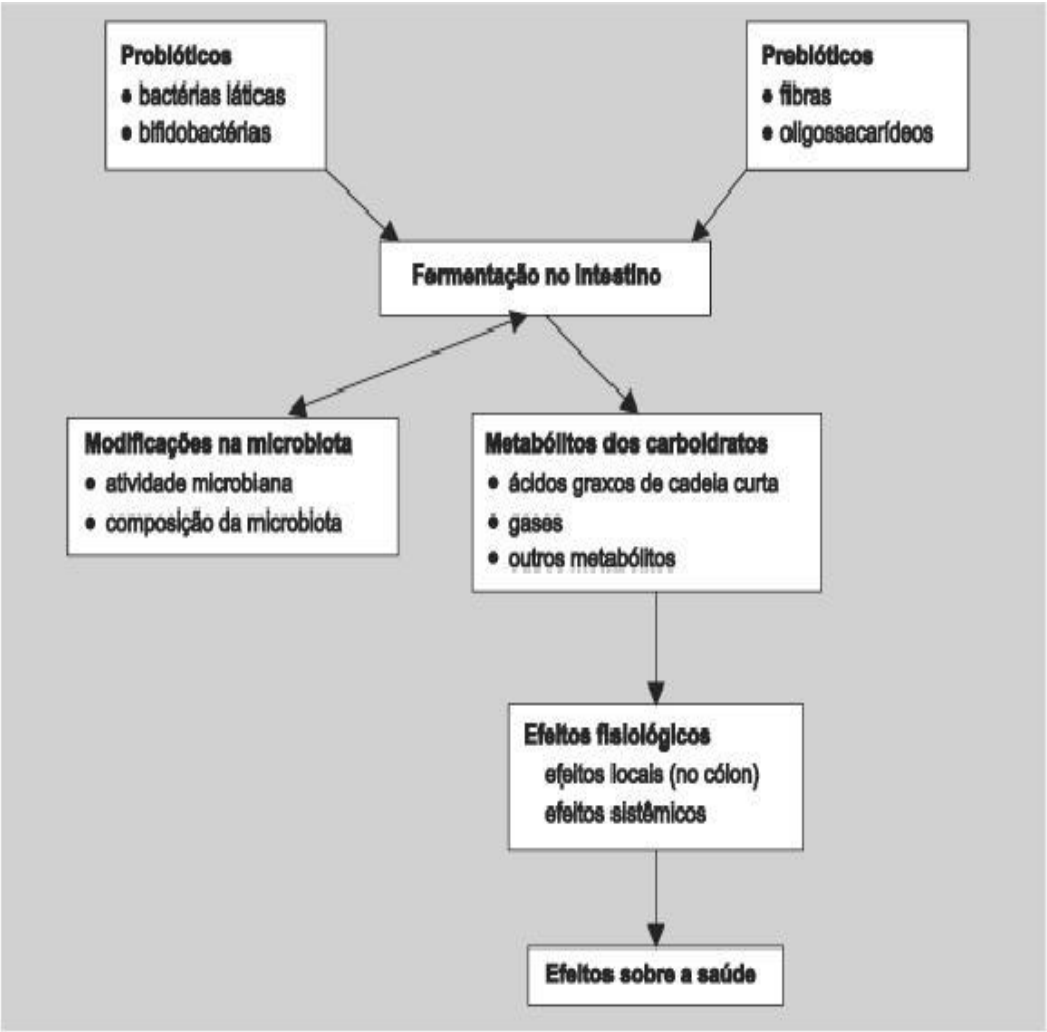

Figura 2 - reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo aos seus efeitos sobre a saúde.
Fonte: SAAD, 2006.

No intestino, as diferentes substâncias prebióticas devem ser preferencialmente fermentadas e promoverem o crescimento de uma ou outra espécie bacteriana. Sendo assim, a seletividade destes prebióticos poderá ser verificada, não só quanto ao gênero, mas também quanto à espécie bacteriana. Esta relação estrutura-função é, no entanto, pouco estudada relativamente aos prebióticos em geral (RASTALL E MAITIN,2002; RABIU *et al*., 2001).

Neste contexto, as substâncias prebióticas agem de forma a suprir os nutrientes necessários para estimular o crescimento de específicas ou diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam também reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos presentes no ceco. Por outro lado, atuam bloqueando os sítios de aderência (principalmente a D-manose), imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas

na mucosa intestinal. Especula-se também, que as substâncias prebióticas atuam estimulando o sistema imune, através da redução indireta da translocação intestinal por patógenos, que determinariam infecções após atingirem a corrente sanguínea (SAVAGE *et al*., 1996).

Dentro do grupo de prebióticos, podem-se destacar a inulina, os frutooligossacarídeos e também diversos tipos de fibras que podem ser classificadas como solúveis, insolúveis ou mistas, podendo ser fermentáveis ou não-fermentáveis.

2.2.1 Fibras

Considera-se fibra alimentar o conjunto dos componentes dos alimentos vegetais que resistem à hidrólise pelas enzimas endógenas do tubo digestivo. Tais resíduos alimentares, como não são digeridos, não possuem valor calórico, passam para as fezes, e são degradados no intestino grosso (POURCHET-CAMPOS, 1990).

A fibra alimentar poderá influenciar vários aspectos da digestão, absorção e metabolismo, entre eles:

- A diminuição do tempo de trânsito intestinal dos alimentos;
- Aumento da velocidade de absorção intestinal da glicose;
- Diminuição dos níveis de colesterol sangüíneo;
- Diminuição do conteúdo de calorias ingeridas.

Essas propriedades, segundo Calixto (1993), fazem das fibras um adequado regulador intestinal. As fibras são ainda fatores de importância em regimes dietéticos para a prevenção ou tratamento de diabetes e de pessoas com problemas de hipercolesterolemia ou obesidade. O desenvolvimento de câncer de cólon e outros distúrbios gastrointestinais pode estar relacionado com a falta de fibras na dieta.

2.2.1.1 Pectina

A pectina é considerada uma fibra solúvel e fermentável, a qual não é digerida pela α-amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do trato gastrointestinal (CARABIN, FLAMM, 1999). Ela está presente na parede celular dos vegetais, em diferentes formas, conforme o avanço da maturação.

As substâncias pécticas são encontradas nos frutos em formas diversas, com uma solubilidade diferente dependendo do estado de maturação, cada uma delas com funções na determinação da textura (SGARBIERI, 1966; CHITARRA, 1973). As pectinas encontram-se principalmente depositadas na parede celular, atuando como material de ligação entre as células, sendo consideradas fibras com características espessante, estabilizante (BOBBIO E BOBBIO, 1995) e apresentando, em alguns casos, propriedades prebióticas (FOOKS, FULLER, GIBSON, 1999).

Segundo Whistler e Daniel (1985), as substâncias pécticas podem se apresentar como:

- Protopectina: altamente esterificada com metanol; insolúvel em água. Durante o amadurecimento da fruta, a enzima protopectinase converte a protopectina em pectina coloidal, ou ácidos pectínicos, que são solúveis em água.
- Pectina: polissacarídeo estrutural encontrado na parede celular de vegetais com a função de conferir rigidez. Também chamada de ácido pectínico, a pectina é menos metilada que a protopectina. Os ácidos pectínicos são os ácidos poligalacturônicos coloidais que formam gel em condições específicas. A ação contínua da pectina-metilesterase sobre o ácido pectínico leva a remoção completa dos grupos metil-éster e à formação de ácidos pécticos.
- Ácidos pécticos: são ácidos poligalacturônicos isentos de grupos metílicos. São degradados a ácido galacturônico pela enzima poligalacturonase.

Segundo Bobbio e Bobbio (1995), a pectina é formada por 150 a 1.500 unidades de ácido galacturônico unidas por ligações glicosídicas α (1-4) e apresenta peso molecular entre 100.000 a 200.000 Daltons. A composição e as

propriedades da pectina variam de acordo com a fonte, o processo de extração empregado e tratamentos posteriores à extração (FENNEMA, 2007).

As cadeias lineares de ácido galacturônico possuem grupos carboxílicos esterificados por radicais metoxil (CH_3) em maior ou menor grau. O grau de metoxilação (DM – degree of metoxilation) é uma medida da proporção de grupos carboxílicos que estão presentes na forma esterificada. Por exemplo, uma pectina de DM igual a 0,7 indica 70% de esterificação (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

A proporção de grupos metil-éster decresce conforme o vegetal amadurece. O grau de esterificação é calculado pela razão entre o número de resíduos de ácido D-galacturônico esterificados e o número total de resíduos de ácido D-galacturônico multiplicado por 100 (WHISTLER e DANIEL, 1985).

2.3 SORO DE LEITE

O soro do leite é um subproduto resultante da fabricação de queijos, por coagulação da caseína, obtido por adição de ácido ou de enzima (soro doce). Possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos essenciais, destacando-se os sulfurados (CAPITANI *et al*., 2005).

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro do leite são muito conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais tecnológicas como ingredientes em produtos alimentícios, principalmente por sua elevada solubilidade e capacidade de geleificação. Recentemente, têm sido atribuídas às proteínas do soro propriedades funcionais fisiológicas, capazes de produzir um importante controle na modulação do metabolismo e nos mecanismos de defesa dos organismos animal e humano (SGARBIERI & PACHECO, 1999; MICKE *et al*., 2002; ROSANELI *et al*., 2002).

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro do leite, e as mais comercializadas são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e bebidas lácteas não-fermentadas. Contudo, o aproveitamento desse subproduto ainda é baixo variando em torno de 15-20% apenas (SMITHERS, 2008), sendo que

a produção anual de soro de leite no mundo aumenta em torno de 1-2% segundo a figura 3. (FAO, 2006).

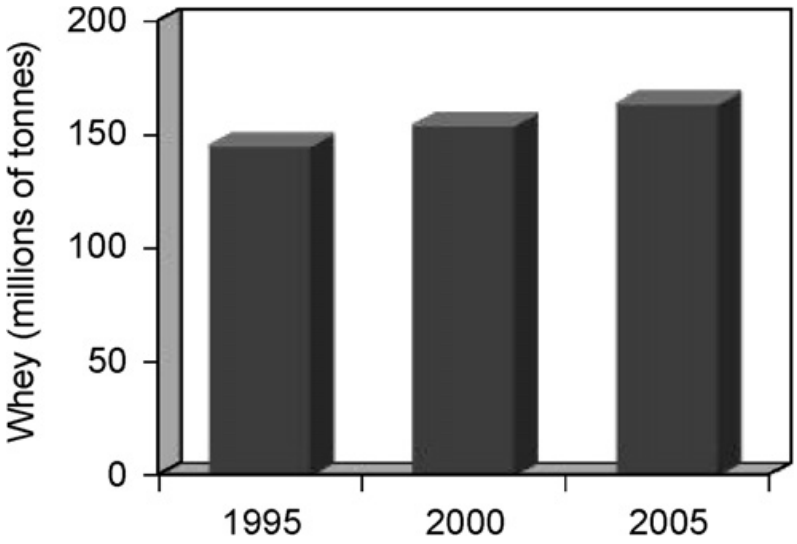

Figura 3 - Volume anual de soro de leite produzido no mundo (1995-2005).
FONTE: FAO, 2006

2.4 BAGAÇO DE LARANJA

O bagaço da laranja, resíduo da produção industrial do suco, é composto por flavedo, albedo, membranas, resíduos de polpa e sementes (FOX, 1991; KALE e ADSULE, 1995). O flavedo é a casca propriamente dita, que contém óleos essenciais e pigmentos. O albedo é a porção branca, fibrosa, de alta porosidade, aderida internamente ao flavedo, sendo esta camada que contém a maior concentração de pectina do total contido no bagaço. Membranas presentes no bagaço contêm celulose, hemicelulose, lignina, pectina, compostos fenólicos, flavonóides, vitaminas e minerais (FOX, 1991).

Quanto à proporção entre a quantidade de laranjas que entram na planta para extração de suco e a quantidade de bagaço restante dessa extração, há variações de acordo com a variedade e o grau de maturação da fruta, o tipo de processamento e processos subseqüentes à extração de suco.

Até 60% em peso da fruta são resíduos sólidos (casca, partes da

polpa e sementes). Proporcionalmente, a laranja contém de 21,5 a 38,1% de casca; 61,9 a 78,6% de polpa e 23,8 a 51,0% de suco. Segundo a Abecitrus (2008), o bagaço corresponde a cerca de 50%, em peso, das laranjas processadas.

Um destino para o bagaço de laranja é a sua utilização como matéria prima na produção de óleos Essenciais (D'limoneno) e também como Farelo de casca de laranja para alimentação animal (ABECITRUS, 2008). De acordo com El Nawawi e Shehata (1987), para destinar os resíduos da indústria de suco e obter maior retorno financeiro na indústria de citrus, os resíduos da extração podem ser utilizados para a produção de pectina.

A quantidade de pectina em bagaço de laranja é variável em função da variedade e do grau de maturação da fruta, do tempo decorrente entre a colheita e a extração da pectina e do processamento ao qual a fruta é submetida. O teor de pectina decresce em frutos conforme avança o amadurecimento (FONSECA, 2001) e conforme aumenta o tempo entre a colheita da laranja e o processamento de extração de pectina.

Em base seca, aproximadamente 30% do bagaço de laranja é pectina (EL NAWAWI e SHEHATA, 1987), sendo a extração da pectina do bagaço de laranja uma outra via de reaproveitamento.

Desta forma, além de ser uma alternativa de aproveitamento para o resíduo da indústria de suco de laranja, a utilização da pectina, e desse material como um todo, é uma forma de agregar valor a este subproduto, resultando em benefícios econômicos e minimizando danos ao meio ambiente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um ingrediente simbiótico desidratado, fermentado por grãos de Kefir e cultura probiótica, utilizando bagaço de laranja e soro de leite.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se o soro de leite é viável para a fermentação com grãos de Kefir e com uma cultura comercial liofilizada de microorganismos probióticos (LYOFAST MT 036 LV).

Determinar a viabilidade das bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras presentes nos grãos de Kefir e cultura LYOFAST MT 036 LV, após os processos de fermentação do soro e após adição do bagaço de laranja no processo de secagem.

Determinar o percentual de pectina presente no bagaço da laranja antes e após a secagem.

Quantificar o teor de exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias durante os processos de fermentação e secagem, e durante o armazenamento.

Verificar a viabilidade dos microorganismos presentes em ambas culturas por 3 meses na temperatura de 25°C.

Verificar as diferenças sensoriais na barra de cereais adicionada do ingrediente simbiótico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Kefir

Os grãos de Kefir foram obtidos de Dominic Anfiteatro e a cultura liofilizada LYOFAST MT 036 LV foi fornecida pela empresa SACCO localizada em Campinas, São Paulo, Brasil. Ambos armazenados em freezer (-10°C a -15°C).

Microorganismos encontrados na cultura Lyofast MT 036 LV:

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
- *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Lactobacillus brevis*
- Leuconostoc
- *Saccharomyces cerevisiae*

Microorganismos encontrados nos grãos de Kefir:

- *Lactobacillus* spp; *Lactococcus* spp ; *Leuconostoc* spp ; *Acetobacter* spp ; *Streptococcus* spp ;*Kluyveromyces* spp ; *Candida* spp ; *Sacharomyces* spp ; *Torula* spp (ANFITEATRO, 2000).

4.1.2 Bagaço de laranja

O bagaço de laranja utilizado foi fornecido pela COROL Cooperativa Agroindustrial, localizada em Rolândia, Paraná, Brasil e utilizado no mesmo dia em que foi transportado da Corol ao laboratório de desenvolvimento do projeto de pesquisa.

4.1.3 Soro de Leite em pó

O Soro de leite em pó utilizado no presente trabalho foi cedido pela empresa Alibra ingredientes Ltda., localizada em Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. Armazenado em câmara fria (4°C).

A composição nutricional do soro de leite esta expressa na tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal do soro de leite integral.

Componente	Soro de Leite integral
Energia, kcal/kg	23 kcal/100g
Matéria seca, %	6,40 %
Proteína bruta, %	0,73 %
Gordura, %	0,03 %
Lactose, %	5,00 %
Cinzas, %	0,64 %
pH	5,80 %

Fonte: Hauptli *et al*. 2005.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo e fermentação das culturas

Para ativação da cultura liofilizada LYOFAST MT 036 LV, uma alçada da cultura foi inoculada em 100 ml de soro de leite reconstituído a 7% (p/v), previamente pasteurizado sob temperatura de 85°C por 15 minutos, e incubado a 25°C por 24 horas. Após este período, Erlemeyers contendo 100 ml de soro de leite reconstituído a 7% (p/v) também pasteurizado foram inoculados com 1% (v/v) da cultura previamente crescida, e incubados nas mesmas condições que o primeiro ensaio. Foram realizadas três repicagens sucessivas da cultura sob as mesmas condições. De acordo com a figura 4.

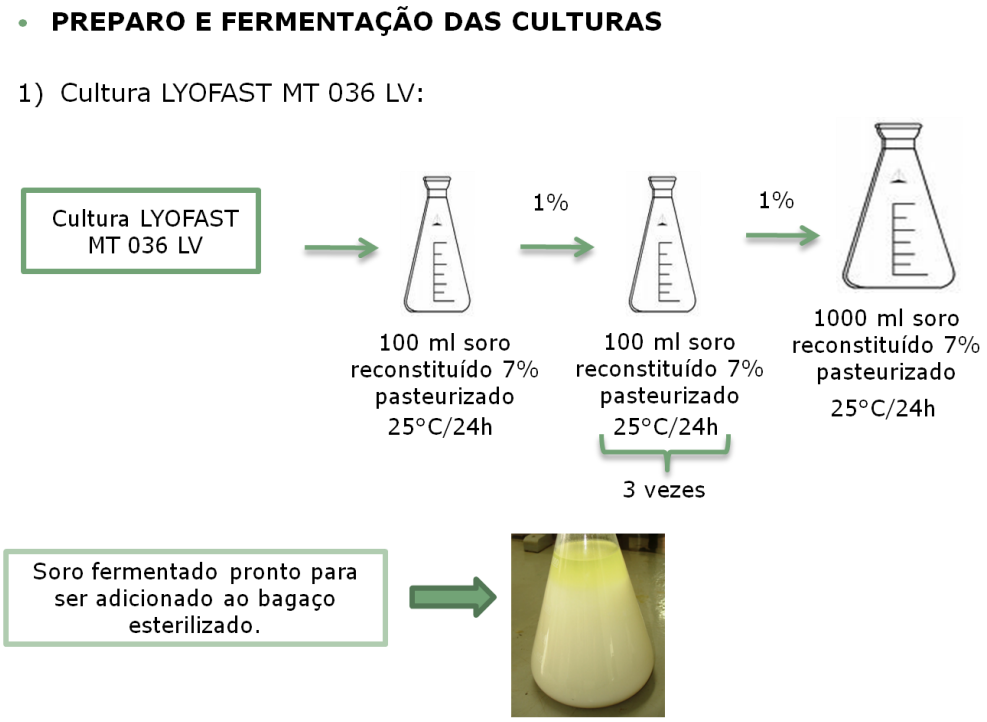

Figura 4 - Processo de preparo do soro fermentado com a cultura Lyofast MT 036 LV.

Para ativação dos grãos de Kefir, 10% (p/v) dos grãos foram inoculados em 100 ml de soro de leite reconstituído a 7% (p/v), previamente

pasteurizado sob temperatura de 85°C por 15 minutos, e incubados a 25°C por 24 horas. Após este período, Erlemeyers contendo 100 ml de soro de leite reconstituído a 7% (p/v) também pasteurizado foram inoculados com 10% (p/v) dos grãos previamente crescidos, e incubados nas mesmas condições que o primeiro ensaio. Foram realizadas três repicagens sucessivas dos grãos sob as mesmas condições. De acordo com a figura 5.

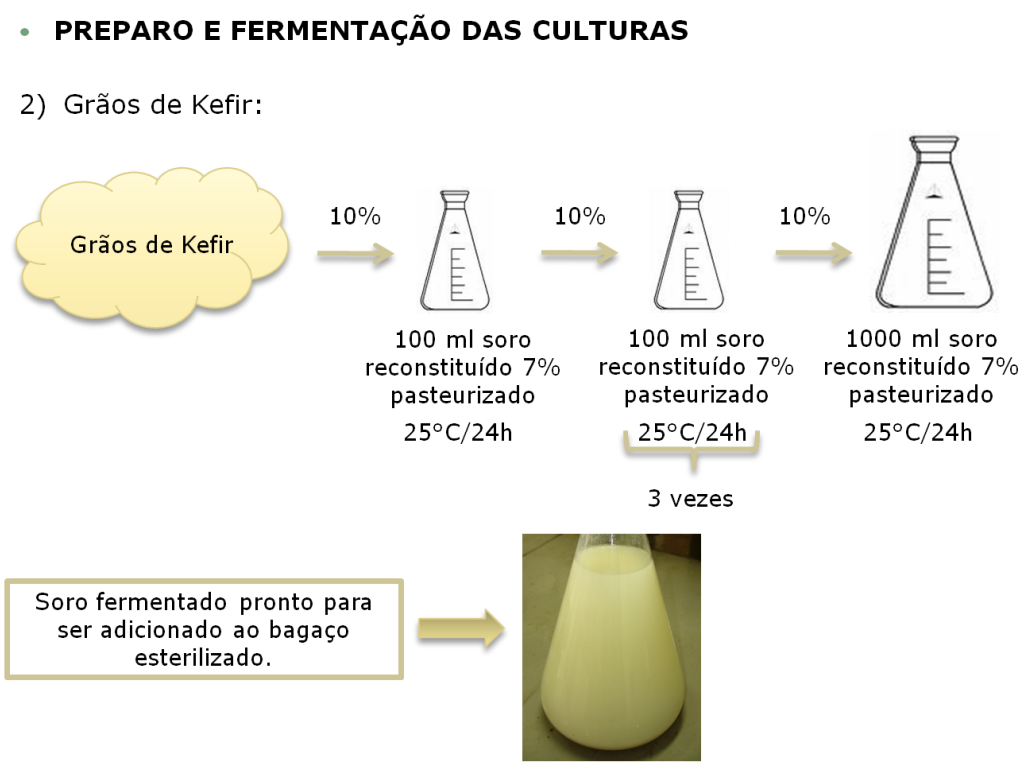

Figura 5 - Processo de preparo do soro fermentado com a cultura de grãos de Kefir.

Após a incubação, os grãos de Kefir foram separados do soro fermentado por filtração em peneira de plástico (sanitizada por imersão em etanol 70%) e posteriormente lavados com água estéril (PIERMARIA *et al*., 2008), sendo armazenados a 4°C em soro de leite pasteurizado para posterior análises.

4.2.2 Secagem do bagaço de laranja adicionado de soro de leite fermentado

Após as fermentações do soro de leite com os grãos de Kefir e com a cultura liofilizada LYOFAST MT 036 LV à 25°C por 24 horas, o bagaço de laranja,

esterilizado a 121°C por 15 minutos, foi adicionado na proporção de 1:1 ao soro fermentado, com o intuito de auxiliar o processo de secagem (estufa - SOC.FABBE LTDA) e agir como aditivo de sabor, aroma e fonte de fibras.

A secagem foi conduzida sob temperatura de 40° C até peso constante, aproximadamente 2 a 3 dias.

Após a secagem, o material foi moído (Moinho IKA WORKS, Modelo A11 Basic). De acordo com a figura 6.

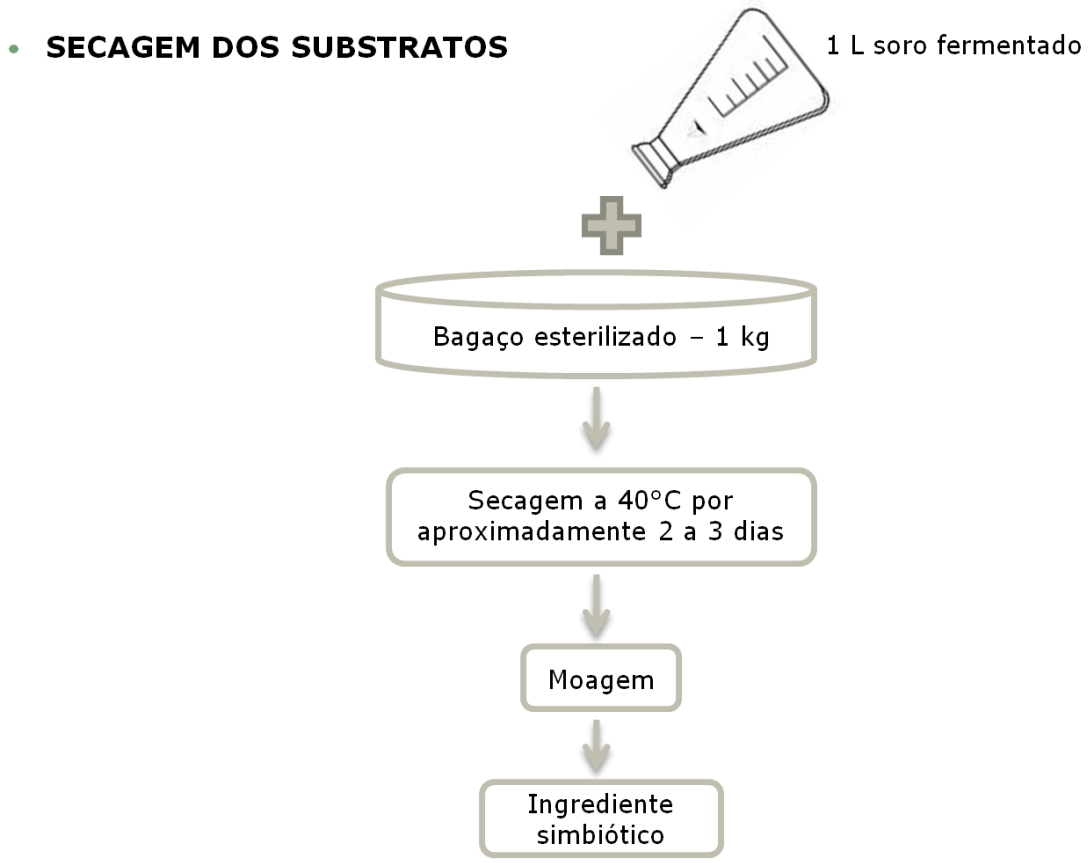

Figura 6 - Processo de secagem após adição do soro fermentado ao bagaço de laranja esterilizado.

4.2.3 Viabilidade celular

4.2.3.1 Contagem de bactérias lácticas

As contagens de bactérias lácticas para ambos ingredientes simbióticos produzidos com a fermentação pelos grãos de Kefir e também pela cultura liofilizada foram realizadas após os processos de fermentação do soro, secagem e em intervalos de 30 dias durante o período de armazenamento. Também foram realizadas determinações de viabilidade celular na barra de cereais produzida e adicionada do ingrediente simbiótico para a análise sensorial, com o intuito de verificar a quantidade de bactérias lácticas na porção fornecida aos consumidores.

A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL ou g (UFC.mL^{-1} ou g^{-1}) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade ("*Pour Plate*"), utilizando o meio de cultivo MRS-agar ("Man, Rogosa, Sharpe") para os *Lactobacillus*. As placas foram incubadas em estufa de cultura (FANEM LTDA – Modelo 002CB) a 37 °C por 48 horas (SILVA *et al.*, 2001).

Os experimentos foram conduzidos com duas repetições, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistica 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.2.3.2 Contagem de *Lactococcus* spp.

As contagens de *Lactococcus* spp. para ambos ingredientes simbióticos produzidos com a fermentação pelos grãos de Kefir e também pela cultura liofilizada foram realizadas após os processos de fermentação do soro, secagem e em intervalos de 30 dias durante o período de armazenamento. Também foram realizadas determinações de viabilidade celular na barra de cereais produzida e adicionada do ingrediente simbiótico para a análise sensorial, com o intuito de verificar a quantidade de *Lactococcus* spp. na porção fornecida aos consumidores.

A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL ou g (UFC.mL^{-1} ou g^{-1}) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade ("*Pour Plate*"), utilizando o meio de cultivo Agar M17 para o

crescimento dos *Lactococcus* spp. As placas foram incubadas em estufa de cultura (BOD, Modelo TE 391) a 25° C por 72 horas (SOUZA *et al.,* 2003).

Os experimentos foram conduzidos com duas repetições genuínas, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistica 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.2.4 Contagem de Leveduras

As contagens de leveduras para ambos ingredientes simbióticos produzidos com a fermentação pelos grãos de Kefir e também pela cultura liofilizada foram realizadas após os processos de fermentação do soro, secagem e em intervalos de 30 dias durante o período de armazenamento. Também foram realizadas determinações de viabilidade celular na barra de cereais produzida e adicionada do ingrediente simbiótico para a análise sensorial, com o intuito de verificar a quantidade de leveduras na porção fornecida aos consumidores.

A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL ou g (UFC.mL^{-1} ou g^{-1}) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade ("*Pour Plate*"), utilizando o meio de cultivo Agar PDA (Ágar batata dextrose Acidificado) e adição de ácido tartárico 10% até atingir pH 3,7 - 3,8, para o crescimento de leveduras. As placas foram incubadas estufa de cultura (BOD, Modelo TE 391) a 25° C por 72 horas (SILVA *et al.*, 2001).

Os experimentos foram conduzidos com duas repetições genuínas, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistica 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.2.5 Armazenamento

A viabilidade das bactérias lácticas totais dos *Lactococcus* spp. e das leveduras foi acompanhada durante 3 meses de armazenamento sob

temperatura de 25°C, nas amostras dos ingredientes simbióticos fermentados com os grãos de Kefir e com a cultura LYOFAST MT 036 LV.

Porções de 20g dos ingredientes simbióticos desidratados foram embaladas em saches de BOPP (polipropileno bio-orientado) metalizado hermeticamente selados. Análises de viabilidade celular foram realizadas a cada 30 dias em duplicata para cálculo da média de duas repetições dos tratamentos.

Os experimentos foram submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistic 6.0. Os gráficos foram plotados pelo Programa Microsoft Excel 2007.

4.2.6 Determinação de pectina total no bagaço de laranja

A determinação de pectina total no bagaço de laranja foi feita com a utilização do KIT Pectin Identification (Megazyme), antes e depois dos processos de fermentação e secagem.

O principio deste kit baseia-se no fato da pectina ser dissolvida em água deionizada e ajustada ao pH 12, para a produção de regiões poli-galacturonicas e conversão da pectina a pectato. O pectato é incubado com a enzima pectato liase, a qual hidrolisa os ácidos poligalacturonicos produzindo oligossacarídeos insaturados que são lidos a 235 nm de absorbância em espectrofotômetro UV-vísivel (Cintra 20, Modelo GBC).

4.2.7 Quantificação de Exopolissacarídeos (EPS)

A quantificação de EPS foi realizada de acordo com Souza (2004). Exatamente 10 g do soro não inoculado (padrão – sem ação de microorganismos) e também do soro fermentado com ambas culturas, foram cuidadosamente pesados em tubos de centrífuga de 50 ml. Em seguida, foi adicionado 250 µL de ácido

tricloroacético 80 %, as amostras foram agitadas e armazenadas a 4°C por 30 minutos para serem posteriormente centrifugadas (Centrífuga – Ependorf, modelo - 5804 R) a 4°C, 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada cultura foi cuidadosamente transferido para outros tubos de centrífuga e os EPS precipitados pela adição de etanol frio absoluto. Após nova centrifugação a 13975xg a 4°C por 20 minutos, os EPS separados foram dissolvidos em água destilada.

A concentração do carboidrato total foi determinada usando-se 1 ml dos precipitados diluídos em água destilada, seguida da adição de fenol 5% (1 ml) e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (10-20 segundos) em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em descanso por 10 minutos, posteriormente agitados e colocados em banho Maria a 25 ou 30°C, por 10 a 20 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 490 nm. As concentrações de carboidratos totais foram determinadas a partir de uma curva de calibração da glicose, em concentrações de 10 a 100 µg/ml. Os resultados foram expressos como EPS-equivalente (mg/100 g das amostras) para o soro fermentado com cada cultura. Os valores de EPS foram calculados pela subtração da quantidade de EPS do soro fermentado e dos EPS presentes no soro não inoculado.

4.2.8 Análises físico-químicas

Análises de pH, atividade de água (Aw) e umidade foram realizadas em duplicata em cada amostra (soro fermentado com grãos de Kefir e cultura liofilizada) antes e depois dos processos de fermentação do soro e secagem soro adicionado do bagaço de laranja. O pH e a umidade foram determinados de acordo com as normas oficiais do Instituto Adolfo Lutz (2005) e a atividade de água (Aw) mensurada em aparelho AQUALAB (modelo CX-2), previamente calibrado com água destilada.

Os experimentos foram conduzidos com duas repetições, sendo submetidos à análise de variância a ANOVA e processados no Programa Statistica 6.0.

4.2.9 Análise microbiológica – ingrediente simbiótico e barra de cereais

Para garantir as condições microbiológicas e a segurança da barra de cereais a ser oferecida aos provadores, análises de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. foram realizadas segundo Silva *et al.* (2001), seguindo as determinações da resolução – RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA).

4.2.10 Análise sensorial

Anteriormente à realização dos testes sensoriais, o projeto foi submetido ao "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Regional Norte do Paraná", obtendo como parecer "aprovado" com protocolo n° 0179.0.268.000-08 e Anexo 175/08.

O ingrediente simbiótico obtido no estudo foi adicionado a uma formulação de barra de cereais devido ao fato de ser um ingrediente em pó e por não ter sido feita análise de solubilidade do mesmo. Sendo um ingrediente com um sabor amargo e que não seria muito bem aceito se servido diretamente, este foi adicionado a barra de cereais com o intuito do sabor amargo ser mascarado pelo doce do açúcar e do mel presente na mesma.

O produto formulado para a análise sensorial foi uma barra de cereais, com formulação caseira, onde se utilizou 4 colheres de sopa de açúcar, ½ xícara de mel, 1 xícara de flocos de arroz crocantes, ½ xícara de aveia em flocos; ½ xícara de uva passa e 1 colher de sopa de margarina, segundo o site "Tudo Gostoso" (2010). Após a formulação das barras de cereais, foram adicionados 10% (p/p) do ingrediente simbiótico desenvolvido com a cultura LYOFAST MT 036 LV para confecção da primeira amostra a ser oferecida aos consumidores e 10% (p/p) do ingrediente simbiótico desenvolvido com a cultura de grãos de Kefir para confecção da segunda amostra. A porcentagem de pó utilizado foi calculada em função do número de microorganismos viáveis na barra de cereais (entre 10^6 e 10^8 UFC/g). Paralelamente, foi preparada a terceira amostra, constituída pela formulação original

- padrão (sem adição do ingrediente simbiótico).

A aceitabilidade das amostras formuladas com os ingredientes simbióticos foi determinada realizando-se o teste de aceitação com 89 provadores potenciais, não treinados, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos e apresentação seqüencial das amostras. A partir dos resultados, foi aplicada análise variância (ANOVA), utilizando-se um intervalo de confiança de 95% e $p<0,05$. Os índices de aceitação foram calculados pelo programa computacional Statistic 6.0.

Segue abaixo o modelo de questionário para recrutamento de provadores e a ficha de avaliação para o teste de aceitação global do consumidor.

QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO DE PROVADORES (TESTE DE ACEITAÇÃO)

Desejamos formar uma equipe de provadores para avaliar a qualidade de uma barra de cereais adicionada de um ingrediente com propriedades funcionais (pó obtido depois do processo de fermentação). Ser um provador não exigirá de você nenhuma habilidade excepcional, não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, leva em torno de 10 minutos e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. Se tiver qualquer dúvida, ou necessitar de informações adicionais, entre em contato (Eduardo, 3338-3247; 99188124 e Profa Dra. Sandra Garcia, ramal 4984, sgarcia@uel.br).

Dados Pessoais

Nome_____

Telefone para contato / e-mail_____

1-Faixa etária

( ) 15-25

( ) 25-35

( ) 35-50

( ) acima de 50 anos

2- Sexo

( ) masculino

( ) feminino

3- Ocupação

( ) aluno _____

( ) funcionário

( ) professor

( ) outro _____

4- Escolaridade

( ) 1ºgrau

( ) 2ºgrau

( ) 3º grau

( ) outro

5. Gosta de barrinha de cereais: ( ) Sim ( ) Não

6- Freqüência de Consumo de:

Barrinha de cereais:

( ) Nunca

( ) Ocasionalmente - _____ vezes por ano

( ) Moderadamente - _____ vezes por mês

( ) Freqüentemente - _____ vezes por semana

Alimentos com alegações funcionais:

( ) Nunca

( ) Ocasionalmente - ___ vezes por ano

( ) Moderadamente - ___vezes por mês

( ) Freqüentemente - ___vezes por semana

Produtos probióticos:

( ) Nunca

( ) Ocasionalmente - ___vezes por ano

( ) Moderadamente - ___vezes por mês

( ) Freqüentemente - ___vezes por semana

Produtos que costuma consumir :

Ficha de avaliação para o teste de aceitação global do consumidor.

Produto testado: Barrinha de cereais adicionada ou não, dos ingredientes simbióticos formulado pelo pesquisador.

Nome: _____ Data: _____

Por favor, avalie a amostra de barrinha de cereais utilizando a escala abaixo, para dizer o quanto gostou ou desgostou do produto e, se desejado, faça comentários sobre ele.

1- Desgostei muitíssimo
2- Desgostei muito
3- Desgostei
4- Desgostei ligeiramente
5- Não gostei nem desgostei
6- Gostei ligeiramente
7- Gostei
8- Gostei muito
9- Gostei muitíssimo

Código da amostra _____ **Nota** _____
Código da amostra _____ **Nota** _____
Código da amostra _____ **Nota** _____

Você consumiria este produto? _____

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO DO SORO DE LEITE

A Figura 7 mostra as médias em log de determinações realizadas em duplicatas para bactérias lácticas após a fermentação do soro de leite com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

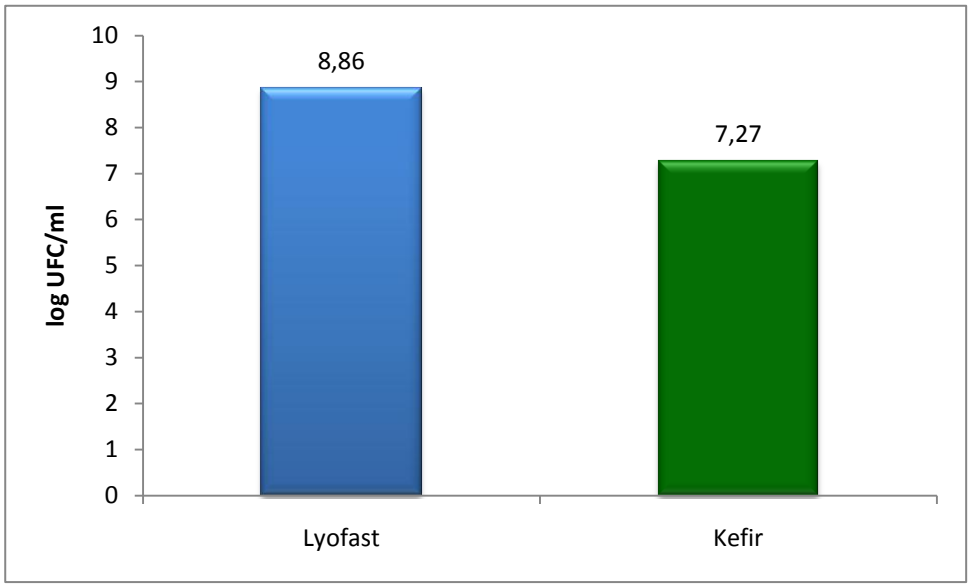

Figura 7 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de bactérias lácticas após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

De acordo com a Figura 7, é possível verificar que as bactérias lácticas da cultura liofilizada tiveram um crescimento melhor no soro de leite do que as bactérias lácticas presentes nos grãos de Kefir, apresentando diferença significativa a nível de 95% de confiança (*p=0,05*).

A Figura 8 mostra as médias em log de determinações realizadas em duplicatas para os *Lactococcus* spp. após a fermentação do soro de leite com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

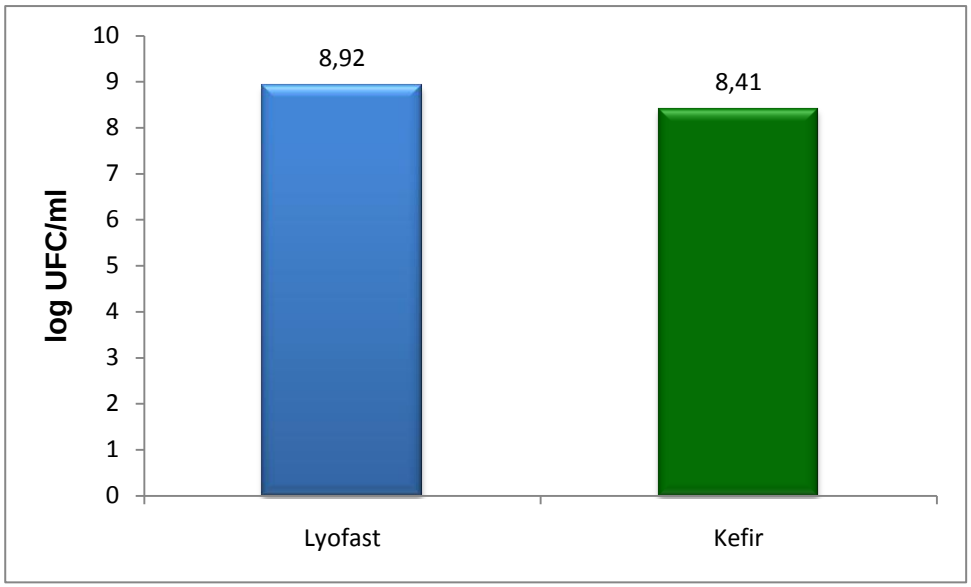

Figura 8 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para as células viáveis de *Lactococcus* spp. após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

De acordo com a Figura 8, é possível verificar que para *Lactococcus* spp. houve diferença significativa a nível de 95% de confiança (*p=0,05*) entre as culturas utilizadas, sendo a Lyofast a que apresentou um maior crescimento do *Lactococcus* spp.

A Figura 9 mostra as médias em log de determinações realizadas em duplicatas para as leveduras após a fermentação do soro de leite com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

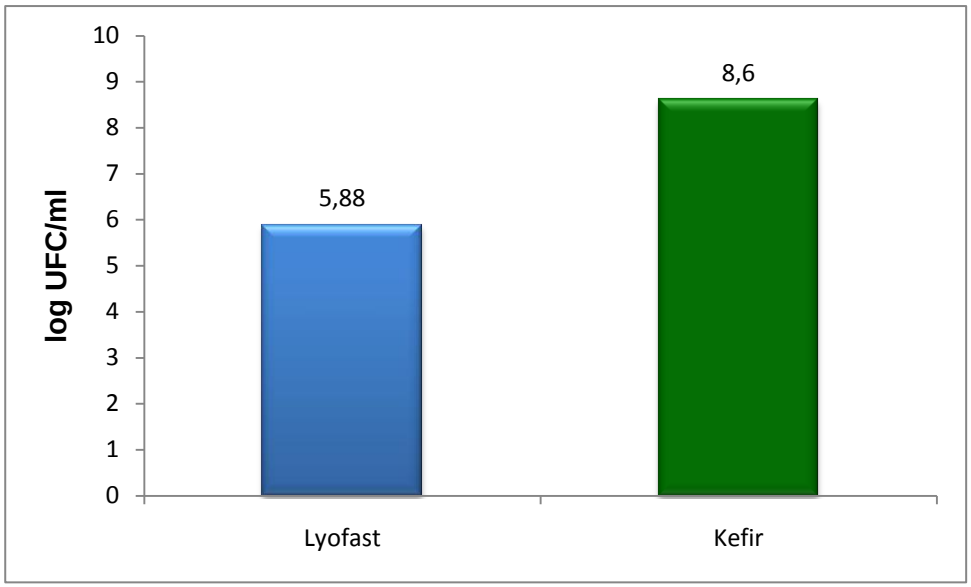

Figura 9 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para as células viáveis de leveduras após a fermentação do soro de leite (7% p/v) com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

De acordo com a Figura 9, é possível verificar que na fermentação do soro de leite, houve diferença significativa a nível de 95% de confiança (*p=0,05*) entre as culturas utilizadas, sendo possível verificar uma maior quantidade de leveduras nos grãos de Kefir do que na cultura liofilizada.

Estes resultados estão de acordo com Bissoli (2005), onde é citado que o Kefir apresenta uma contagem total variando em torno de 10^7 – 10^9 UFC/ml quando fermentado em leite e de 10^6-10^8 UFC/ml quando fermentado em soro de leite, devido a presença de mais nutrientes no leite integral, necessários ao crescimento das bactérias e leveduras do Kefir. A fermentação ocorre por ação de bactérias láticas, leveduras e bactérias produtoras de ácido acético e isto provoca uma diminuição do pH do meio. Os microrganismos utilizados na elaboração dos ingredientes simbióticos ficam contidos nos grãos de Kefir, uma massa de diferentes bactérias e leveduras embebida em uma matriz complexa de proteínas e carboidratos, a qual é recuperada ao final do processo fermentativo (FARNWORTH, MAINVILLE, 2003). A composição microbiológica e química do Kefir indica que ele é um produto probiótico complexo (FARNWORTH, 2005).

A Tabela 2 apresenta os valores de pH para o soro de leite fermentado com ambas culturas. Nela, é possível observar que houve pouca variação de pH entre as duas fermentações, não sendo encontrada diferença significativa a nível de 95% de confiança (*p=0,05*).

Tabela 2 - Média de determinações realizadas em duplicatas para análise de pH do soro de leite fermentado com a cultura liofilizada Lyofast MT 036 LV e com os grãos de Kefir.

Cultura	Soro fermentado
Lyofast	4,17 ± 0,01
Kefir	4,23 ± 0,03

Por mais que não tenha sido constatada diferença estatística, notou-se um pH menor na fermentação com a cultura Lyofast, possivelmente devido ao fato do maior crescimento de bactérias lácticas presentes na cultura liofilizada.

A figura 10 mostra os aspectos do soro fermentado com as culturas de grãos de Kefir (A) e Lyofast MT 036 LV (B) a 25°C por 24 horas.

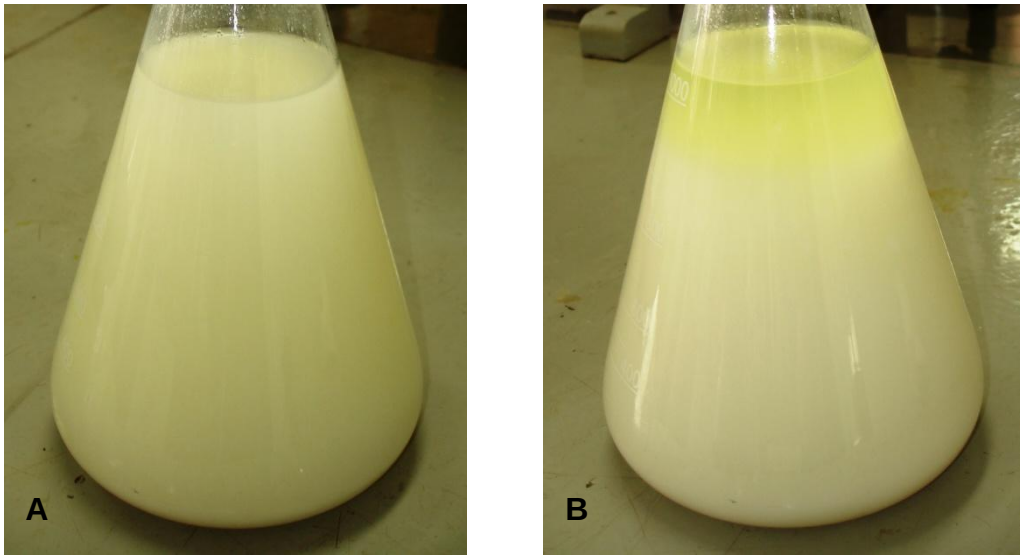

Figura 10 - Soro de leite fermentado com as culturas de grãos de Kefir (A) e Lyofast MT 036 LV (B)) a 25°C por 24 horas.

5.2 ADIÇÃO DO BAGAÇO DE LARANJA E SOBREVIVÊNCIA À SECAGEM

Após o processo de fermentação, foi adicionado o bagaço de laranja ao soro fermentado, na proporção de 1:1, funcionando como fonte de fibras, aroma e sabor, e auxiliando no processo de secagem.

A figura 11 apresenta o aspecto do bagaço de laranja (subproduto), após a

esterilização a 121°C por 15 minutos em autoclave, pronto para ser misturado ao soro de leite fermentado com as culturas de grãos de Kefir e Lyofast MT 036 LV.

Figura 11 - Bagaço de laranja esterilizado a 121°C por 15 minutos.

O bagaço de laranja proporciona alto valor de pectina, principal fibra encontrada no mesmo. Esta, quando ingerida, encontra-se principalmente depositada na parede celular das células intestinais, atuando como material de ligação entre as células e as bactérias presentes no cólon (MANDERSON *et al.* 2005). A pectina é considerada uma fibra com características espessante, estabilizante (BOBBIO E BOBBIO, 1995) e também prebiótica (FOOKS, FULLER, GIBSON, 1999).

A figura 12 relaciona o número total de células viáveis de bactérias lácticas em log recuperadas após a secagem nos ingredientes simbióticos fermentados com Kefir e cultura liofilizada.

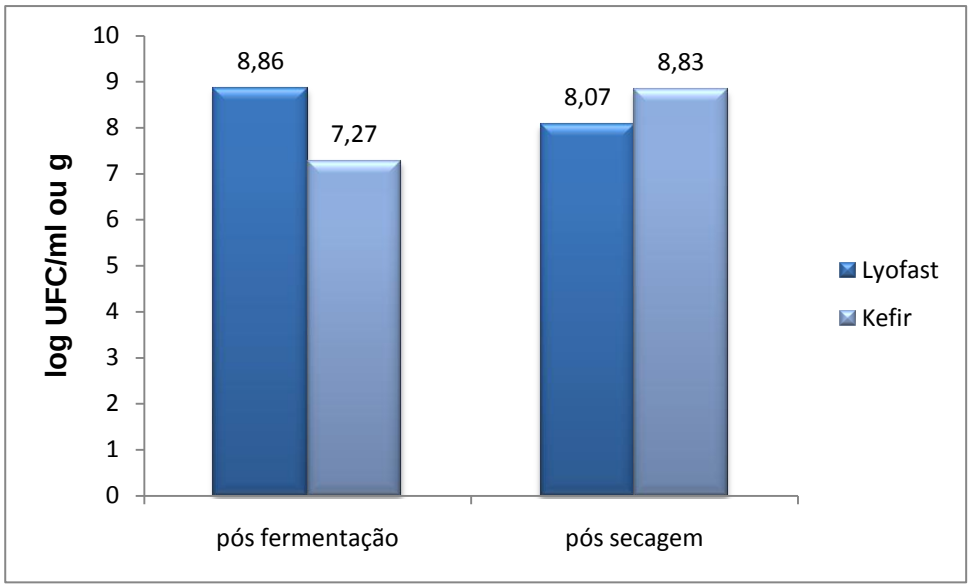

Figura 12 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de bactérias lácticas pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem.

De acordo com a figura 12, pode-se notar que houve uma diminuição de 0,79 ciclos log com a cultura Lyofast e um aumento de 1,56 ciclos log de bactérias lácticas no soro fermentado com Kefir. Foi observada diferença estatística a nível de 95 % de confiança (*p=0,05*) entre as culturas. Sendo a cultura de Kefir a que apresentou maior resistência ao processo de secagem.

A tabela 3 apresenta as concentrações de exopolissacarídeos encontradas depois dos processos de fermentação do soro de leite e adição do bagaço de laranja secagem.

Tabela 3 - Médias de determinações realizadas em duplicatas da concentração de exopolissacarídeos pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem.

Cultura	Soro fermentado	Pós Secagem
Lyofast	19,3 ± 0,1 mg/100g	20,2 ± 0,1 mg/100g
Kefir	24,8 ± 0,2 mg/100g	26,2 ± 0,2 mg/100g

Nota-se pela tabela 3, que houve um aumento na produção de exopolissacarídeos durante o processo de secagem. Estes atuam como protetores das células bacterianas, como pode-se notar nas contagens de células viáveis de bactérias acido lácticas e de *Lactococcus* spp depois do processo de secagem.

Alguns autores chegam a caracterizar os exopolissacarídeos secretados pelo Kefir, como substrato para microorganismos no intestino de hospedeiros, o que condiciona a caracterização dos exopolissacarídeos funcionarem como prebióticos (ASHWELL, 2001). Os exopolissacarídeos também têm alto valor para a tecnologia dos alimentos por aumentarem a textura e viscosidade de produtos (BROADBENT et al., 2003). A produção de exopolissacarídeos é aumentada conforme a temperatura de fermentação se altera (ABRAHAM, 1999). Frengova et al. (2002) identificaram que a presença de leveduras aumenta em quase duas vezes a produção do quefirano, exopolissacarídeo produzido pelas bactérias dos grãos Kefir. De acordo com os autores citados explicam-se os resultados encontrados neste estudo, onde pode-se verificar que houve um aumento na produção de exopolissacarídeos após o processo de secagem, sendo a maior quantidade encontrada na fermentação pela cultura dos grãos de Kefir, que apresenta uma maior quantidade de leveduras.

A figura 13 apresenta a viabilidade em log de células de *Lactococcus* spp. recuperadas após a secagem.

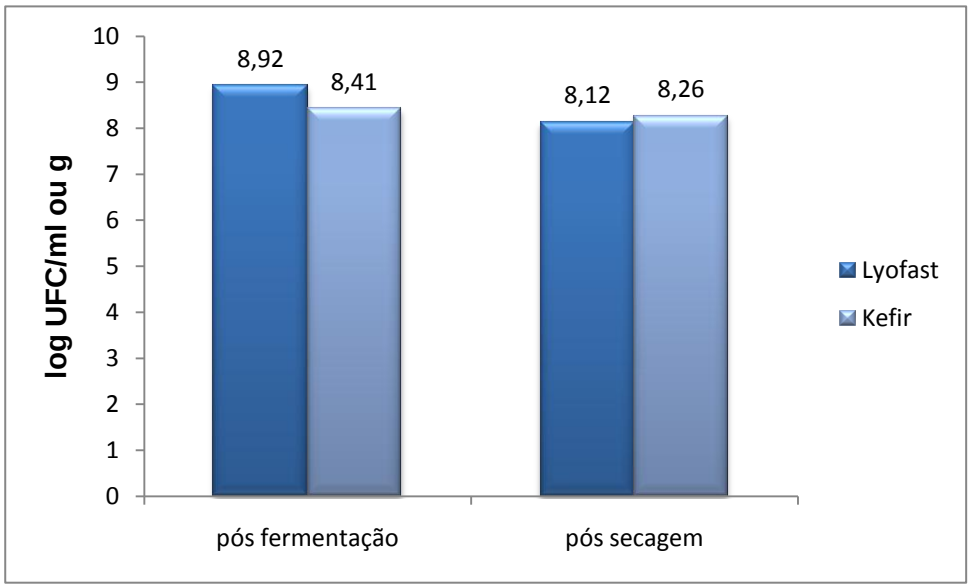

Figura 13 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas para células viáveis de *Lactococcus* spp. pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem.

De acordo com a figura 13, é possível notar diferença significativa a nível de 95 % (*p=0,05*) na recuperação de ambas culturas. A cultura Lyofast apresentou uma queda de 0,8 ciclos log quando comparada a cultura de Kefir (queda de 0,15 ciclos log).

A figura 14 demonstra a viabilidade em log de células de leveduras recuperadas após a secagem.

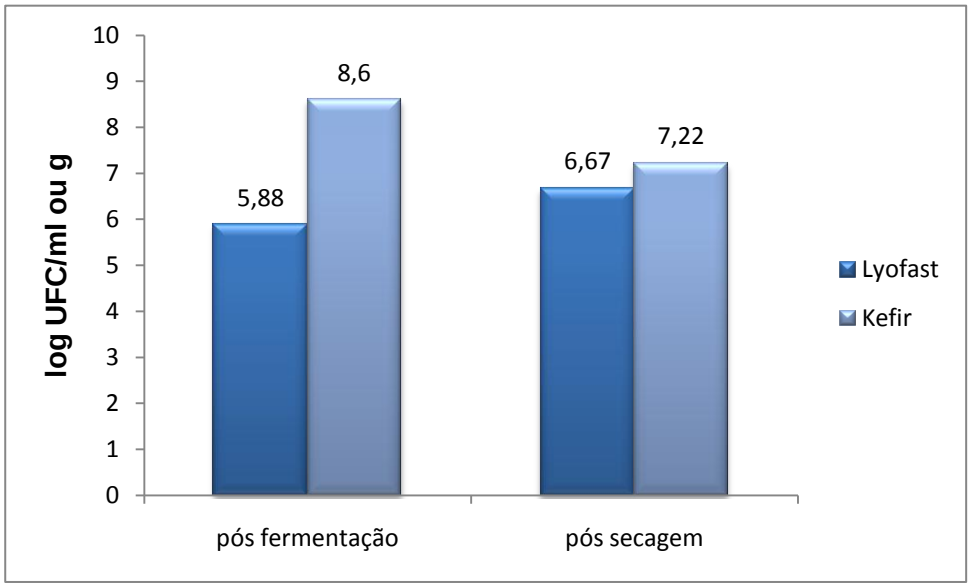

Figura 14 - Médias em log de determinações realizadas em duplicatas de Leveduras pós fermentação do soro de leite e pós adição do bagaço de laranja e secagem.

De acordo com a figura 14, verifica-se diferença significativa a nível de 95 % de confiança (*p=0,05*) entre as duas culturas após a secagem, sendo verificado um aumento de 0,79 ciclos log de células viáveis de leveduras na cultura Lyofast e uma queda de 1,38 ciclos log de células viáveis nos grãos de Kefir.

A tabela 4 mostra os valores de pH do bagaço in natura, do soro de leite fermentado e dos ingredientes simbióticos.

Tabela 4 - Médias de determinações realizadas em duplicata para o pH das culturas fermentadas no soro de leite antes e após a adição do bagaço de laranja no processo de secagem.

Cultura	Bagaço de Laranja	Soro fermentado	Soro + Bagaço pós secagem
Lyofast	8,0 ± 0,00	4,17 ± 0,01	4,99 ± 0,01
Kefir	8,0 ± 0,00	4,23 ± 0,03	5,07 ± 0,01

Segundo a tabela 4, constata-se um aumento no valor do pH após a secagem em ambas culturas. Este aumento é devido à adição do bagaço de laranja que apresenta um pH de 8,0, relativamente alto em relação ao soro fermentado.

A tabela 5 mostra o percentual de pectina do bagaço in natura e após sua adição ao soro fermentado para o processo de secagem.

Tabela 5 - Percentual de pectina do bagaço de laranja in natura e após sua adição ao soro fermentado com os grãos de Kefir e com a cultura Lyofast MT 036 LV para o processo de secagem.

Cultura	Bagaço in natura	Bagaço + soro pós secagem
Kefir	19,391 %	15,304 %
Lyofast	19,391 %	16,621 %

Observando a tabela 5, é possível notar que houve um consumo da pectina nas duas culturas, possivelmente devido a sua utilização pelas bactérias presentes, que a aproveitaram como substrato.

A utilização da pectina por microorganismos, foi observado por Sunvold et al. (1995), que observaram variações significativas na produção de ácidos graxos voláteis, quando a pectina foi utilizada como substrato de fermentação por diferentes inóculos fecais (gato, cão, cavalo, humano e suíno), sugerindo que as populações microbianas das diversas espécies animais diferem não só em composição, como também, apresentam peculiaridades quanto às rotas metabólicas para a fermentação de um mesmo substrato. Neste estudo, eles constataram que, quando utilizada a pectina, os microorganismos fermentadores produziram quantidades significativamente variáveis de acetato, propionato, butirato e lactato em comparação com a fermentação realizada sem o uso da pectina.

A tabela 6 apresenta os valores de umidade do bagaço in natura, do soro fermentado acrescido de bagaço de laranja e após o processo de secagem (ingredientes simbióticos).

Tabela 6 - Médias de determinações realizadas em duplicatas para o percentual de umidade do bagaço in natura, do soro de leite fermentado acrescido de bagaço de laranja e do ingrediente simbiótico para as diferentes culturas.

Cultura	Bagaço in natura	Soro fermentado + bagaço	Pós Secagem
Lyofast	69,74 ± 0,05 %	91,53 ± 0,04 %	4,67 ± 0,01 %
Kefir	69,73 ± 0,05 %	92,24 ± 0,03 %	4,79 ± 0,00 %

È possível notar que o valor da umidade e da Aw dos ingredientes simbióticos é baixo (aw = 0,411) que favorece a vida de prateleira dos ingredientes simbióticos, pois a atividade de água baixa funciona como uma barreira para o aparecimento/contaminação de bactérias patogênicas e deteriorantes.

A atividade de água (aw) baseia-se na quantidade de água livre, que não se encontra comprometida com as moléculas constituintes do produto e que está disponível para as reações físicas, químicas e biológicas (WELTI e VERGARA, 1997). No caso de um substrato que apresente baixa atividade de água, há interrupção do metabolismo dos microorganismos presentes, inibindo o seu desenvolvimento e/ou reprodução.

Segundo Bell e Labuza (1992), para muitos alimentos o crescimento microbiano é prevenido com aw entre 0,6-0,7. Portanto para o caso dos ingredientes simbióticos desenvolvidos neste estudo, que apresentaram um valor de aw = 0,411, o crescimento microbiano é praticamente nulo, evitando desta forma o processo de contaminação e/ou crescimento de patógenos.

A figura 15 mostra os aspectos do ingrediente simbiótico desidratado depois dos processos de fermentação do soro de leite e secagem.

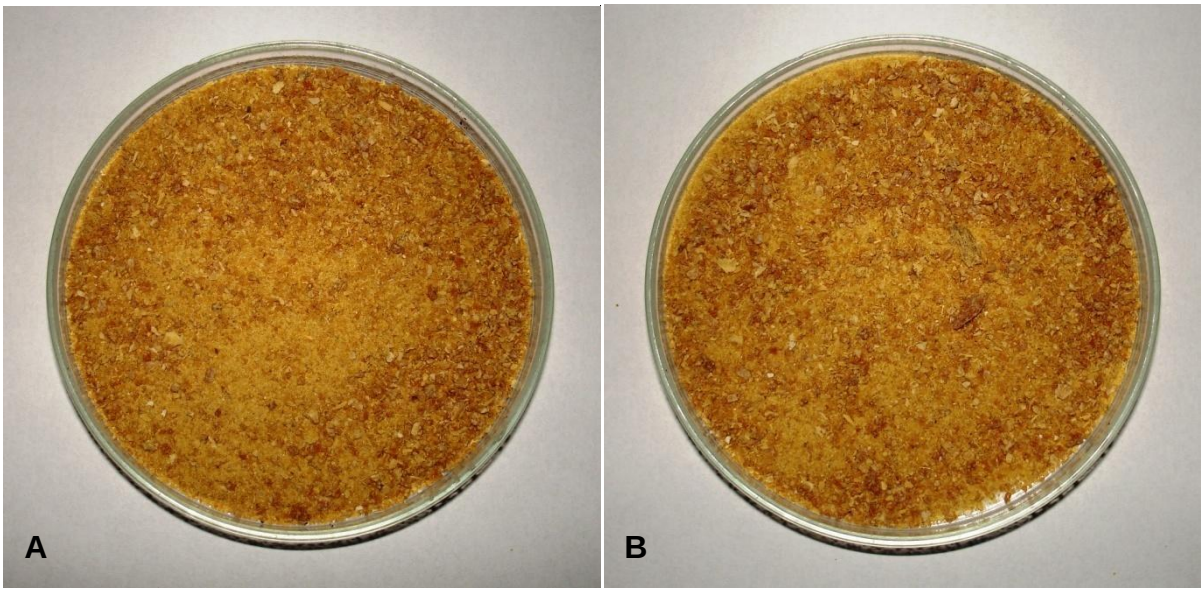

Figura 15 - Ingrediente simbiótico desidratado fermentado com grãos de Kefir (A) e com a cultura Lyofast MT 036 LV (B).

De acordo com a figura 15, é possível observar que os ingredientes simbióticos apresentaram aparência similar. Após a moagem, os ingredientes simbióticos ainda apresentaram algum aspecto granular, principalmente devido ao fato da pectina ser muito higroscópica, o que favorece a aglomeração dos grãos (EASTWOOD, 1992).

5.3 ARMAZENAMENTO

A viabilidade de células de bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras do ingrediente simbiótico foi verificada durante 3 meses de armazenamento e os resultados expressados abaixo.

A figura 16 demonstra a sobrevivência de bactérias lácticas durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico.

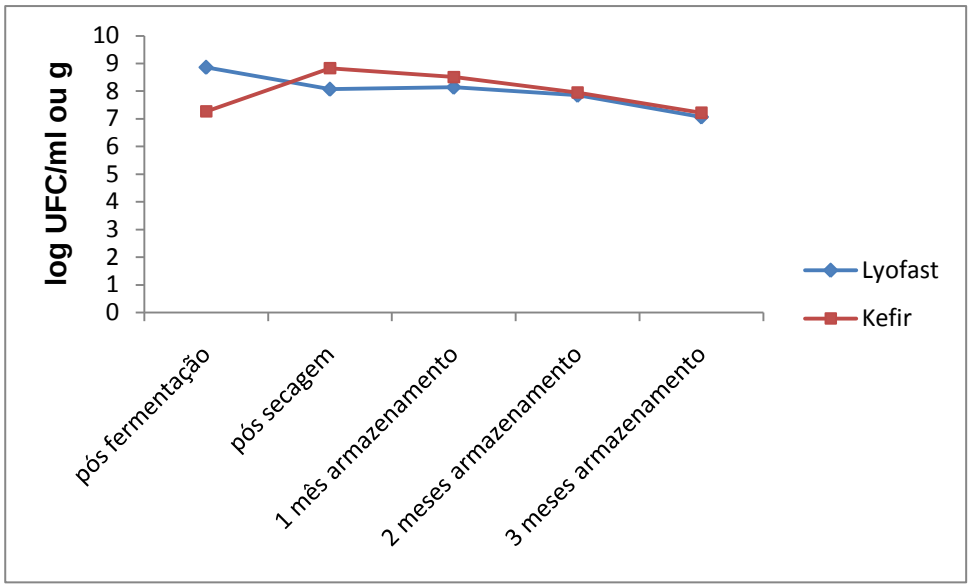

Figura 16 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de bactérias lácticas durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV.

De acordo com a figura 16, verifica-se que desde o início do processo fermentativo, as bactérias lácticas da cultura Lyofast tiveram uma diminuição de 1,79 ciclos log, alcançando ao final do período de armazenamento 7,07 ciclos log. Já as bactérias lácticas da cultura de Kefir apresentaram uma sobrevivência maior, porém sem diferença estatística a nível de 95 % de confiança (*p=0,05*), tendo uma diminuição de apenas 0,05 ciclos log, atingindo no final do armazenamento 7,22 ciclos log.

A figura 17 mostra a sobrevivência de *Lactococcus* spp. durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico.

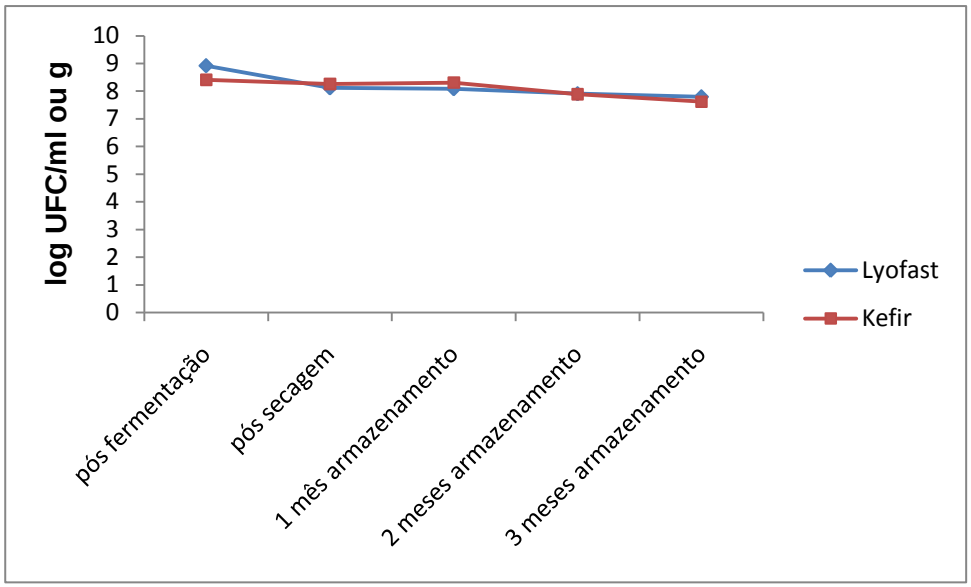

Figura 17 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de *Lactococcus* spp. durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV.

Na figura 17, observa-se que desde o início do processo fermentativo, os *Lactococcus* spp. da cultura Lyofast tiveram uma diminuição de 1,12 ciclos log, alcançando ao final do período de armazenamento 7,8 ciclos log. Já os *Lactococcus* spp. da cultura de Kefir apresentaram uma sobrevivência menor, porém sem diferença estatística a nível de 95 % de confiança ($p=0,05$), tendo uma diminuição de 0,79 ciclos log, atingindo no final do armazenamento 7,62 ciclos log.

A figura 18 representa a viabilidade das leveduras durante 3 meses de armazenamento dos ingredientes simbióticos.

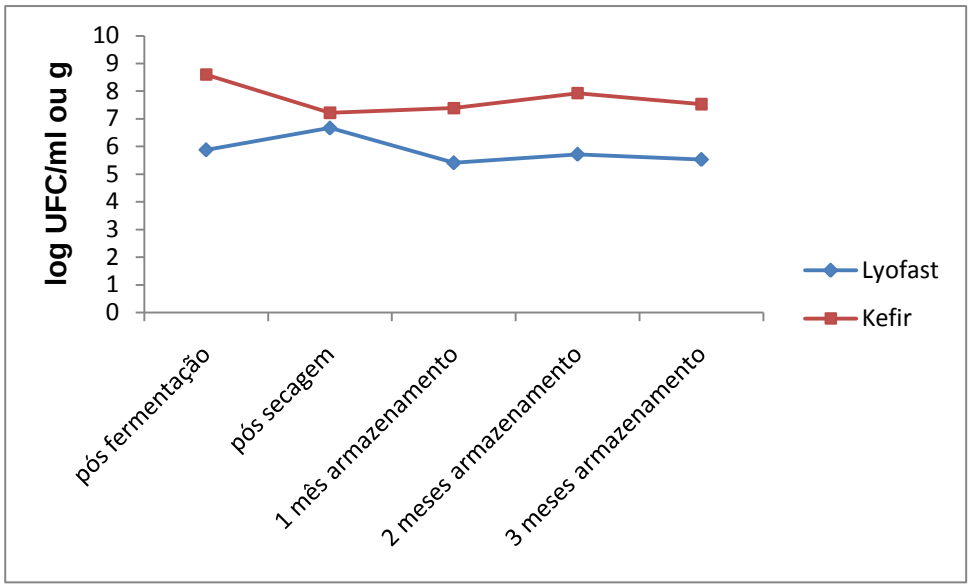

Figura 18 - Média de duas determinações em log para a viabilidade de leveduras durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico fermentado com Kefir e cultura Lyofast MT 036 LV.

Segundo a figura 18, as leveduras da cultura Lyofast tiveram uma diminuição de 0,35 ciclos log, alcançando ao final do período de armazenamento 5,53 ciclos log. Já as leveduras da cultura de Kefir apresentaram uma sobrevivência menor, com diferença estatística a nível de 95 % de confiança (*p=0,05*), tendo uma diminuição de 1,07 ciclos log, atingindo no final do armazenamento 7,53 ciclos log.

A tabela 7 mostra os valores de exopolissacarídeos encontrados nos ingredientes simbióticos fermentado com Kefir e Lyofast MT 036 LV ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 7 - Médias de determinações realizadas em duplicatas da concentração de exopolissacarídeos pós fermentação do soro de leite, pós adição do bagaço de laranja e secagem e durante 3 meses de armazenamento do ingrediente simbiótico.

Cultura	Soro fermentado	Pós Secagem	1 mês	2 meses	3 meses
Lyofast	21,3 mg/100g	22,7 mg/100g	22,5 mg/100g	22,6 mg/100g	20,9 mg/100g
Kefir	24,8 mg/ 100g	26,2 mg/100g	25,9 mg/100g	25,7 mg/100g	23,4mg/100g

Na tabela 7, pode-se notar que houve um consumo do exopolissacarídeo produzido pós fermentação e secagem durante o processo de armazenamento. Conforme citado anteriormente, os exopolissacarídeos secretados pelos mesmos

presentes no Kefir podem agir como substrato para os microorganismos, atuando neste caso como prebióticos (ASHWELL, 2001).

5.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS, *Lactococcus* spp., LEVEDURAS E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.4.1 Contagem de bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras na barra de cereais

Segundo a legislação vigente Anvisa (ANVISA, 2007), para que um produto contendo microorganismos probióticos possa utilizar a alegação de que "contribui para o equilíbrio da flora intestinal", este deve conter de 10^8-10^9 UFC na porção diária do produto.

Após a adição dos ingredientes simbióticos desidratados obtidos no trabalho às barras de cereais correspondente as amostras (Lyofast – amostra 1 e Kefir – amostra 2), foram realizadas as contagens de células viáveis de bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras de modo a garantir que a barra de cereais apresentasse a quantidade necessária de probióticos na porção fornecida aos consumidores (10g).

A tabela 8 representa os resultados obtidos para as análises em questão.

Tabela 8 - Análise de bactérias lácticas, *Lactococcus* spp. e leveduras presente na porção de barra de cereais (10g) fornecida aos consumidores.

Microorganismos	Lyofast (amostra 1)	Kefir (amostra 2)
Bactérias Lácticas	3,6 x 10^7 UFC/g	7,2 x 10^7 UFC/g
***Lactococcus* spp.**	5,4 x 10^7 UFC/g	6,42 x 10^7 UFC/g
Leveduras	1,7x 10^7 UFC/g	2,3 x 10^6 UFC/g

Segundo a tabela 8 pode-se comprovar que o consumo de 10 g da barra de cereais seria o ideal para corresponder à necessidade diária de microorganismos probióticos segundo a legislação vigente.

5.4.2 Análise microbiológica para microorganismos indicadores e patogênicos na barra de cereais

Para garantir a qualidade e segurança da barra de cereais utilizada na análise sensorial (amostras 1, 2 e 3), foi realizada a análise microbiológica de microorganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitárias, segundo a resolução – RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA).

A tabela 9 representa os resultados obtidos para as análises em questão.

Tabela 9 - Análise de microorganismos patogênicos e indicadores e respectivos padrões microbiológicos na barra de cereais exigidos pela legislação vigente para "Leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados em pó"

Microorganismos	**Lyofast Amostra 1**	**Kefir Amostra 2**	**Padrão Amostra 3**	**Limites segundo RDC n°12**
Coliformes a 45ºC	-	-	-	4 NMP
Staphylococcus aureus	$< 1,0 \times 10^1$ UFC/g	$< 1,0 \times 10^1$ UFC/g	$< 1,0 \times 10^1$ UFC/g	$1,0 \times 10^2$ UFC/g
***Salmonella* spp.**	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

De acordo com a tabela 9, verifica-se que os ingredientes simbióticos fermentados com ambas culturas apresentaram conformidade segundo a legislação vigente para o consumo humano, não havendo nenhum tipo de contaminação pelos manipuladores ou oriundo da matéria prima.

5.5 ANÁLISE SENSORIAL

As amostras foram analisadas por 89 consumidores não treinados, utilizando-se o questionário de escala hedônica de nove pontos.

O resultado de aceitação, conforme mostra a Tabela 10, mostrou que as médias de aceitação das 3 amostras situaram-se próximas à categoria "gostei ligeiramente/gostei" da escala hedônica

Tabela 10 - Médias de aceitação do teste de escala hedônica para as amostras 1, 2 e 3.

Amostra	Médias de aceitação*
Lyofast (Amostra 1)	6,9[a]
Kefir (Amostra 2)	6,73[a]
Padrão (Amostra 3)	6,97[a]

* Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si p = 0,05.

A tabela 10 mostra que os ingredientes simbióticos obtiveram uma nota muito parecida com a amostra feita com a formulação padrão sem a adição dos ingredientes simbióticos, sem diferença estatística a nível de 95 % de confiança (*p=0,05*). Todas as amostras testadas apresentaram nota de aceitação acima da média.

As respostas individuais do homem, no gostar ou não de um alimento, e os fatores que influenciam essa preferência são extremamente variados. Os hábitos alimentares são também vistos como respostas do comportamento cultural existente, porém esses aos poucos podem ser mudados (RORATO et al., 2006).

O sabor, um fator importante na escolha e aceitação de alimentos, é uma resposta integrada principalmente à sensação do gosto e do aroma. O gosto é atribuído aos compostos não voláteis nos alimentos, tais como, açúcares, sais, cafeína e ácidos. O aroma é bem mais complexo e é devido a dezenas e centenas de substâncias voláteis, representantes de várias classes químicas. Para cada pessoa tem-se uma avaliação diferente, é desta forma que se analisa a média das notas (AMERINE et al., 1965).

Segundo a Cocamar (2008), além do suco, a laranja oferece o óleo essencial d-limoneno, rico composto aromático que carrega consigo o aroma e o sabor da fruta. Encontrado na casca da fruta, ele preserva a cor alaranjada da mesma e o aroma da fruta. Este composto confere sabor e aroma aos produtos da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, servindo também como base para a elaboração de outros aromas.

Segundo os provadores das amostras 1 e 2, ambas apresentavam aroma e sabor acentuado de laranja, agradável de acordo com a maioria. Entretanto, alguns consumidores notaram um forte sabor residual amargo. Estes resultados são

semelhantes aos encontrados no trabalho de Della Torre *et al*. (2003), onde foi analisada a aparência, aroma e sabor de amostras de suco de laranja natural processado em nove diferentes condições de temperatura de pasteurização. Neste estudo, verificou-se a presença do sabor amargo por alguns provadores.

6 CONCLUSÕES

O soro de leite foi favorável como meio de cultivo para as bactérias lácticas e *Lactococcus* spp. de ambas culturas. No entanto, para as leveduras da cultura Lyofast MT 036 LV o soro de leite não permitiu igual desenvolvimento para as leveduras presentes nos grãos de Kefir.

Após a adição do bagaço de laranja ao soro fermentado e posterior secagem, não foi observada alteração na viabilidade celular de nenhum dos microorganismos presentes nas culturas, sendo verificado um aumento das bactérias lácticas do Kefir e também das leveduras da cultura Lyofast MT 036 LV.

Durante o armazenamento, ambas culturas mostraram-se promissoras para o desenvolvimento dos ingredientes simbióticos, mantendo viáveis as bactérias lácticas e *Lactococcus* spp. das culturas segundo os parâmetros exigidos pela legislação brasileira por 3 meses em temperatura ambiente.

Foi verificado que após o processo de secagem houve um aumento na concentração de exopolissacarídeos, os quais tiveram uma queda durante o armazenamento de 3 meses, provavelmente pelo próprio consumo dos microorganismos, que os utilizaram como substrato.

De acordo com os resultados pode-se notar, que o bagaço de laranja, por apresentar grande quantidade de fibras sendo a pectina a mais abundante, apresentou um papel importante na manutenção das células viáveis após o processo de secagem e posterior armazenamento.

Os simbióticos desenvolvidos aderidos a barra de cereais e a formulação padrão apresentaram diferenças sensoriais significativas, porém médias de aceitação muito semelhantes, todas com elevado índice de aceitação.

Conclui-se que os ingredientes simbióticos desenvolvidos no presente trabalho podem ser uma alternativa economicamente viável para a utilização dos subprodutos testados e para a diversificação de produtos com propriedades funcionais.

REFERÊNCIAS

ABECITRUS. **Informativo da Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. 21 de Agosto de 2008. Disponível em <http://www.abecitrus.com.br/subprodutos_br.html>. Acesso em 21 de Agosto 2008.

ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de; Characterization of Kefir grains grown in cow's Milk and in soya Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 2, p. 327-333, 1999.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo de minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, p. 424-428, 2002.

ANFITEATRO, D.N. **Kefir, a probiotic gem cultured with probiotic jewels***.* 1ª Edição, South Australia, Tranmere North Post Office, 37 p, 2000.

ASHWELL, M. Functional Foods: A simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. **Public Health Nutrition**, v. 4, p. 859-862, 2001.

BELL, L. N.; LABUZA, T. P. Composition influence on the pH of reduced-moisture solutions. **Journal Food Science**. 57: 732-734, 1992.

BISSOLI, M. C. Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão de ração suplementada com quefir, 2005, 48 p, Dissertação (Mestrado – Ciência Animal), Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas – MG.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química de Alimentos**. 2ª Edição, São Paulo, Editora Varela, 223 p, 1995.

BRASHEARS, M. M.; DURRE, W. A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **Journal of Food Protection.** v. 62, p. 1336-1340, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária** - ANVISA. Resolução - RDC n.° 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_polpa.htm>. Acesso em 03/09/2008.

BROADBENT, J. R. et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus:* a review. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 407-423, 2003.

CALIXTO, F.S. Fibra dietética de manzana: hacia nuevos tipos de fibras de alta calidad. **Alimentaria**, v.4, n.1, p.57-61, 1993.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F.; VITALI, A.; SCHIMIDT, F. L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.11, p.1123-1128, 2005.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.30, p.268-282, 1999.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal.** v. 13, p. 191-200, 2003.

CHITARRA, A.B. **O marmelo (*Cydonia vulgaris*, L) e sua polpa no decorrer do processo de maturação: características bromatológicas**. 1973. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COCAMAR. Informativo da Cooperativa agroindustrial COCAMAR. 2008. Disponível em <http://cocamar.com.br/Portal/industria/produtos_laranja.html>. Acesso em 19 de junho de 2010.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, v.4, p. 733-739, 2002.

DELLA TORRE, J. C. M.; RODAS, M. A. B.; BADOLATO, G. G.; TADINI, C. C. Perfil sensorial e aceitação de suco de laranja pasteurizado minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 105-111, 2003.

DINIZ, R.O.; PERAZZO F.F.; CARVALHO, J.C.T.*; SCHNEENEDORF, J.M. Atividade antiinflamatória de Kefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**., v. 13, p. 19-21, 2003.

DUWAT, P.; CESSELIN, B.; SOURICE, S.; GRUSS, A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 55, p. 83-86, 2000.

EASTWOOD, M. A. The physiological effect of dietary fiber: an update. **Annual Review of Nutrition**, v. 12, p. 19-35, 1992.

EL NAWAWI, S. A.; SHEHATA. F. R. Extracion of pectin of Egyptian Orange peel: factors affecting the extration. **Biological Wastes**, v. 20, p. 281-290, 1987.

ESPINOZA, Y. R.; NAVARRO, Y. G. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin,** v.2, n.1, p.1-17, 2005.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, **Handbook of fermented functional foods**. 2ª Edição, Estados Unidos, Editora CRC PRESS, 390 p, 2003.

FENNEMA, **Food chemistry**. 4ª Edição, New York, Editora CRC PRESS**,** 1160p, 2007.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. **Verlag der Zeitschrift für Natuforschung**, v. 57, p. 805-810, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food outlook** n. 2, 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/j8126e/j8126e11.htm>. Acesso em: 28 de outrubro de 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria***,* 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2008.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **Internationl Dairy Journal**, v.9, p.53-61, 1999.

FOX, P. **Food Enzymology.** v. 1, New York, Editora Elsevier Science Publishers Ltd, 1.108 p, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology***,* v.66, p.365-78, 1989.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition,** v.125, p.1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products. A review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science***,* v.72, p.2483-2494, 1989.

GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H., STEELE, **Applied Dairy Microbiology***,* v. 2, p. 327-343, 2001.

GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. Instability of *Lactobacilus acidophilus* in yogurt*.* **Journal of Dairy Science**, v.60*,* p.1395-1398, 1977.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition***,* v.80, p.203-207, 1998.

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

HAUPTLI, L.; LOVATOO, P. A.; SILVA, J. H . S.; GARCIA, G. G.; JÚNIOR, B. S. B.; OLIVEIRA, J. L. S. Níveis de soro de leite integral na dieta de leitões na creche. **Ciencia rural**, vol. 35, p. 1161-1165, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para a análise de alimentos**. 4ª Edição, Brasília, Ministério da saúde, 2005.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganismos: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, p. 321-326, 2008.

KALE, P.N.; ADSULE, P.G. Citrus. In: SALUNKHE, D. K.; KADAM, S. S. **Handbook of fruit Science and technology**. New York, p. 39-65, 1995.

KIM, H.S., GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science***,* v.66, p.959-966, 1983.

KOVACS, D. J.; BERK, T. Recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis treated with *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in combination with antibiotic therapy: a case report. **Journal of the American Board of Family Practice**. v. 13, p. 138-140, 2000.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; Ecology and yeasts. In: Kurtzman, C.P. Fell, **The Yeasts, A Taxonomic Study**. 4a Edição, Elsevier Science, Amsterdam, p. 21-30, 1998.

LEISNER, M. K.; VANCANNEYT, M.; GORIS, J.; CHRISTENSEN, H.; RUSUL, G. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. Nov., a new lactic acid

bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. International Journal of **Systematic and Evolutionary Microbiology,** V. 50, P. 19-24, 2000.

LOPES, F.F., TROMBIN, V.G., FAVA, B.B. e BRUGNARO, R. Perspectivas da Cadeia Produtiva da Laranja no Brasil. 89 p. 2006. Disponível em: < http://www.fundace.org.br/arquivos_diversos/agenda_estrategica/Desafios_Citrus_Jank_23_Nov.pdf>. Acesso em: 16 de setembro de 2009.

MACFARLANE GT, CUMMINGS JH. Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? **British Medical Journal,** v. 171, p. 999-1003, 1999.

MANDERSON, K., PINART, M., TUOHY, K. M., GRACE, W. E., HOTCHKISS, A. T., WIDMER, W., YADHAV, M. P., GIBSON, G. R., RASTALL, R. A. In Vitro Determination of Prebiotic Properties of Oligosaccharides Derived from an Orange Juice Manufacturing By-Product Stream. **Environmental Microbiology,** v. 71, p. 8383-8389, 2005.

MANSOUR-GHANAEI, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World Journal of Gastroenterology**. v. 9, p. 1832-1833, 2003.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MICKE, P.; BEEH, K.M.; BUHL, R. Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **European Journal of Nutrition**, v.41, p.12-18, 2002.

MIYOSHI, A.; ROCHAT, T.; GRATADOUX, J. J.; LOIR, Y. L.; OLIVEIRA, S. C.; LANGELLA, P. Oxidative stress in *Lactococcus lactis.* **Genetics and Molecular Research,** v. 2, p. 348-359, 2003.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid

bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 38, p. 13-126, 1999.

NAIDU, A.S., CLEMENS, R.A. Probiotics spectra of lactic acid bacteria (LAB) In: NAIDU, A.S. **Natural food Antimicrobial Systems.** p.431-462, 2000.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; CHEN, X. B.; MCINTOSH, F. M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in theier effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**. v. 73, p. 1811-1818, 1995.

OKSANEN, P., SALMINEN, S., SAXELIN, M., HÄMÄLÄINEN P., IHANTOLA-VORMISTO, A., MUURASNIEMI-ISOVIITA, L., NIKKARA, S., OKSANEN, T., PÖRSTI, T., SALMINEN, E., SIITONEN, S., STUCKEY, H., TOPPILA, A., VAPAATALO, H. Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. **Annals of Medicine**, v.22, p.53-56. 1990.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; v. 38, p.1-21, 2002.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefiran, na exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. **Food hydrocolloids**, v. 23, p. 684-690, 2008.

POSTERATO, B.; SANQUINETTI, M.; ROMANO, L.; TORELLI, R.; NOVARESE, L.; FADDA, G. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 2950394.

POURCHET-CAMPOS, M.A. Fibra: a fração alimentar que desafia os estudiosos. **Alimentos e Nutrição,** v.2, p.53-63, 1990.

RABIU B.A., JAY A.J., GIBSON G.R., RASTALL R.A. Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β-Galactosidases from Bifidobacterium Species. **Applied and Environmental Microbiology**. , v. 67, p.

2526-2539, 2001.

RASTALL R.A.; MAITIN V. Prebiotics and synbiotics: Towards the next generation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 490-496, 2002.

ROBERFROID M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-110, 2002.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.406-409, 2001.

RORATO, F.; DEGÁSPARI, C. H.; MOTTIN, F. Avaliação do nível de conhecimento de consumidores de produtos diet e light que frequentam um supermercado de Curitiba. 2006. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/academica/article/view/9011/6312>. Acesso em: 19 de junho de 2010.

ROSANELI, C.F.; BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E.; SGARBIERI, V.C. Efficacy of a whey protein concentrate on the inhibition of stomach ulcerative lesions caused by ethanol ingestion. **Journal of Medicinal Food**, v.5, p.221-228, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria**. International Dairy Journal**, v. 12, p. 163-171, 2002.

RYBKA, S., FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts*.* **Food Australia***,* v.49, p.471-475, 1997.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 42, p. 53-69, 2006.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**,

v.61, p.91-99, 2003.

SANDINE, W.E., MURALIDHARA, K.S., ELLIKER, P.R., ENGLAND, D.C. Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. **Journal of Milk and Food Technology***,* v. 35, p. 691-702, 1972.

SANTOS, L. C; CANÇADO, I. C. Probióticos e Prebióticos: vale a pena incluí-los em nossa alimentação. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, n.1, 2009.

SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F.; ZAKRZEWSKA, E.I. The effects of feeding mannan oligosaccharide on Immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Science**, v.75, p.143, 1996.

SGARBIERI, V.C. Estudo da composição química do abacaxi**. Boletim do Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos**, v.7, p.37-50, 1966.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology,** v.10, p.411-417, 1999.

SILVA, N. DA; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 317p, 2001.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins – From “gutter-togold”. **Food Science Australia, International Dairy Journal**, v. 18, p. 695-704, 2008.

SOORO – CONCENTRADO INDUSTRIAL DE PRODUTOS LÁCTEOS LTDA. A Indústria – mercado. Disponível em: <http://sooro.com.br/meioAmbiente.php>. Acessado em: 21 de setembro 2009.

SOUZA, C. F. V. DE; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Evolução das características microbiológicas e físico-químicas durante a elaboração e maturação do queijo Serrano. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 260-266, 2003.

SOUZA, D. M. DE; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, p. 331-340, 2004.

SREEKUMAR, O., HOSONO, A. Immediate effect of *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* in coculture. **Journal of Dairy Science***,* v.83, p. 931-939, 2000.

SUNVOLD, G. D. et al., In vitro fermentation, beet pulp, citrus pulp, and citrus pectin using fecal inoculums from cats, dogs, horses, humans, and pigs and ruminal fluid from cattle. **Journal of Animal Science,** v. 73, p. 3639-3648, 1995.

TEJADA-SIMON, M.V., LEE, J.H., USTUNOL, Z., PESTKA, J.J. Ingestion of yogurt containing *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **Journal of Dairy Science,** v.*82*, p.649-680, 1999.

TRUM, B. **Yogurt, Kefir & Other Milk Cultures.** 1ª Edição, Connecticut, Editora Keats Pub, 117 p, 1973.

TUDO GOSTOSO. Informativo do site tudo gostoso. 2010. Disponível em: <http://tudogostoso.uol.com.br/receita/11167-barrinha-de-cereal-light.html>. Acesso em 20 de Janeiro de 2010.

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw Milk in various salt concentrations. **International Journal of Dairy Technology**. v. 54, p. 146-150, 2001.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff of bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VAUGHAN, E. E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteriathat produced antimicrobials. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 76,

p. 118-123, 1994.

VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal***,* v.10, p.271-275, 2000.

WELTI, J.; VERGARA, F. Atividade de água / Conceito y aplicación em alimentos com alto contenido de humedad. In: AGUILERA, J. M. Temas en Tecnologia de Alimentos. Santiago – Chile, v.1, p. 11-26, 1997.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. **Food Chemistry**. 2ª Edição, New York, p. 69-137, 1985.

WOHLT, J. E.; CORCIONE, T. J.; ZAJAC, P. K. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 1345-1352, 1998.

YÜKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish Kefirs with natural probiotic. **Lebensmittel Wissenschaft und Technoligie**, v. 37, p. 663-667, 2004.

ZIEMER, C.J., GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies*.* **International Dairy Journal***,* v.8, p.473-479, 1998.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo