



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciências e Qualidade dos Alimentos

THAÍS MARINI

**DESENVOLVIMENTO DE IOGURTES PROBIÓTICOS COM ELEVADO TEOR
PROTEICO POR ULTRAFILTRAÇÃO**

CAMPINAS

2020

THAÍS MARINI

**DESENVOLVIMENTO DE IOGURTES PROBIÓTICOS COM ELEVADO TEOR
PROTEICO POR ULTRAFILTRAÇÃO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluna: Thaís Marini

Orientadora : Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Coorientadora: Darlila Aparecida Gallina

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Thaís Marini e orientada pela Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

CAMPINAS

2020

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507

Biblioteca Central do ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

M339d Marini, Thaís.

Desenvolvimento de iogurtes probióticos com elevado teor proteico por ultrafiltração. Thaís Marini / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. - Campinas, SP: ITAL, 2020.

62 f.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco.

1. *Bifidobacterium animalis*. 2. Ultrafiltração. 3. Iogurte. 4. Alto teor proteico. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA). II. Marini, Thaís. III. Título.

Título em inglês: Development of probiotic yogurt with high protein content by ultrafiltration

Key-words: *Bifidobacterium animalis*, ultrafiltration, yoghurt, high protein content.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco (orientadora), Dra. Darlila Aparecida Gallina (coorientadora), Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (titular), Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga (titular).

Data da Defesa: 27/08/2020

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Thaís Marini, aprovada pela Comissão Julgadora em 27/08/2020.

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Presidente)

Dra. Darlila Aparecida Gallina
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(coorientadora)

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
Universidade estadual de Campinas
(titular)

Profa. Dra. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Universidade Federal da Paraíba
(titular)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo incentivo e amor.

À Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco pela orientação e apoio.

À Dra. Darlila Aparecida Gallina (CTC/ITAL), pela orientação, amizade e esforço incondicional na realização desse trabalho.

A todos os colegas do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC/ITAL) pelo apoio e à diretora Ana Lúcia da Silva C. Lemos por permitir a utilização dos laboratórios para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezzi (CPQBA/UNICAMP) pela disponibilidade e auxílio no uso do equipamento de ultrafiltração do laboratório de microbiologia do CPQBA.

À Dra. Elisabeth Harumi Nabeshima e à técnica Christiane Ruiz Mendes (CEREAL CHOCOTEC/ITAL), pelo auxílio na análise de textura.

À Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes (FCA/UNICAMP) pela doação da cepa de *Bifidobacterium animalis* e pelas sugestões na análise do probiótico.

A Danielle Cristina da Silva (CCQA/ITAL), pelo auxílio nas análises de proteína e aminoácidos.

À Dra. Paula de Paula Menezes Barbosa, pela amizade e ajuda na análise estatística.

Aos amigos de faculdade Milene Bianchi dos Santos e Marcelo Chuei Matsudo, por estarem sempre presentes e pelo constante apoio.

RESUMO

Iogurtes e leites fermentados são produtos de alto valor nutricional e excelentes veículos para microrganismos probióticos, considerados promotores de saúde. A ultrafiltração do leite é um processo físico capaz de concentrar proteínas para elevar o conteúdo de sólidos totais. Este projeto teve como objetivo aplicar o sistema de ultrafiltração (UF) no leite desnatado para concentrar as proteínas lácteas, aumentando seu potencial nutricional. Assim, foram obtidos o leite ultrafiltrado F1 com um fator de concentração (FC1) de 3 e o leite ultrafiltrado F2 com FC2 de 1,5. A partir dos retentados dos leites ultrafiltrados em diferentes fatores de concentração (FC1 e FC2) foram elaborados dois iogurtes adicionados de probiótico (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) e comparados a um iogurte padrão obtido através da fortificação do leite pasteurizado desnatado com leite em pó desnatado. Os iogurtes foram avaliados quanto à qualidade higiênico-sanitária, viabilidade microbiológica das bactérias *starter* e cultura probiótica, assim como composição físico-química (cinzas, umidade, proteína total e gordura), pH, acidez titulável, teor de aminoácidos totais e livres, textura, capacidade de retenção de água e sinérese. O iogurte obtido a partir do retentado FC1 apresentou maior teor de proteína (8,48%), quando comparado com o FC2 (6,01%) e ao controle (5,11%). Esta característica favoreceu uma melhor textura e menor sinérese do iogurte FC1 em relação aos demais. O aumento na acidez titulável (0,77g% a 1,48 g%), a redução no pH (4,72 até 4,19) e as diferenças observadas na composição físico-química dos iogurtes não impactaram na manutenção dos probióticos que se mantiveram em níveis elevados (8 log UFC/g) e viáveis durante todo o período de estocagem refrigerada (8±2°C). Em relação aos atributos de textura o iogurte FC1 mostrou maior firmeza e consistência quando comparado aos iogurtes FC2 e controle. Não houve diferença nos valores de elasticidade entre as amostras. O sistema de ultrafiltração com o maior fator de concentração dos sólidos foi considerado o mais apropriado para elaboração de iogurtes probióticos, pois naturalmente promoveu a obtenção de teores aumentados de proteína além do que suas características físico-químicas não impactaram na viabilidade dos probióticos e bactérias do iogurte.

Palavras-chave: *Bifidobacterium animalis*, ultrafiltração, iogurte, alto teor proteico.

ABSTRACT

Yoghurts and fermented milks are products with high nutritional value and excellent vehicles for probiotic microorganisms, considered health promoters. Ultrafiltration of milk is a physical process able to concentrate proteins to increase total solids content. This project aimed to apply the ultrafiltration (UF) in skimmed milk to concentrate milk proteins, increasing their nutritional potential. Thus, ultrafiltered F1 milk with a concentration factor (FC1) of 3 and F2 ultrafiltered milk with FC2 of 1,5 were obtained. From the retentates of ultrafiltered milks in different concentration factors (FC1 and FC2) two yogurts were added with probiotic (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) and compared to a standard yogurt obtained by fortification pasteurized skimmed milk with skimmed milk powder. Yogurts were evaluated by hygienic-sanitary, microbiological viability of *starter* bacteria and probiotic culture, as well as physico-chemical composition (ash, moisture, total protein and fat), pH, titratable acidity, total and free amino acids, texture, water holding capacity and syneresis. Yogurt obtained from retentate FC1 was the sample that had the highest increase in protein content (8,48%) when compared to the yogurt FC2 (6,01%) and control (5,11%). This characteristic favored a better texture and less syneresis of yogurt FC1 compared to the others. The increase in titratable acidity (0,77g% a 1,48 g%), the decrease in pH (4,72 to 4,19) and the differences observed in the physico-chemical composition of yogurts did not impact the maintenance of probiotics that remained viable (8 log UFC/g) throughout the refrigerated storage period (8±2°C). Regarding the texture attributes FC1 yogurt showed greater firmness and consistency when compared to FC2 yogurt and control. There was no difference in elasticity values between samples. Ultrafiltration system with highest concentration factor of solids was considered the most appropriate for the production of probiotic yogurts and naturally promoted increased levels of proteins and its physico-chemical characteristics did not impact the viability of probiotics and bacteria in yoghurt.

Key words: *Bifidobacterium animalis*, ultrafiltration, yoghurt, high protein content.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo principal	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Iogurte.....	3
3.2 Processo de ultrafiltração por membrana.....	7
3.3 Probióticos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 MATERIAL	13
4.1.1 Matéria-prima e ingredientes	13
4.1.2 Elaboração das formulações	14
4.2 MÉTODOS.....	14
4.2.1 Procedimento de ultrafiltração.....	14
4.2. 2 Elaboração dos iogurtes.....	15
4.2.3 Análises físico-químicas.....	16
4.2.4 Teor de aminoácidos totais e livres.....	18
4.2.5 Teor de minerais (Ca e P).....	18
4.2 .6 Análises físicas.....	18
4.2.7 Análises microbiológicas	20
4.2.8 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21

5.1 Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos leites e iogurtes.....	21
5.2 Análises físico-químicas	22
5.2.1 Curva de fermentação dos iogurtes.....	22
5.2.2 Composição físico-química.....	23
5.2.3 Avaliações físico-químicas durante a estocagem.....	28
5.2.4 Teor de minerais (Ca e P).....	32
5.2.5 Teor de aminoácidos totais e livres.....	33
5.3 Avaliação da viabilidade das bactérias <i>starter</i> e probiótico..	37
5.4 Análises físicas (sinérese, capacidade de retenção de água e perfil de textura).....	40
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Com o objetivo de atenderem consumidores mais preocupados com os impactos da alimentação na saúde e no bem estar os setores de alimentação, nutrição e saúde estão em constantes mudanças. Dentro deste contexto existem três fatores que influenciam as principais transformações nessas áreas: 1) eficácia e segurança para a nutrição e saúde: crescente procura dos consumidores por produtos que proporcionem efeitos benéficos o que motiva os avanços científicos e tecnológicos para melhorar a qualidade da dieta da população; 2) melhora da qualidade e reformulação de produtos: necessidade de aprimorar os alimentos processados devido à exigência por padrões superiores de qualidade, segurança dos produtos e necessidade de reformulação de alguns alimentos ou substituição de determinados ingredientes e 3) adequações às novas tecnologias: que podem ser aplicadas para o desenvolvimento de novos produtos ou aprimoramento da qualidade de produtos com diferentes formulações (VIALTA & REGO, 2014).

Seguindo esta tendência, os produtos lácteos representam um mercado promissor para a oferta de alimentos processados de maior valor agregado, pois além de serem conceituados pela riqueza natural em ingredientes essenciais é uma alternativa prática para a melhora da nutrição (ZACARCHENCO et al., 2017).

O iogurte é um dos produtos lácteos fermentados mais populares cujo consumo tem crescido no mundo todo devido não somente ao efeito terapêutico, mas também pelas propriedades sensoriais que incluem textura, cor e sabor (CHEN et al., 2017).

Tradicionalmente o conteúdo de sólidos do leite é aumentado para produção de iogurte. As principais formas disponíveis para aumentar o conteúdo de proteínas e sólidos são: 1) adição de ingredientes em pó proteicos (como leite desnatado, concentrado de proteínas soro-WPC, caseinatos; 2) evaporação da água do leite sob vácuo; 3) remoção da água pela filtração por membrana (UF). A fortificação do leite com 3 a 4% de leite em pó desnatado (LPD) é uma prática comum para aumentar o conteúdo de sólidos totais na elaboração do iogurte. No entanto, a adição de LPD é limitada, já que altos níveis de LPD podem produzir um sabor de pó e proporcionar um elevado conteúdo de lactose resultando numa alta acidez do produto (TRACHOO, 2002; LEE & LUCEY, 2010). Uma alternativa para fortificação

do leite na elaboração do iogurte é a ultrafiltração. As proteínas concentradas pela ultrafiltração tem melhor valor nutricional que os produtos feitos pelo método tradicional. Outra vantagem é que o leite ultrafiltrado contém um alto nível de proteína com menor nível de lactose que o leite normal (VARELTZIS et al., 2016; TAMIME & ROBINSON, 2007).

Nos últimos anos, os iogurtes têm sido reformulados para incluírem linhagens de *L. acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* em adição aos microrganismos convencionais do iogurte. A sobrevivência dos probióticos nos produtos lácteos fermentados está relacionada a diferentes fatores, como: cepas usadas, interação entre as espécies presentes, composição química do meio, conteúdo de sólidos lácteos, pH, ácidos orgânicos, temperatura de incubação e estocagem, oxigênio dissolvido, promotores e inibidores de crescimento, entre outros (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; KAILASAPATHY et al., 2008; TRIPATHI & GIRI, 2014). Os alimentos probióticos devem ser seguros e conter quantidade apropriadas de organismos probióticos. O nível mínimo recomendado de é de 10^6 UFC/mL no momento do consumo. Dependendo da quantidade ingerida, e levando em conta o efeito da estocagem na viabilidade do probiótico, a ingestão diária de 10^8 – 10^9 microrganismos probióticos é essencial para atingir a ação probiótica no organismo humano (TRIPATHI & GIRI, 2014; ILLUPAPALAYAM, et al., 2014).

Tamime & Robinson (1985) avaliaram a viabilidade da produção de iogurte em escala industrial a partir de leite concentrado por osmose reversa (OR) ou UF, e relataram que o leite integral, quando concentrado por UF a 18-20 g de sólidos totais/100g produz um iogurte cremoso, suave, com um sabor ácido típico, não sendo necessária a homogeneização durante o tratamento subsequente do leite. Concluíram ainda que, leite desnatado concentrado por UF para 13g de sólidos totais/100g se mostrou adequado para produção de iogurte. De acordo com Tamime e Robinson (2007), alguns estudos feitos com iogurte obtidos com retentado de UF sugerem alguns aspectos, dentre os quais, que o conteúdo de ST deve ser 13,23g/100g, mas nenhum dado foi dado a respeito do nível de gordura. Outra vantagem adicional da técnica de ultrafiltração (UF) consiste no aumento dos níveis de proteína, sem aumentar substancialmente os níveis de lactose (TAMIME & DEETH, 1980).

O presente trabalho propôs elaborar iogurtes com alto teor de proteínas adicionados de probiótico, a partir de leites ultrafiltrados em diferentes concentrações, comparando com um padrão elaborado a partir de leite desnatado fortificado com leite em pó desnatado. Estes produtos foram avaliados durante o período de estocagem refrigerada a fim de estudar o efeito da ultrafiltração nas características microbiológicas, físicas e físico-químicas dos iogurtes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Elaborar iogurtes probióticos com elevados teores de proteína a partir de leites ultrafiltrados em diferentes concentrações de sólidos totais, avaliando o efeito da ultrafiltração nas características físicas, físico-químicas e microbiológicas destes iogurtes probióticos.

2.2 Objetivos específicos

- Elaborar iogurtes com adição de probióticos a partir dos leites ultrafiltrados.
- Obter leites com teores aumentados de proteínas e reduzidos de lactose através do método de ultrafiltração.
- Avaliar o efeito da ultrafiltração nas características físicas, físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes.
- Avaliar o efeito da concentração das proteínas na manutenção da viabilidade dos probióticos durante o período de estocagem dos iogurtes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Iogurte

A origem do iogurte data de 6.000 a.C., quando os povos neolíticos da Ásia Central passaram de coletores a produtores de alimentos, iniciando a prática de

ordenha de seus animais. Acredita-se que a fermentação tenha sido descoberta acidentalmente quando esses povos começaram a estocar leite em bolsas de pele de ovelha durante o período de clima quente (WEERATHILAKE et al., 2014). Turcos antigos, que viviam como nômades, provavelmente foram responsáveis por introduzir o iogurte nas aldeias. Nos Estados Unidos a produção de iogurte teve início na década de 1920, porém seu consumo passou a ser significativo nas décadas de 1960 e 1970 (TRACHOO, 2002).

Atualmente o iogurte é um dos produtos lácteos mais populares com grande aceitação mundial devido aos benefícios nutricionais e aceitação sensorial. Segundo Chen et. al (2017) no ano de 2015 a produção de iogurte atingiu 27,7 milhões de toneladas, aumentando 1,2 vezes em relação ao rendimento em 2010.

A Comissão da FAO/WHO do *Codex Alimentarius* define o iogurte como “um produto lácteo coagulado obtido por fermentação ácido láctica através da ação de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* no leite (leite pasteurizado ou concentrado) com ou sem adições (leite em pó, leite em pó desnatado, etc.)”. O teor de proteína deve ser no mínimo 2,7% e de gordura no máximo 15%. Para alcançar os padrões da FAO/WHO o leite deve ter um teor mínimo de 8,2 % de sólidos não gordurosos e 3% de gordura para a fabricação do iogurte (WEERATHILAKE et al., 2014). Os microrganismos no produto final devem ser viáveis e abundantes (TRACHOO, 2002; BRASIL, 2007).

De acordo com a IN 46 (BRASIL, 2007) o iogurte deve ter o leite como ingrediente obrigatório podendo ser adicionado ingredientes opcionais como frutas, açúcar e amidos. Podem ser classificados, de acordo com o teor de gordura, como “com creme” (mínimo 6%); “integral” (3% a 5,9%); “parcialmente desnatado” (0,6% a 2,9%) e “desnatado” (máximo 0,5%). Deve conter no mínimo de 2,9% de proteínas lácteas.

Os iogurtes podem ser classificados como: 1) firme (set yoghurt), cuja fermentação ocorre dentro da própria embalagem após a inoculação da cultura láctica; 2) iogurte batido (stirred yoghurt), fermentado em tanques, tendo a estrutura do gel quebrada antes de ser resfriado e embalado e 3) iogurte líquido (drinking yoghurt), considerado um leite fermentado batido de baixa viscosidade (LIMA et al., 2006).

A ação simbiótica das bactérias *starter* é responsável pela acidez e sabor do iogurte. Durante a fermentação essas bactérias realizam três conversões bioquímicas principais: 1) conversão da lactose em ácido láctico, 2) hidrólise da caseína em peptídeos e aminoácidos livres e 3) quebra da gordura do leite em ácidos graxos livres (CHEN et al., 2017). No início da fermentação *L. bulgaricus* libera aminoácidos essenciais da caseína por atividade proteolítica, favorecendo assim o crescimento do *S. thermophilus*. Por ser um microrganismo microaerófilo, o *L. bulgaricus* cresce lentamente nesta fase. Com o aumento da concentração de ácido láctico e abaixamento do pH, ocorre um decréscimo na multiplicação de *S. thermophilus*, estimulando o crescimento do *L. bulgaricus* (TRACHOO, 2002). Absorvida como açúcar livre, a lactose é quebrada em glucose e galactose pela ação da enzima β -galactosidase. O ácido láctico presente no iogurte é produzido a partir da porção glicose da lactose, pois a enzima para o metabolismo da galactose está presente, porém em menor quantidade (OLIVEIRA et al., 2002).

O iogurte apresenta uma estrutura de gel viscoelástico fraca, formada a partir de uma rede tridimensional, a qual imobiliza a fase líquida. A qualidade física da rede do gel é amplamente influenciada pela concentração de proteína na mistura de iogurte. A ligação proteína-proteína desencadeada pelo tratamento térmico e desenvolvimento da acidez, é essencial para a formação da rede, na qual os glóbulos de gordura também estão aprisionados (YILDIZ, 2010). Em sistemas homogêneos é provável que as interações entre o glóbulo de gordura e a proteína atuem como promotores da estrutura e podem ter grande influência na cinética de formação e força do gel (SODINI et al., 2004). Portanto, procedimentos como o aumento dos teores de proteína e gordura do leite constituem o principal alvo do sistema de fortificação na indústria de iogurte.

Para melhorar a textura do iogurte, realiza-se a fortificação do leite ou leite desnatado com leite em pó desnatado (LPD), concentrado proteico de soro de leite (CPS) e alguns outros ingredientes lácteos ou vegetais. A adição de 3% a 4% de leite em pó desnatado (LPD) à mistura de teor de sólidos totais (ST) em iogurtes semi-desnatados, sem gordura e com baixas calorias contribui para o aumento de ST e conseqüente diminuição da sinérese. Os métodos de fortificação comumente empregados são o uso de leite em pó desnatado ou concentrado proteico de soro de leite (CPS) para aumentar o nível de proteína na mistura, mas também aumentam

o nível de lactose. A adição de leite em pó desnatado aumenta o valor calórico do iogurte e a produção de ácido, já que cerca de 50% do conteúdo de matéria seca do LPD é lactose (KALAB et al., 1983). O iogurte desnatado é normalmente baixo em ST (10% a 12%) e, conseqüentemente, pode ocorrer a separação do soro ou sinérese.

Para reduzir a sinérese, agentes espessantes como gelatina, amido, derivados de celulose, alginatos e carragenina podem ser adicionados (TRACHOO, 2002). Estabilizantes são geralmente referidos como hidrocoloides e seu modo de ação no iogurte inclui duas funções básicas: primeiro, a ligação da água e segundo a promoção no aumento da viscosidade. As funções dos hidrocoloides no iogurte são: (a) agentes espessantes ou de gelificação e (b) agentes estabilizadores. A concentração ideal de estabilizante/emulsificante depende do tipo que será usado. Outro fator que determina o nível de estabilizante adicionado ao iogurte é a porcentagem de sólidos presentes no leite. Em muitos casos são usadas misturas (blends) com vários agentes estabilizantes para a elaboração do iogurte (TAMIME & ROBINSON, 2007). Cada país possui uma regulamentação definida para estes ingredientes. No Brasil somente em iogurtes desnatados a legislação vigente (IN 46/2007) permite-se o uso dos estabilizantes como a pectina, pectina amidada e gelatina na proporção de 10g/kg, e os demais espessantes/estabilizantes (alginatos, ágar, carragena, gomas, celulose, metilcelulose, hidroxipropilcelulose, carboximetilcelulose) na proporção de 5g/Kg. Concentrados de ultrafiltração (UF), no entanto, podem ser usados para aumentar os níveis de proteína, sem aumentar substancialmente os níveis de lactose (TAMIME & DEETH, 1980).

Comercialmente, um alto conteúdo de proteína no leite para iogurte pode ser alcançado pela adição de caseinato em pó, concentrando o leite por UF ou em menor grau, pela adição de soro em pó com alto teor proteína e/ou leiteiro (buttermilk) em pó. Embora, em termos gerais, o nível global de proteína na mistura afete as características do coágulo, a formação do gel é inteiramente dependente das propriedades funcionais da fração caseína. É claramente viável, portanto, fabricar iogurte a partir de leite concentrado ou fortificado. Abrahamsen; Holmen (1980) citados por Tamime & Robinson (1985) compararam a qualidade de iogurte produzido com leite por osmose reversa (OR), leite ultrafiltrado (UF), leite evaporado a vácuo (VE), com um produto elaborado com adição de leite pó (MP),

concluindo que o iogurte obtido por UF propiciou maior viscosidade e firmeza do coágulo.

Iogurtes com alta concentração de proteína existem há muito tempo com uma variedade de nomes: labneh (mediterrâneo oriental), torba (Turquia), stragistro (Grécia), Chakka (Índia) e Ymer (Dinamarca) e iogurte tipo grego (Estados Unidos) são todos exemplos de leites fermentados filtrados ou concentrados de diferentes origens (TAMIME et al., 2014). De acordo com Jørgensen et al. (2019), com base na definição padrão do *Codex Alimentarius* (2011), o leite fermentado concentrado deve conter um teor de proteína aumentado, antes ou após a concentração, para no mínimo 5,6% e um teor de gordura inferior a 15%. Na Europa o termo iogurte grego é utilizado para descrever um tipo específico de produto, elaborado com determinadas características, e não referindo-se ao país de origem. Desse modo as autoridades determinam que haja uma indicação de origem no rótulo dos produtos que ostentam o termo "iogurte grego" para garantir que os consumidores não sejam induzidos a erro (EUROPEAN PARLIAMENT, 2016).

Labneh ou grego são caracterizados pelo alto teor proteico, geralmente entre 9% e 10% (MOINEAU-JEAN et al., 2019), enquanto os iogurtes tradicionais apresentam entre 3,5% e 4,5 % (NARAYANA & GUPTA, 2013; TAMIME & ROBINSON, 2007). Tradicionalmente, esse produto era produzido por dessoragem, cujo método consistia em drenar o iogurte usando sacos de pano. Este procedimento tem sido substituído pelo uso de sistemas de separação mecânica, como a ultrafiltração, através da concentração e posterior fermentação do retentado ou pela ultrafiltração de iogurtes já fermentados (TAMIME et al., 1991). No Brasil, normalmente o iogurte grego é obtido pela adição direta de proteínas e estabilizantes antes da fermentação, sendo que os ingredientes mais usados são concentrado proteico de soro, caseinato de sódio, amidos, gomas e gelatinas (PIMENTEL et al., 2017).

3.2 Processo de ultrafiltração por membrana

O fracionamento dos componentes do leite permite uma aplicação mais eficiente e diversificada. A tecnologia de separação por membranas parece uma

escolha lógica para o fracionamento do leite, porque muitos componentes do leite podem ser separados por tamanho (TAMIME, 2009).

A filtração por membranas é um processo desenvolvido para concentrar e separar sólidos de uma mistura aquosa, e os processos usuais de membrana são osmose reversa (OR) e ultrafiltração (UF). O processo de UF simplesmente peneira ou filtra o leite e as membranas podem somente reter frações de alto peso molecular, dependendo da faixa de corte da membrana. As pressões de operação são muito menores do que o processo de OR, ou seja, de 1-10 kg/cm² (0,1-1 MPa) (TAMIME & ROBINSON, 2007). O material que passa através da membrana é chamado permeado, e durante o processamento do leite (integral ou desnatado) a maior diferença entre o permeado e/ou soro é que enquanto o permeado de OR consiste somente em água, o permeado de UF contém, lactose, nitrogênio não proteico, ácidos orgânicos, cinzas e vitaminas hidrossolúveis, além da água (TAMIME & ROBINSON, 1999). A concentração por filtração por membrana tem como vantagem a preservação do sabor natural e do valor nutricional dos produtos alimentícios, pois não emprega aquecimento severo como a evaporação térmica (KOZLUDHOVA et al, 2015). A Figura 1 ilustra o processo de ultrafiltração.

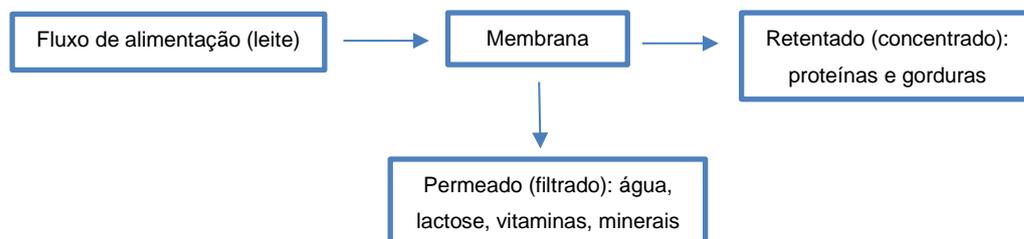


Figura 1 - Fluxograma do processo de ultrafiltração

Processos de membrana como ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF), são empregados com diferentes finalidades, e sua aplicação se deve à permeabilidade seletiva. Através da ultrafiltração é possível obter leite UF (fator de concentração de três vezes), com remoção de 65% a 70% da lactose. Também é possível com processo diafiltração (etapa que envolve a adição de água ao retentado da UF) a remoção da lactose residual (teor <1%) e minerais (GALLINA; ANTUNES, 2018). O

processo de UF concentra a gordura e as proteínas do leite para padronização do leite para queijo ou fortificação do leite para iogurte (TAMIME & ROBINSON, 1999).

Tamime & Robinson (1985) avaliaram a viabilidade da produção de iogurte em escala industrial a partir de leite concentrado por OR ou UF, e relataram que o leite integral, quando concentrado por UF a 18-20 g de sólidos totais/100g produz um iogurte cremoso, suave, com um sabor ácido típico, não sendo necessária a homogeneização durante o tratamento subsequente do leite. Também descrevem que um processo similar, mas com um conteúdo de lactose ajustado para 2g/ 100g, resultou em um iogurte superior às marcas comerciais. Concluíram ainda que, leite desnatado concentrado por UF para 13g de sólidos totais/100g se mostrou adequado para produção de iogurte.

De acordo com Tamime e Robinson (2007), alguns estudos feitos com iogurte obtidos com retentado de UF sugerem alguns aspectos, dentre os quais, que o conteúdo de ST deve ser 13,23g/ 100g, mas nenhum dado a respeito do nível de gordura. Iogurte feito com retentado de UF apresentou uma taxa total de aminoácidos livres pelo total de proteínas de 0,0375 e não foram observadas diferenças significativas no tamanho da partícula em peptídeos de baixo peso molecular do iogurte. Entretanto, concentrar leite mais do que duas vezes resulta em um produto firme demais; a tensão do coágulo foi correlacionada com o grau de concentração. Concentrados de leite desnatado por UF (corte de 10 kDa) e OR foram utilizados na elaboração de iogurtes; o primeiro teve uma relação de conteúdo de proteína e lactose de 1,2 e desta forma produziu-se um iogurte com qualidades adequadas. Também foi verificado que a atividade da cultura starter em retentados de UF aumentou, o que se observou pelo aumento na condutância. A alteração na redução do valor de pH é menor (ou mais lenta) apesar do aumento no conteúdo de ácido láctico. Tal comportamento microbiano é atribuído à capacidade tampão dos componentes presentes no retentado da UF.

Em geral, iogurte feito de leite concentrado por UF tem um corpo mais firme do que amostras produzidas por leite obtido por OR, leite com adição de proteínas lácteas ou leite não concentrado. O uso de leite UF para produção de iogurte foi estimulado para eliminar o estágio de homogeneização e dar origem a uma textura suave e cremosa (BARBADOS, 2010). Similarmente, Becker e Puhan (1989) demonstraram que o emprego da UF resulta em um iogurte classificado como

superior, quando comparado ao iogurte feito com leite concentrado por evaporação ou adição de leite em pó desnatado.

Durante a UF, a lactose, o maior componente dos sólidos totais do leite, é removida efetivamente através do permeado e ocorre um aumento no nível de proteína e gordura. A utilização de leite UF concentrado para a produção de iogurte fortalece o coágulo do iogurte, aumenta a viscosidade, e previne a separação de soro e sinérese. Para uma boa qualidade do iogurte é necessária uma proporção elevada de caseína/ proteína não caseínica. Embora, durante a UF, a proporção de caseína para proteína não-caseína no leite não seja amplamente alterada, ocorre um aumento na formação de ácido láctico em iogurte UF, o que resulta em coágulo mais firme em comparação com outros sistemas de fortificação (BARBADOS, 2010).

O aumento na capacidade tamponante devido à elevada concentração de proteínas protege os organismos da cultura contra o abaixamento do valor de pH. Quando o leite UF é tratado a 85-90°C, o tempo de acidificação do iogurte é reduzido, o que é explicado pela diminuição do conteúdo de oxigênio, o qual exibe um efeito inibitório sobre o *Streptococcus thermophilus*, na cultura de iogurte (BARBADOS, 2010). É importante que *Streptococcus thermophilus* esteja ativo pois durante da fermentação esse microrganismo é responsável pela produção do ácido láctico que irá reduzir o pH do meio, favorecendo o crescimento do *Lactobacillus bulgaricus* (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

A UF também é aplicada para produção de iogurte concentrado. Dois diferentes sistemas de UF têm sido desenvolvidos para produção de iogurte concentrado: 1) A fermentação de retentado de UF, que possui um conteúdo de sólidos inicial de acordo com o desejado no iogurte concentrado, aproximadamente 24%, e 2) o emprego da UF no iogurte pronto (fermentado), a 40-50°C até a obtenção do nível desejado de sólidos totais no produto. Apesar da composição química final de ambos os produtos serem semelhantes entre si, as propriedades físicas e sensoriais são consideravelmente diferentes. As principais vantagens da técnica de UF quando comparada com outros métodos convencionais são alto rendimento (aumento 10%), diminuição no tempo do processo de fermentação (25%) e baixa perda de soro (wheyng-off). Em adição, os volumes de leite, cultura *starter*, e sal (opcional) são reduzidos a aproximadamente 10%, 80% e 50%,

respectivamente. Foi relatado que o iogurte concentrado produzido usando o método de UF tinha um corpo e textura mais suave, macia, e mais palatável no gosto do que o produzido pelo método tradicional (BARBADOS, 2010).

Além dos iogurtes, variados tipos de queijos (Minas frescal, parmesão, petit suisse) podem ser elaborados com leites concentrados por ultrafiltração.

3.3 Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). De acordo com Lourens-Hatting & Viljoen (2001) para ser considerado probiótico e ser utilizado como um suplemento alimentar o microrganismo deve atender certos requisitos: a cultura deve ser um habitante comum do trato intestinal humano, deve sobreviver em grande quantidade à passagem pelo trato digestivo superior, ser capaz de preencher um nicho ecológico e trazer efeitos benéficos quando estiver no intestino. Segundo os mesmos autores, para sobreviver, a cepa deve ser resistente a sais biliares presente no intestino inferior, condições gástricas (pH 1 a 4), enzimas presentes no intestino (lisozima) e metabólitos tóxicos produzidos durante a digestão. Portanto, para conferir saudabilidade, as bactérias probióticas devem chegar ao intestino viáveis e em quantidades adequadas, padronizadas em torno de 6 a 7 log UFC/g de produto (KUMAR & KUMAR, 2016; MANTOVANI et al., 2019). De acordo com Kandyliis et al. (2016) para exercer efeitos benéficos os microrganismos devem estar vivos e disponíveis em números altos, entre 10^7 e 10^8 UFC por grama de produto. Já a Federação Internacional de Laticínios (IDF) recomenda uma quantidade mínima de 10^7 UFC por grama de produto consumido (KAUR et al., 2014; KAILASAPATHY et al., 2008). Estes números requeridos, no entanto, podem variar de acordo com a espécie, e mesmo entre cepas dentro de uma mesma espécie.

De acordo com o estipulado pela IN 46 (BRASIL, 2007) a contagem mínima de bifidobactérias deve ser 10^6 UFC/g e 10^7 UFC/g para bactérias lácticas totais em iogurte. Atualmente no Brasil o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da ANVISA, segundo requisitos da RDC 241 (BRASIL, 2018) que avaliam

três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do microrganismo, sua segurança e seu efeito benéfico.

As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos. De acordo com Saad (2006) o local de preferência para a colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias parece ser respectivamente o íleo terminal e o cólon. Quando ingeridos os probióticos se somam temporariamente à microbiota intestinal já existente auxiliando na absorção dos nutrientes e no equilíbrio da mesma.

Dentre os efeitos benéficos dos probióticos sobre a saúde do hospedeiro estão o controle de infecções intestinais, estímulo da motilidade intestinal, melhor absorção de alguns nutrientes, melhora nos sintomas de intolerância à lactose, diminuição dos níveis de colesterol, efeito anticarcinogênico e estímulo do sistema imunológico (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto algumas propriedades benéficas ainda não foram completamente comprovadas.

Alguns mecanismos como a colonização competitiva e produção de ácidos orgânicos aumentam a resistência das bactérias probióticas. Pela exclusão competitiva as bactérias probióticas inibem a adesão dos patógenos na mucosa intestinal. A produção dos ácidos láctico e acético abaixa o pH intestinal, inibindo o crescimento de patógenos (KAILASAPATHY & CHIN, 2000). De acordo com Lourens-Hatting & Viljoen (2001) as bifidobactérias produzem maiores quantidades de ácido acético que láctico com forte efeito antagonista contra bactérias Gram negativas; alguns probióticos produzem substâncias antimicrobianas denominadas bacteriocinas, que possuem ação bacteriostática ou bactericida sobre os microrganismos patogênicos.

A viabilidade dos probióticos na matriz alimentar está relacionada a diferentes fatores, como: pH, ácidos orgânicos, temperatura de armazenamento, níveis de oxigênio, presença de micro-organismos e agentes inibidores dentre outros fatores (KAILASAPATHY et al., 2008; TRIPATHI & GIRI, 2014). Esses fatores podem influenciar na microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados o que dificulta a manutenção da viabilidade destes microrganismos durante a estocagem refrigerada (GALLINA et al., 2011).

Leite e produtos lácteos são excelentes veículos para os microrganismos probióticos, podendo ser incorporados em leites em pó, iogurtes, queijos e sorvetes.

Por serem ricos em lipídios e proteínas os produtos lácteos possuem um efeito protetor auxiliando na sobrevivência dos probióticos durante a passagem desses microrganismos pelas condições adversas do trato gastrintestinal (MANTOVANI et al., 2019). De acordo com Lourens-hatting & Viljoen (2001) as bactérias utilizadas durante a fermentação do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) não pertencem à flora intestinal do homem, não são resistentes à bile e nem sobrevivem à passagem pelo intestino. No entanto, essas bactérias têm efeitos positivos como resultado dos metabólitos da fermentação, seja pela ação inibitória contra patógenos ou melhora na digestão da lactose.

Nos últimos anos, os iogurtes têm sido reformulados para incluírem linhagens de *L. acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* em adição aos microrganismos convencionais do iogurte contribuindo para a alegação de efeitos benéficos para a saúde, além de ser um veículo potencial pelo qual os consumidores podem consumir culturas probióticas (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Estudos clínicos realizados com cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 sugerem que este microrganismo adere à mucosa intestinal, mantendo a integridade epitelial, protegendo o hospedeiro de inflamações e infecções por possuir uma boa habilidade em inibir microrganismos patogênicos e modular o sistema imunológico (FLACH et al, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Matéria Prima e ingredientes

- Leite desnatado pasteurizado tipo A (Laticínios Xandô) e leite em pó desnatado Molico® (Nestlé).

- Cultura láctea *starter* convencional de iogurte (Y450B – LYOFAS, da marca Sacco), cultura probiótica, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* – BB12®, (comercializada pela Chr. Hansen).

4.1.2 Elaboração das formulações

- **Preparo da cultura starter de iogurte**

Para a elaboração dos iogurtes foi empregada a cultura starter convencional de iogurte contendo os microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Para a ativação da cultura liofilizada do iogurte foi esterilizado um litro de leite integral tipo A a 115°C por 15 minutos e posteriormente resfriado a 44°C. Em seguida, o envelope com os microrganismos foi adicionado ao leite e homogeneizado até completa dissolução. Alíquotas de 20 mL foram distribuídas em tubos de centrífuga de 50mL e estocadas a -20 °C para posterior uso. A contagem de bactérias lácticas totais no fermento foi de 10⁹ UFC/mL.

- **Cultura probiótica**

Um grama da cultura probiótica BB12 foi adicionado diretamente em 2L de leite de cada formulação junto com a cultura *starter* do iogurte. De acordo com as especificações do fabricante o envelope tipo sachê de cultura probiótica (25g) continha 10¹¹ UFC/g.

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimento de ultrafiltração

Os experimentos de filtração por membrana (ultrafiltração) foram realizados em escala laboratorial em um equipamento Pellicon® Cassette Acrylic Holder and Assembly, operando por filtração com fluxo tangencial, com filtros do tipo cassete, de poro para o corte de peso molecular de 10 kDa (Figura 2). A pressão utilizada na entrada de alimentação do sistema foi entre 20-30 PSI. Os leites foram concentrados em dois fatores de concentração ou taxa de redução de volume denominados FC1 e FC2. Para a concentração do leite FC1 foram utilizados 6 litros de leite desnatado e obtidos 2 litros de retentado. Para a concentração do leite FC2 foram utilizados 6 litros de leite desnatado e obtidos 4,1 litros de retentado.

O fator de concentração (FC) ou taxa de redução de volume é obtido na razão do volume inicial (leite) pelo volume final de retentado. Desta forma, FC1 = 3 e FC2 = 1,5.

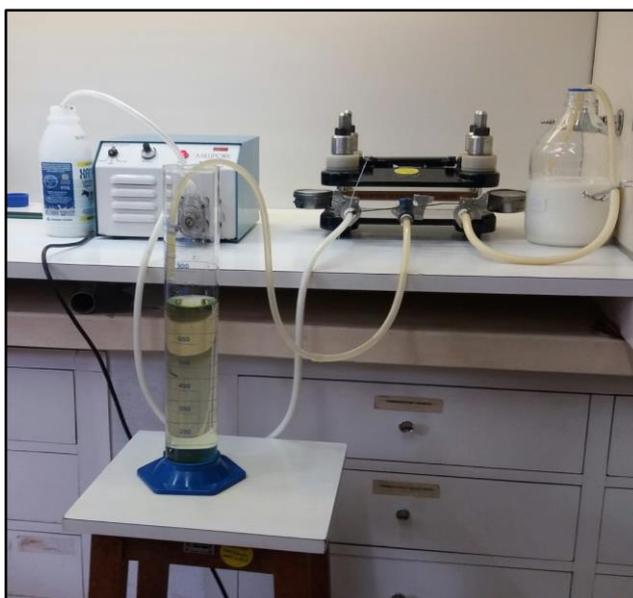


Figura 2 - Processo de ultrafiltração dos leites pasteurizados

4.2.2 Elaboração dos iogurtes

Ao leite desnatado pasteurizado tipo A (2L) foi adicionado 70 gramas de leite em pó desnatado com o objetivo de aumentar o teor de sólidos totais, de 9% para aproximadamente 13%, sendo denominado leite controle. Os leites obtidos por ultrafiltração foram denominados FC1 e FC2. Portanto, foram elaborados três iogurtes, um iogurte padrão (controle) e dois obtidos a partir dos leites ultrafiltrados, denominados iogurtes FC1 e FC2.

Os leites controle, FC1 e FC2 foram pasteurizados a 85° C por 30 min em banho termostático e resfriados em banho de gelo até a temperatura de 43° C. Em seguida, foram inoculados 40 mL da cultura *starter* de iogurte (descongelada) e um grama da cultura probiótica (BB12) para 2L de leite de cada formulação. Os iogurtes foram preparados em frascos tipo Schotts de 2L e foram fracionados em béqueres de 100mL para as análises de textura e em tubos tipo Falcon de 15mL e 50mL para as demais análises. As amostras foram incubadas em estufa a 43°C para o processo de fermentação. A curva de fermentação foi acompanhada durante o período de fermentação, até o pH atingir o valor de 4,5. Os iogurtes foram acondicionados em uma câmara BOD à 8± 2°C e estocados por 28 dias (Figura 3).

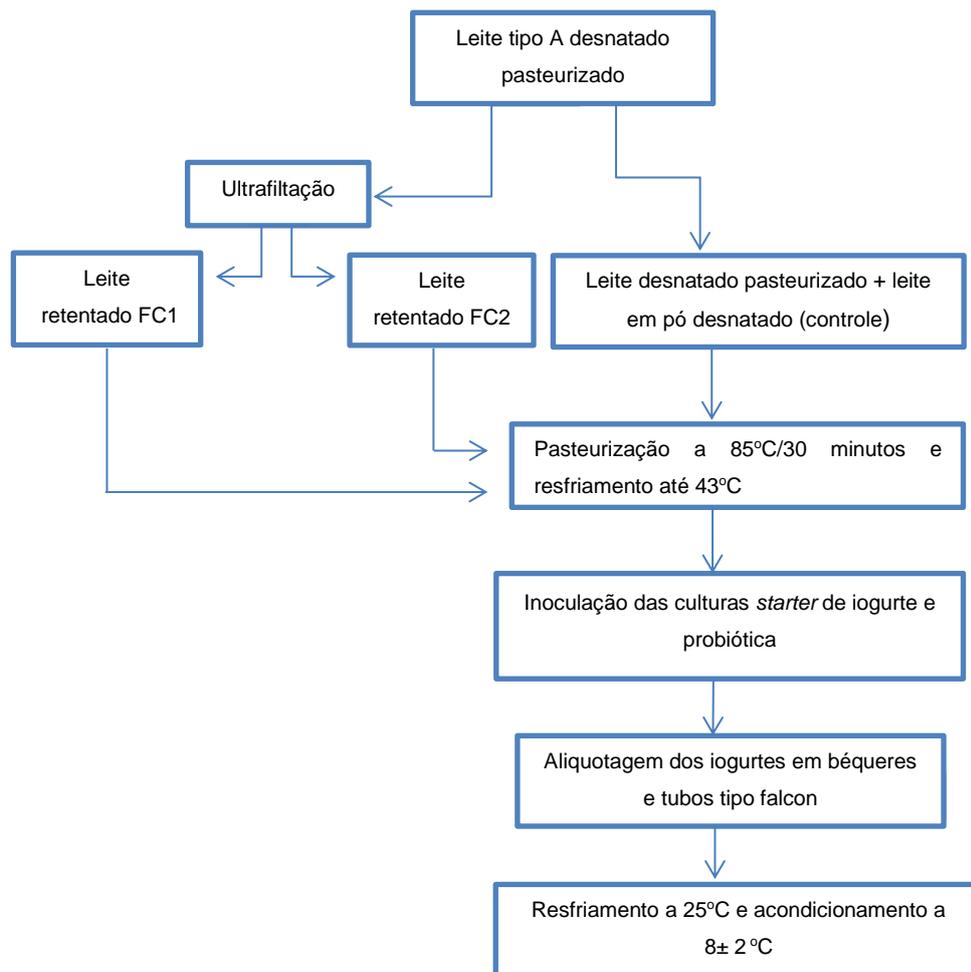


Figura 3 - Fluxograma da obtenção e estocagem dos iogurtes a $8 \pm 2^\circ \text{C}$.

4.2.3 Análises físico- químicas

As análises físico-químicas dos leites, soros e iogurtes foram realizadas de acordo com os métodos descritos a seguir em duplicata ($n=2$).

Os leites desnatado tipo A pasteurizado controle (padrão), retentado FC1 e retentado FC2 foram avaliados quanto ao extrato seco total, teor de cinzas, proteína total, gordura (lipídios), teor de minerais (Ca e P) e lactose. Nos permeados (soro FC1 e soro FC2) foram feitas análises de extrato seco total, cinzas, proteína total e gordura.

Os iogurtes controle (padrão), FC1 e FC2 foram submetidos às análises de extrato seco total, cinzas, gordura e proteína total no primeiro dia de fabricação. As medidas de pH foram feitas durante a fermentação e a cada 7 dias e a acidez titulável a cada 7 dias durante os 28 dias de estocagem.

- Extrato seco total (EST) e proteína total

O EST foi determinado pela evaporação, até peso constante, da água da amostra mais areia tratada, em estufa com ventilação. O teor de nitrogênio total das amostras foi determinado pelo método de micro- Kjeldahl. Para o cálculo da conversão do nitrogênio em proteína foi utilizado o fator de 6,38 (LATIMER, AOAC, 2012).

- Cinzas

O teor de cinzas foi calculado pela eliminação da matéria orgânica da amostra a temperatura de 550°C, sendo denominado de resíduo mineral fixo o material remanescente após a incineração da amostra (BRASIL, 2006).

- Lactose

A dosagem de açúcar das amostras foi baseada no método de Burgner e Feinberg (1992), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

- Gordura

A análise de gordura foi realizada de acordo com o método de Bligh & Dyer (1959), no qual é adicionada na amostra uma quantidade proporcional de clorofórmio e metanol. O clorofórmio separa os lipídeos da água e de outros compostos não lipídicos, que ficam retidos na camada metanólica. Os resultados foram expressos em % de lipídeos totais.

- pH

O pH dos iogurtes foi medido diretamente nas amostras homogeneizadas à temperatura ambiente usando um pHmetro digital ATlorion.

- Acidez titulável

O teor de acidez titulável foi determinado pela titulação com solução alcalina de concentração conhecida (hidróxido de sódio 0,1N), utilizando-se fenoftaleína

como indicador (BRASIL, 2006). Os resultados foram expressos em % de ácido láctico por 100 gramas do produto.

4.2.4 Teor de aminoácidos totais e livres

A análise de aminoácidos totais e livres foi realizada nos iogurtes controle, FC1 e FC2 (1, 14 e 28 dias de estocagem) por cromatografia em coluna C18 de fase reversa (LUNA 100 Å/ comprimento de 4.6 mm x 250 mm de diâmetro da Phenomenex, Torrance, CA, USA) em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), de acordo com metodologia White et al. (1986) e Hagen et al. (1989). Os aminoácidos foram quantificados por comparação com padrão de aminoácidos da Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) e o ácido DL-2-aminobutírico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA) foi usado como padrão interno.

4.2.5 Teor de Minerais (Ca e P)

O teor de minerais foi determinado nos leites (*in natura*, controle e retentados FC1 e FC2) após a digestão da matéria orgânica em digestor de micro-ondas, segundo método descrito por PRICE e ROOS (1969). O conteúdo de Ca e P foi quantificado usando um espectrômetro de emissão óptica de plasma acoplado indutivamente (ICP OES) (modelo 5100 VDV ICP OES, Agilent Technologies, Tóquio, Japão), equipado com uma fonte de radiofrequência (RF) de estado sólido de 27 MHz e spray nebulizador usando argônio como plasma (pureza de 99,996 % - Air Liquid, SP, Brasil). Para quantificação foi construído uma curva de calibração a partir dos padrões analíticos (tritsol, Merck, Damstadt, Alemanha).

4.2.6 Análises Físicas

As análises de sinérese e capacidade de retenção de água e textura foram feitas após a fabricação (1 dia) e a cada 7 dias durante os 28 dias de estocagem nos iogurtes controle (padrão), FC1 e FC2.

- Sinérese

Para avaliação da susceptibilidade à sinérese, alíquotas de 10 mL de amostra foram estocadas em tubos de ensaio de fundo cônico (tipo Falcon: 13 x

1,7 cm) estéreis, a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o período de validade dos produtos (28 dias). A sinérese foi medida em centímetros de dessoragem na superfície do produto (CAETANO SILVA et al., 2010).

- Textura

A textura dos iogurtes foi determinada de acordo com Narayana e Gupta (2014 a). Foi utilizado o analisador de Textura TA-XT2 Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) com probe cilíndrico de 25 mm (Figura 4). Para tal 80 g de iogurte foram adicionados em um béquer de plástico de 100 mL e o ensaio foi realizado à temperatura de $10 \pm 0,5^\circ\text{C}$. As análises foram realizadas em triplicata. Durante a análise a amostra foi comprimida por 20 mm da sua profundidade original. A velocidade do probe foi de 0,5 mm/s durante a compressão e 2 mm/s durante o pré teste e relaxamento. Os experimentos foram conduzidos por testes de compressão que geraram um gráfico de força (N) versus tempo (s).



Figura 4 – Análise de textura dos iogurtes

- Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (WHC) dos iogurtes foi determinada de acordo com Ranadheera et al. (2012), com pequenas modificações. Amostras de iogurte de aproximadamente 5 g foram centrifugadas por 15 minutos a 2.470 \times g (3.500 rpm), na temperatura de 10°C , usando uma centrífuga digital refrigerada microprocessada (CT 6000R, Cientec). A WHC foi calculada pela equação: WHC

(%) = $(1 - W1/W2) \times 100$, onde W1 é o peso do soro após a centrifugação e W2 é o peso do iogurte.

4.2.7 Análises microbiológicas

As amostras dos leites controle (padrão), FC1 e FC2 foram submetidas às análises coliformes a 30°C e 45°C e bolores e leveduras após serem pasteurizadas a 85°C/30 minutos. Nos iogurtes controle (padrão), FC1 e FC2 foram realizadas análises de coliformes a 30°C e 45°C e bolores e leveduras após a fabricação (1 dia) e contagem seletiva de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e do probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* a cada 7 dias durante os 28 dias .

- Análises de coliformes a 30°C e 45°C

A contagem de coliformes a 30°C e a 45°C foi determinada pelo método do número mais provável (NMP), utilizando Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), como teste presuntivo, com incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 ± 2 horas (ISO 4831, 2006). Para confirmação da presença de coliformes, alíquotas de tubos de LST (com crescimento microbiano e produção de gás) foram transferidas para tubos de caldo verde brilhante 2% (VB) e caldo Escherichia coli (EC). Os tubos de VB foram incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 ± 2 h, para confirmar a presença de coliformes a 30 °C. Os tubos de caldo EC foram incubados por até 48 ± 2 horas a $44 \pm 1^\circ\text{C}$, para a confirmação da presença de coliformes termotolerantes (ISO 7251, 2005).

- Análises de bolores e leveduras e contagem seletiva de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*

Os bolores e leveduras foram enumerados empregando-se o ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), com incubação por 5 dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. A contagem de *S. thermophilus* foi realizada em meio ágar M17 suplementado com solução de lactose 10%, com incubação em aerobiose a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h. Para a quantificação de *L. bulgaricus*, foi utilizado o ágar MRS acidificado (pH=5,4), com incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 h, em anaerobiose (FRANK & YOUSEF, 2004).

- Contagem seletiva de *Bifidobacterium animalis*

Os microrganismos probióticos do gênero *Bifidobacterium* spp. foram quantificados em ágar MRS suplementado com cloreto de lítio (0,1%), L-cisteína (0,05%) e dicloxacilina (0,5 mg/L), com incubação a 37 ± 1 °C por 72 h, em anaerobiose, de acordo com a metodologia descrita no boletim técnico P-12 da Chr-Hansen, com adaptações segundo o IDF (2007).

4.2.8 Análise estatística

O teste de análise de variância (ANOVA) foi empregado para avaliar a diferença entre as formulações e o efeito do tempo de armazenamento sobre as amostras. O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi empregado para comparação de médias. Os dados foram analisados através do software Minitab, versão 16.1.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da qualidade higiênico-sanitária dos leites e iogurtes

As análises da qualidade higiênico-sanitária foram realizadas inicialmente nas amostras de leite padrão e naqueles obtidos após a ultrafiltração (retentados FC1 e FC2). A pasteurização dos leites ultrafiltrados foi uma etapa importante para garantir a ausência de microrganismos que por ventura viessem a contaminar os leites durante o processo de concentração. Embora, a etapa de ultrafiltração tenha sido realizada com todos os procedimentos de controle higiênicos, dentro de uma capela de fluxo laminar, após ter sido realizado uma limpeza no equipamento com agentes sanitizantes, o processo ocorreu num longo período de tempo (em média 6 hs) para atingir as concentrações desejadas.

Os iogurtes padrão, FC1 e FC2 após um dia de fabricação, juntamente com os leites foram avaliados quanto às contagens de microrganismos indicadores (coliformes a 30°C e 45°C) e deteriorantes (bolores e leveduras) e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

A presença de coliformes não foi detectada a 30°C e 45°C nas amostras dos leites, após o tratamento térmico a 85°C, indicando que o mesmo foi eficiente.

Também não foi detectada a presença desses microrganismos nos iogurtes elaborados. Em nenhuma amostra dos leites ou iogurtes foi observado o crescimento de bolores e leveduras, indicando que a pasteurização foi eficiente no controle do crescimento destes microrganismos analisados.

Portanto, os resultados da análise higiênico-sanitária dos leites e dos iogurtes mostraram que estão de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira, RDC 12 (ANVISA, 2001) para leites e IN 46 para iogurtes (BRASIL, 2007), vigentes na data da elaboração dos produtos.

Tabela 1. Análises da qualidade higiênico-sanitária dos leites tratados termicamente e dos iogurtes com um dia de fabricação.

Amostra	Coliformes a 30°C (NMP)	Coliformes a 45°C (NMP)	Bolores e leveduras (UFC)
Leite Controle*	<0,3	<0,3	<1
Leite FC1*	<0,3	<0,3	<1
Leite FC2*	<0,3	<0,3	<1
Iogurte Controle**	<3	<3	<10
Iogurte FC1**	<3	<3	<10
Iogurte FC2**	<3	<3	<10

NMP = Número mais provável; UFC = Unidades formadoras de colônias

Resultados em mililitros* (mL^{-1}), Resultados em gramas** (g)

5.2 Análises físico-químicas

5.2.1 Curva de fermentação dos iogurtes

A curva de acidificação dos iogurtes foi acompanhada ao longo do período de fermentação. Durante a fermentação *S. thermophilus* cresce mais rapidamente no início utilizando os aminoácidos produzidos pelo *L. bulgaricus*. Em troca, *S. thermophilus* produz ácido láctico que reduz o pH para um valor ótimo de crescimento para o *L. bulgaricus*. Após aproximadamente 3 horas de fermentação, a quantidade dos dois microrganismos deve ser similar (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Verificou-se que durante a curva de fermentação dos leites controle, FC1 e FC2 o abaixamento de pH foi bastante similar para todas as amostras. Desta forma, constatou-se que as diferenças existentes na composição dos leites não afetaram a queda do pH e o desenvolvimento de acidez durante a fermentação. O pH ideal foi atingido num tempo entre 3,5 e 4 horas, o que indica uma boa atividade acidificante do fermento. (TAMIME et al., 1989).

A fermentação foi interrompida num pH em torno de 4,6 - 4,7 tendo em vista o período de estocagem. Vinderola et al. (2000) relatam que valores pH de 4,5 ou abaixo podem comprometer a viabilidade dos microrganismos probióticos em iogurtes estocados a 5°C.

5.2.2 Composição físico-química

Considerando o teor de extrato seco total do leite tipo A desnatado pasteurizado, verifica-se para o leite controle (LC), leites retentados FC1 e FC2, foram atingidos os seguintes fatores de concentração (FC), LC = 1,3, FC1 = 1,6 e FC2 = 1,22, após a ultrafiltração. Já se for considerado o teor de proteína total, obtêm-se os seguintes valores (FC), LC = 1,33; FC1 = 2,42 e FC2 = 1,55.

Os valores médios dos resultados das análises de composição proximal do leite desnatado tipo A pasteurizado, leite padrão, leites retentados (FC1 e FC2), ultrafiltrados e iogurtes são apresentados na Tabela 2.

Uduwerella et al. (2018) utilizaram a ultrafiltração de leite para elaboração de dois tipos de iogurte grego com diferentes teores de sólidos totais, sendo que os valores no teor de sólidos do leite após a ultrafiltração aumentou de 13,1% para 13,9% no retentado denominado GY-2. No retentado aumentou para 17,5% denominado GY-3. O valor da proteína do leite aumentou de 3,7% para 8,8 e 12,1% nos retentados GY-2 e GY-3, respectivamente. O teor de lactose diminuiu de 4,2% no leite desnatado para 3,8% em GY-2 e 3,6% em GY-3. Após a fermentação, o iogurte GY-2 teve uma diminuição no teor de proteína para 10,04% enquanto o iogurte GY-3 diminuiu para 9,9%; o teor de lactose diminuiu para 1,6% e 2,4% em GY-2 e GY-3 respectivamente.

Kosikowski (1979) obteve retentado de UF de leite desnatado com valores de 20,3% de proteína total, 4,7% de lactose, 0,93% de gordura, 2,27% de cinzas e 27,60% de sólidos totais. Com o objetivo de obter uma bebida láctea de baixa

lactose esse retentado foi diluído de 5 a 6 vezes com água, para diminuir o teor de proteína para 3,3 a 4,6%, e foi padronizado com creme para 1,38% a 2,6% de gordura. A partir destas bebidas lácteas, foram elaborados 3 iogurtes com 3,32%, 3,97% e 4,37% de proteína. O teor de lactose ficou em 0,31%; 0,40% e 0,51%, o teor de gordura em todos os iogurtes foi de 2,36%; cinzas 0,49%; 0,55% e 0,59% e sólidos totais 7,4%; 8,3% e 8,8%.

Leite pasteurizado foi concentrado por AINAZ e colaboradores (2008) por ultrafiltração usando três diferentes fatores de concentração denominados A (FC 1,5), B (FC 1,8) e C (FC 2,2). Eles obtiveram os seguintes resultados: aumento no teor de sólidos do leite de 10,24% para 11,93%, 13,68% e 16,18%; aumento no teor de proteína de 3,07% para 4,28%, 5,26% e 6,80%; aumento no teor de gordura de 1,80% para 2,46%, 2,91% e 3,74% e diminuição no teor de lactose de 4,78% para 4,62%, 4,55% e 4,47% nos leites A, B e C, respectivamente.

No presente estudo, após a ultrafiltração o valor de sólidos totais do leite desnatado e pasteurizado aumentou de 9,235% para 14,785% e 11,305% nos leites retentados FC1 e FC2, respectivamente. A porcentagem de cinzas teve um aumento maior no leite retentado FC1 (1,13%) e menor no leite retentado FC2 (0,89%) em relação ao valor obtido no leite desnatado pasteurizado (0,7332%).

Comparando iogurtes elaborados com leites ultrafiltrados com o iogurte controle elaborado com leite em pó desnatado, Narayana e Gupta (2014b) observaram maior teor proteico nos iogurtes ultrafiltrados (5,44%), menor teor de lactose (4,15%) e maior teor de cinzas (0,84%) quando comparados com o iogurte controle, que continha 4,24% de proteína, 5,46% de lactose e 0,74% de cinzas.

El-Khair (2009) comparou quatro iogurtes elaborados com diferentes porcentagens de leite desnatado, leite em pó e leite retentado (entre 20% e 80%) e observou que a adição do leite desnatado retentado aumentou entre 13,82% e 15,08% o teor de sólidos totais em comparação com o controle (13,40%) devido ao aumento no teor de proteína (entre 5,77% e 8,57%) em relação a 4,84% no iogurte controle e diminuiu o conteúdo de lactose (6,76% a 6,12%) quando comparado com o controle (7,40%).

O teor de proteína dos leites retentados aumentou de 3,36% no leite desnatado e pasteurizado inicial para 8,14% no leite retentado FC1 e 5,24% no leite retentado FC2. A gordura teve um aumento de 0,36g/100mL presente no leite

desnatado pasteurizado, para 0,59 g/ 100mL no leite retentado FC1 e para 0,484 g/100mL no leite retentado FC2. O aumento no teor de proteína e gordura era esperado, pois a membrana de UF separa compostos de menor peso molecular no permeado, mantendo a proteína e gordura no retentado.

Valencia et al. (2018) utilizaram a ultrafiltração para a elaboração de dois iogurtes tipo grego, sendo que um deles foi elaborado com o retentado após a ultrafiltração do leite desnatado e o outro foi obtido pela ultrafiltração do leite já fermentado. O valor do teor de sólidos do leite após a ultrafiltração aumentou de 9,09% para 17,34% no retentado e 17,58% no iogurte obtido a partir deste retentado; o valor da proteína do leite aumentou de 3,85% para 11,09% no retentado e 10,68% no iogurte e o teor de lactose do leite aumentou de 4,9% para 5,24% no retentado e diminuiu para 1,49% no iogurte. No iogurte ultrafiltrado o teor de sólidos totais aumentou de 9,08% para 16,4% no retentado; o valor da proteína aumentou de 3,9% para 9,97% e o valor da lactose diminuiu de 3,5% para 3,4% após a ultrafiltração.

O teor de lactose no presente estudo não mostrou diferença entre o leite desnatado (5,12g/100mL) e nos retentados FC1 (5,3g/100mL) e FC2 (5,17g/100mL), após o processo de ultrafiltração. O teor de lactose no leite controle teve um aumento (6,55g/100mL) em relação ao leite desnatado e pasteurizado ocasionado pela adição de leite em pó desnatado. O conteúdo de lactose nos iogurtes mostrou uma redução em relação aos seus respectivos leites. No leite controle o valor de lactose reduziu de 6,55g/100mg para 4,57g/100mg no iogurte controle; de 5,3g/100mg do leite FC1 para 3,19g/100mg no iogurte FC1 e de 5,17g/100mg no leite FC2 para 3,41g/100mg, respectivamente. De acordo com Uduwerella et al. (2018), durante a fermentação as bactérias da cultura *starter* utilizam a lactose como fonte de energia, metabolizando este açúcar para ácido láctico. Sendo assim, como era esperado, a diminuição da lactose e aumento no conteúdo do ácido láctico indicam que ocorreu uma eficiente fermentação através do metabolismo da lactose.

Kozludzhova et al. (2015) demonstraram que iogurtes probióticos preparados com leite integral ultrafiltrados duas ou três vezes tiveram maior conteúdo de matéria seca e alta acidez titulável em comparação aos iogurtes controles elaborados com leite não concentrado.

Comparando a composição química entre iogurte obtido a partir de leite não concentrado e iogurte elaborado com leite concentrado por ultrafiltração, Ozer et al. (1998) observaram uma elevação nos teores de proteína de 4,36% para 9% (aumento 48,44 %) e gordura de 4,50% para 8,20%, e uma diminuição no teor de lactose de 6,16% para 4,26%.

Tabela 2. Composição proximal (%) das amostras de leite, soros e iogurtes resultantes do processo de ultrafiltração.

Amostra		Sólidos Totais	*Lactose	Proteína	Cinzas	Lipídeos
		g/ 100 mL (%)				
	Leite tipo A desnatado pasteurizado	9,24±0,01 ^{1d}	5,12	3,36±0,04 ^d	0,73±0,01 ^d	0,36±0,01 ^c
Leites	Controle	12,16±0,03 ^b	6,55	4,48±0,01 ^c	1,04±0,01 ^b	0,33±0,00 ^c
	FC1	14,79±0,06 ^a	5,30	8,14±0,01 ^a	1,13±0,01 ^a	0,59±0,02 ^a
	FC2	11,31±0,23 ^c	5,17	5,24±0,05 ^b	0,89±0,01 ^c	0,48±0,02 ^b
Soros	Soro FC1	4,39 ± 0,01 ^b	-	0,14±0,00 ^a	0,39±0,01 ^b	0,04±0,06 ^a
	Soro FC2	5,40 ± 0,01 ^a	-	0,16±0,03 ^a	0,45±0,01 ^a	0,008±0,01 ^a
	Controle	11,35±0,16 ^b	4,57	5,11±0,17 ^c	1,04±0,01 ^b	0,36±0,01 ^b
Iogurtes	FC1	13,92±0,09 ^a	3,19	8,48±0,01 ^a	1,11±0,01 ^a	1,40±0,06 ^a
	FC2	10,79±0,14 ^c	3,41	6,01±0,10 ^b	0,45±0,01 ^c	0,39±0,01 ^b

^a Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna, para o mesmo tipo de amostra, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de significância.

¹ Média dos valores (n=2), *exceto lactose (n=1)

5.2.3. Avaliações físico-químicas durante a estocagem

pH e acidez titulável

Os valores de pH e acidez titulável foram medidos nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem e os resultados estão descritos na Tabela 3.

Houve uma redução ($p < 0,05$) no pH ao longo do tempo de estocagem a 8°C, em todas as formulações. Observou-se uma diferença de pH entre as formulações com 1 dia de estocagem, contudo, nos demais tempos (7, 14 e 21 dias) de estocagem o pH das formulações foi similar ($p < 0,05$). Após 28 dias de estocagem o iogurte FC1 apresentou pH superior, sendo que o iogurte controle e o iogurte FC2 apresentaram valores de pH similares e que não diferiram entre si.

Durante a estocagem todos os iogurtes tiveram um declínio no valor do pH. O pH inicial dos iogurtes no primeiro dia foi de 4,67 (iogurte controle), 4,72 (iogurte FC1) e 4,65 (iogurte FC2). O pH final dos iogurtes ficou em torno de 4,2-4,3.

De acordo com Kailasapathy et al. (2000) o declínio do pH ocorre provavelmente pela continuidade da fermentação pelas bactérias ácidos lácticas. Após acidificação pode ocorrer pelo decréscimo do pH após a fermentação ou durante a estocagem do produto refrigerado, causada principalmente pela continuidade do metabolismo de cepas de *L. bulgaricus* (LOURENS-HATTING & VILJOEN, 2001).

No trabalho de Donkor et al. (2006) o declínio do pH foi similar em todas as amostras com variação entre 0,057 e 0,230 unidades para iogurtes com probióticos e 0,043 e 0,193 unidades para os grupos controle durante 28 dias de estocagem.

Os iogurtes controle, FC1 e FC2 tiveram valores nas variações de pH de 0,48, 0,36 e 0,42 unidades, respectivamente, com pH final em torno de 4,2-4,3. Uduwerella et al. (2018), obtiveram valor de acidez de 4,37 e 4,30 para iogurtes gregos elaborados a partir da pré-concentração por ultrafiltração, com 14,6% e 20,2% de sólidos totais, respectivamente.

A sobrevivência dos microrganismos pode ser afetada pelo baixo pH do meio, pois os ácidos formados durante a fermentação, como o láctico e o acético, são poderosos agentes antimicrobianos. Em diferentes tipos de iogurte Vinderola et al. (2000) encontraram valores de pH iniciais variando entre 4,3 a 4,52 e

concluíram que valores de pH inferiores a 4,5 podem afetar a viabilidade dos organismos probióticos em iogurtes estocados a 5°C. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, as mudanças de pH durante o período de estocagem não afetaram a viabilidade dos microrganismos probióticos.

Segundo Moineau-Jean et al. (2019) o leite que contém maior teor de proteínas possui uma capacidade tamponante que contribui para a manutenção de valores mais altos de pH em produtos lácteos fermentados, sugerindo que iogurtes feitos com leites concentrados por centrifugação ou ultrafiltração podem melhorar a sobrevivência e estabilidade de bactérias probióticas, em comparação com iogurtes convencionais. No presente estudo o leite FC1 apresentou maior teor de proteína e capacidade tamponante, conseqüentemente teve o menor abaixamento no pH durante a fermentação ($p < 0,05$). Esse comportamento foi diferente do iogurte controle e do iogurte FC2, os quais mostraram menor capacidade tamponante, sendo que no controle apresentava também um maior teor de lactose para conversão em ácido láctico durante a fermentação, conferindo ao iogurte padrão menor valor final de pH.

A acidez pode exercer grande influência sobre os atributos dos produtos lácteos fermentados, sendo um fator importante para a aceitação sensorial.

Nos produtos analisados, o valor mínimo de acidez foi de 0,77g de ácido láctico/100g no iogurte FC2 (1 dia) e o valor máximo foi de 1,48g de ácido láctico/100g no iogurte FC1 (após 21 dias). Apesar da variação, os valores da acidez de todas as amostras encontram-se de acordo com o que estabelece a legislação brasileira para iogurtes, que é de 0,6g de ácido láctico a 1,5 g de ácido láctico por 100g de produto (BRASIL, 2007).

Houve um aumento ($p < 0,05$) na acidez titulável ao longo do tempo, em todas as formulações. O aumento da acidez ao longo da estocagem é justificado, pois mesmo sob refrigeração, as bactérias continuam fermentando a lactose e produzindo ácido láctico (GALLINA & BARBOSA, 2017). Os iogurtes controle e FC2 não diferiram quanto a acidez titulável, com 1, 7 e 21 dias de estocagem. Após 14 e 28 dias de estocagem a acidez titulável das formulações diferiram entre si, sendo que o iogurte FC1 apresentou acidez superior aos iogurtes FC2 e controle.

Akalin et al. (2004) elaboraram iogurte fortificado com 3,5% de leite em pó desnatado e iogurte adicionado de 1,5% de leite em pó desnatado e 2% de

prebiótico (frutooligossacarídeo), verificando que o conteúdo de ácido láctico nos iogurtes no dia zero variou entre 13,10mg/g e 13,86 mg/g. Os autores observaram um gradual aumento no conteúdo de ácido láctico durante o período de estocagem, sendo que os iogurtes enriquecidos com maior quantidade de leite em pó foram os que tiveram maiores valores de ácido láctico, provavelmente devido ao mais alto conteúdo de lactose. No mesmo trabalho ocorreu variação entre 4,51 e 4,48 nos valores de pH inicial, sendo que o decréscimo nos valores foi similar para todas as amostras. Eles tiveram uma variação entre 0,06 e 0,09 unidades de pH durante 28 dias de estocagem a 4°C.

Gallina & Barbosa (2017) observaram um aumento de 0,5gg/100g para 0,6 g/100g de ácido láctico em bebidas probióticas tipo smoothie elaboradas com iogurte e polpa de manga e estocadas pelo período de 30 dias. Gallina et al. (2018) observaram valores similares para a acidez de iogurte probiótico com polpa de frutas vermelhas, variando de 0,8095 g ácido láctico/100g (1 dia) a 1,0061g ácido láctico/100g iogurte (30 dias).

De acordo com Reis et al. (2011) quanto maior a quantidade de sólidos não gordurosos, maior será o teor de caseína que possui caráter ácido, o que provoca um aumento na acidez titulável. Observando a composição dos iogurtes analisados verifica-se que o iogurte FC1 apresenta maior quantidade de proteína o que pode justificar o aumento na quantidade de ácido láctico durante a estocagem.

Tabela 3. Valores de pH (média ± DP) e acidez titulável (g de ácido láctico/100 g do iogurte) durante o período de estocagem

	Dias	1	7	14	21	28
pH	Padrão	4,67±0,00 ^{1b,A}	4,50±0,06 ^{a,B}	4,44±0,04 ^{a,BC}	4,32±0,01 ^{a,C}	4,19±0,01 ^{b,D}
	FC1	4,72±0,00 ^{a,A}	4,52±0,01 ^{a,B}	4,45±0,04 ^{a,BC}	4,37±0,06 ^{a,C}	4,36±0,03 ^{a,C}
	FC2	4,65±0,0 ^{c, A}	4,47±0,01 ^{a,B}	4,42±0,00 ^{a, C}	4,32±0,0 ^{a, D}	4,23±0,01 ^{b,E}
Acidez titulável (g de ácido láctico/100 g do iogurte)	Padrão	0,77±0,02 ^{1a,D}	0,90±0,00 ^{b,C}	1,11±0,00 ^{b,A}	0,93±0,01 ^{b,BC}	0,95±0,01 ^{b,B}
	FC1	0,83±0,21 ^{a,B}	1,17±0,06 ^{a,AB}	1,31±0,04 ^{a,A}	1,48±0,02 ^{a,AB}	1,23±0,01 ^{a,A}
	FC2	0,70±0,05 ^{a,B}	0,89 0,02 ^{b, A}	0,90±0,00 ^{c,A}	0,92±0,01 ^{b, A}	0,89±0,01 ^{c,A}

^A Valores seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao longo do tempo de estocagem, ao nível de 5% de significância.

^a Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre as amostras no mesmo tempo de estocagem, ao nível de 5% de significância.

¹ Média dos valores de pH e acidez ($n=2$).

5.2.4 Teor de Minerais (Cálcio e Fósforo)

O teor dos minerais cálcio e fósforo presentes nos leites está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Teor (mg/100g) dos minerais Ca e P nos leites.

	Cálcio	Fósforo
Leite tipo A desnatado pasteurizado	112,83 ± 0,92 ^{1 c}	95,12 ± 0,45 ^d
Leite controle	169,04 ± 0,72 ^b	124,68 ± 0,33 ^c
Leite FC1	247,70 ± 1,90 ^a	174,07 ± 1,25 ^a
Leite FC2	168,10 ± 1,77 ^b	127,52 ± 1,18 ^b

^a Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância. ¹ Média dos valores de minerais ($n=3$).

O maior valor no teor de cálcio foi observado no leite retentado FC1 e o menor valor encontrado foi no leite desnatado pasteurizado (matéria-prima). Uduwerella et al. (2018) encontraram valores similares de 116 mg/100g de cálcio e 94 mg/100g de fósforo no leite cru. Os valores de cálcio dos leites controle e FC2 não apresentaram diferença significativa, isto provavelmente devido ao teor de minerais (resíduo inorgânico) presente nestes leites, que são bem próximos. Os valores encontrados para o teor de fósforo nos leites foram significativamente diferentes entre todas as amostras, sendo que o leite FC1 teve valor superior em relação aos outros leites. Estes valores superiores encontrados no leite retentado FC1, se devem à maior concentração dos componentes após a ultrafiltração. Durante a ultrafiltração os componentes do leite, como os minerais, que são menores que os poros da membrana e estão associados com as proteínas e gorduras, ficam retidos e aumentam gradualmente na concentração, porém em menor grau que estas (PREMARATNE & COUSIN, 1991).

As quantidades de cálcio e fósforo em leites cru (135,2mg/100g e 101,2mg/100g), desnatado (147,9mg/100g e 106,6mg/100g) e ultrafiltrado (165,6mg/100g e 139,3mg/100g) foram comparadas por Moreno-Montoro et al. (2015). Os autores atribuíram a maior quantidade de cálcio, fósforo e outros minerais encontrados nos leites ultrafiltrados à ligação parcial desses minerais com

as micelas de caseínas, resultando conseqüentemente num aumento no teor desses minerais nos retentados. Premaratne & Cousin (1991) verificaram que leites desnatados contendo 125,49 mg/100g de cálcio tiveram aumento de 200,81 mg/100g; 382,57mg/100g e 545,54mg/100g no teor de cálcio quando foram ultrafiltrados 2, 4 e 5 vezes respectivamente, e atribuíram este fenômeno às fortes associações do cálcio iônico com as proteínas do leite coloidal.

Uduwerella et al. (2018) verificaram que o conteúdo de cálcio e fósforo de iogurtes elaborados com leites ultrafiltrados era maior que do iogurte grego feito pelo método tradicional (filtração em bolsa de pano), pois o excesso desses minerais solúveis era removido durante a drenagem do soro do leite.

Sendo assim, os resultados deste trabalho validaram os mostrados anteriormente e mostram que o processo de UF pode ser considerado favorável ao enriquecimento com estes minerais, aumentando a oferta destes nutrientes.

5.2.5 Teor de aminoácidos totais e livres

Enzimas proteolíticas de bactérias lácticas desempenham um importante papel na degradação das proteínas e peptídeos presentes no iogurte resultando na produção de aminoácidos livres.

Em condições anaeróbicas, juntamente com a liberação dos ácidos lácticos e acéticos e CO₂, o *S. thermophilus* estimula o crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*, responsável pela hidrólise da maioria das proteínas com a formação de oligopeptídeos e aminoácidos livres. Na superfície da célula desse microrganismo há uma endopeptidase com atividade serina proteinase, que hidrolisa mais eficientemente as proteínas em valores de pH em torno de 5,2 a 5,8, em ligações próximas a aminoácidos básicos, como lisina e arginina. Em contrapartida, o *Streptococcus thermophilus* contribui minimamente na proteólise por conter principalmente exopeptidases intracelular.

A liberação dos aminoácidos é responsável pela formação dos compostos aromáticos típicos do iogurte sendo característica do *Lactobacillus bulgaricus* produzir acetaldeído (maior responsável pelo aroma), enquanto *S. thermophilus* produz principalmente dicetonas (GERMANI et al., 2014). A composição em aminoácidos totais ao longo dos 28 dias está apresentada na Tabela 5, para as

diferentes amostras. Em todas as amostras (iogurte controle, FC1 e FC2) houve pouca variação na quantidade de aminoácidos totais durante a estocagem (14 e 28 dias). Este resultado era esperado porque os aminoácidos totais são mensurados após uma hidrólise ácida (6N HCl) da amostra em temperatura elevada (110° C/22 horas). Portanto, toda proteína presente no sistema amostral é hidrolisada a aminoácidos, inclusive os aminoácidos livres presentes no meio. Por esse motivo, o teor de aminoácidos em relação ao teor de proteína (100 g) não sofre alteração. Sendo assim, esta análise não foi efetiva em mostrar o processo de proteólise pelas bactérias, que possam ter ocorrido durante o processamento e armazenamento dos iogurtes. Para esta finalidade foi realizada a análise dos aminoácidos livres presentes nos iogurtes, os quais podem demonstrar, através do seu aumento, a proteólise ocasionada pelas bactérias principalmente ao longo do período de estocagem.

Beshkova et al. (1998) fizeram uma comparação da produção de aminoácidos livres entre as culturas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* quando utilizadas separadamente na produção de iogurtes. Os autores concluíram que *Lactobacillus bulgaricus* produzia aminoácidos livres ativamente (50-70% da quantidade total) ao contrário do *Streptococcus thermophilus* que demonstrou possuir fraca atividade proteolítica .

Irigoyen et al. (2012) identificaram 29 diferentes tipos de aminoácidos livres essenciais e não essenciais em amostras de kefir, iogurtes e leites fermentados, sendo a lisina e a cisteína aminoácidos essenciais encontrados em maior quantidade. Nos dois últimos produtos chegaram a representar cerca de 70% do total de aminoácidos presentes em todas as amostras. Alguns aminoácidos não essenciais encontrados, como a ornitina e a taurina, embora não façam parte da composição das proteínas, estão envolvidos em importantes ciclos metabólicos bacterianos. Donkor et al. (2006) constataram um aumento significativo na liberação de aminoácidos livres em iogurtes com as cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus paracasei* quando comparados com o iogurte controle, a partir primeiro dia de fabricação e ao longo de 28 dias de estocagem. A atividade proteolítica dos probióticos melhorou a sobrevivência do *Lactobacillus bulgaricus*; por outro lado o aumento do ácido láctico produzido por este organismo afetou a sobrevivência do *B. lactis* e *L. paracasei*, mas não afetou

a sobrevivência de *L. acidophilus* que se mostrou mais resistente ao ambiente ácido.

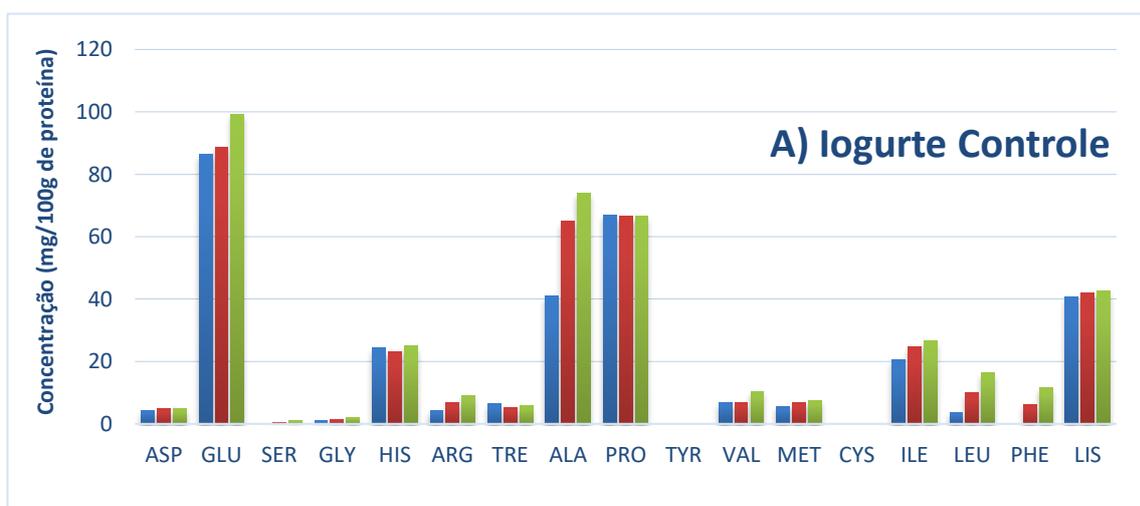
Tabela 5. Perfil dos aminoácidos totais (mg/100g de proteína) dos iogurtes controle, FC1 e FC2 durante o tempo de estocagem (1, 14 e 28 dias).

Aminoácidos Totais	iogurte controle			iogurte FC1			iogurte FC2		
	1	Dias 14	28	1	Dias 14	28	1	Dias 14	28
Ácido Aspártico	8,42	8,00	8,03	8,65	8,62	8,33	8,32	8,20	8,20
Ácido Glutâmico	21,31	21,05	21,10	22,38	22,18	21,02	21,28	21,22	20,87
Serina	5,55	5,55	5,49	5,67	5,62	5,47	5,41	5,29	5,51
Glicina	1,94	1,96	1,94	1,94	1,95	1,88	1,88	1,88	1,93
Histidina	2,46	2,69	2,47	2,90	2,83	2,65	2,74	2,83	2,87
Arginina	3,34	3,39	3,39	3,63	3,65	3,24	3,46	3,43	3,46
Treonina	4,56	4,57	4,56	4,12	3,98	3,62	3,77	3,79	3,97
Alanina	3,34	3,31	3,33	3,34	3,39	3,17	3,29	3,40	3,39
Prolina	9,19	9,20	9,33	8,42	9,94	9,44	9,26	9,26	9,43
Tirosina	4,68	4,80	4,80	5,30	5,16	4,59	4,62	4,74	4,58
Valina	6,12	6,12	6,12	6,51	6,26	6,00	6,08	6,10	5,94
Metionina	2,58	2,63	2,61	2,71	2,55	2,57	2,60	2,55	2,58
Cistina	0,35	0,33	0,27	1,36	1,46	1,17	1,29	1,31	1,24
Isoleucina	5,08	5,05	5,10	5,31	5,15	4,95	4,93	5,07	4,99
Leucina	9,23	9,27	9,30	9,79	9,66	9,23	9,14	9,12	9,12
Fenilalanina	4,61	4,61	4,62	4,89	4,65	4,64	4,35	4,37	4,20
Lisina	7,23	7,33	7,30	8,04	8,07	7,96	7,61	7,62	7,51

Analisando diferentes amostras de iogurtes, Germani et al. (2014) observaram um aumento na quantidade dos aminoácidos histidina, ácido aspártico, treonina, serina, cistina, metionina, fenilalanina e triptofano, concluindo assim que a atividade proteolítica das bactérias do iogurte se manteve durante os 45 dias de estocagem.

A atividade proteolítica das bactérias nos iogurtes continuou ativa durante a vida de prateleira. Os resultados da Tabela 5 mostram que ocorreu a hidrólise com liberação de aminoácidos de caráter ácido, representado principalmente pelo ácido glutâmico.

Pode-se observar que os aminoácidos livres ácido glutâmico, prolina, alanina, lisina, isoleucina e histidina foram os aminoácidos liberados em maior quantidade em ordem decrescente para os iogurtes controle e FC1(Figura 5). A amostra FC2 se diferenciou em relação a quantidade de aminoácidos liberados na seguinte ordem decrescente alanina, ácido glutâmico, prolina, lisina, histidina e isoleucina, sendo a atividade proteolítica mais intensa no primeiro dia em relação ao iogurte controle. Contudo, a amostra controle foi a que mostrou maior atividade proteolítica das bactérias durante o período de estocagem (21,98mg de aminoácidos livres/100g de proteína). Na amostra FC1 a proteólise foi ligeiramente maior nos primeiros 14 dias, liberando 5,32 mg de aminoácidos livres/100g de proteína. Enquanto, para o iogurte FC2 ocorreu maior proteólise com 28 dias de estocagem, liberando 4,18mg de aminoácidos/100g de proteína.



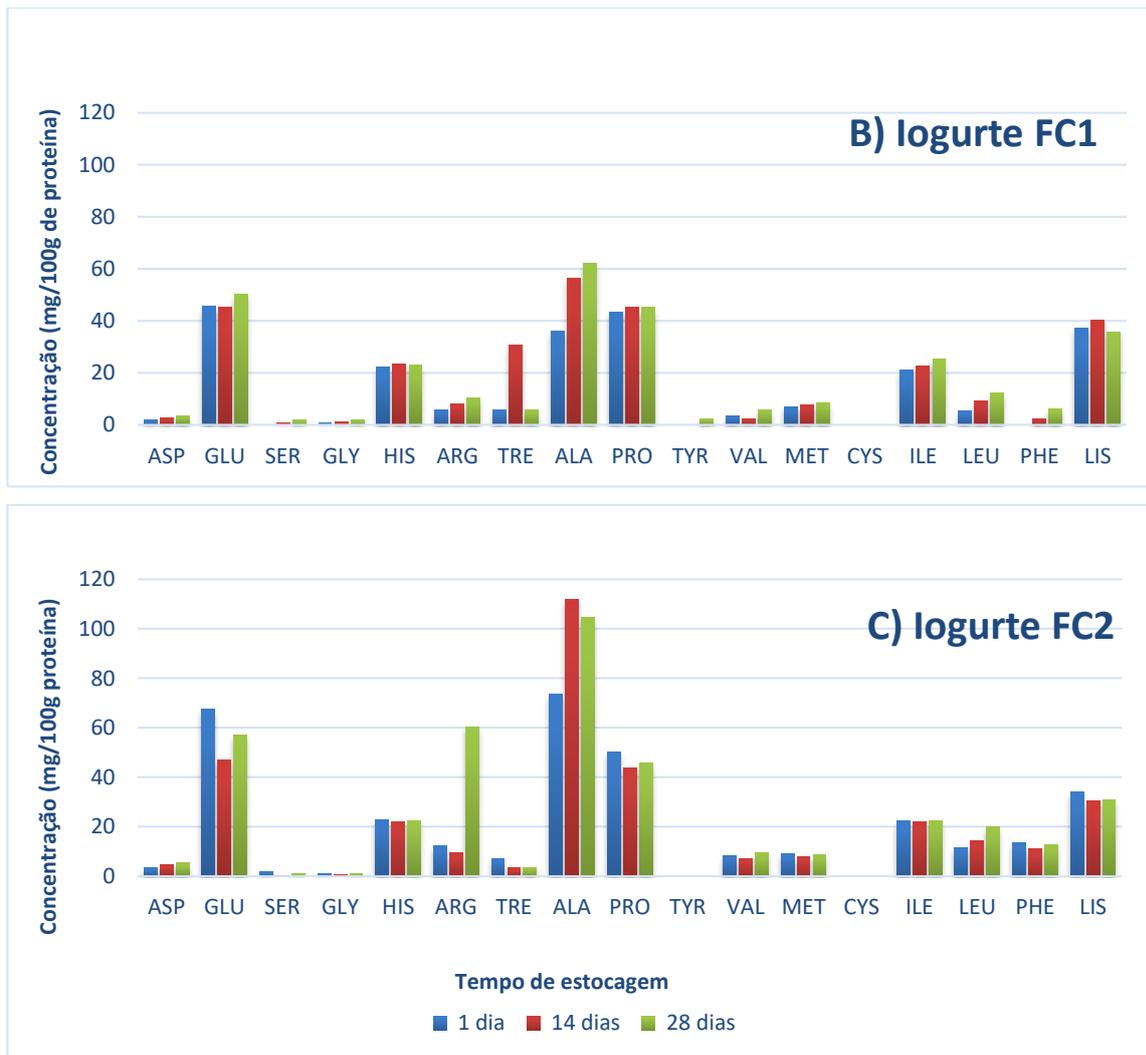


Figura 5 – Variação do perfil dos aminoácidos livres (mg/ 100 g de proteína) durante o tempo de estocagem (1, 14 e 28 dias) para os três tipos de iogurtes: (A) controle, (B) iogurte FC1 e (C) iogurte FC2.

5.3 Avaliação da viabilidade das bactérias *starter* e probiótico

A viabilidade dos microrganismos presentes nos iogurtes foi avaliada ao longo do período de estocagem e os resultados estão apresentados na Figura 6.

De acordo com Akalin et al. (2004) alguns fatores como acidez, pH, peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio, concentração de ácidos lácticos e acéticos e temperatura de estocagem podem afetar a viabilidade das bactérias do iogurte e os probióticos.

As contagens das bactérias *starter Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* no iogurte se mantiveram constantes em todas as amostras, em torno de 8 log UFC/g demonstrando que os microrganismos permaneceram viáveis durante os 28 dias de estocagem refrigerada (Figura 6 A, B). Estas contagens estão de acordo com o estipulado pela legislação vigente (BRASIL, 2007), para iogurtes, que estipula uma contagem mínima de bactérias lácticas totais em iogurte de 10^7 UFC/g.

A contagem do probiótico (bifidobactéria) também se manteve em torno de 8 log UFC/g (Figura 6, C), demonstrando a viabilidade dos microrganismos durante todo o período de estocagem. De acordo com o MAPA (BRASIL, 2007), quando se empregam bifidobactérias em iogurte ou leites fermentados, a contagem deverá ser no mínimo 10^6 UFC/g. Contudo, diversos autores relatam a importância da sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício, em populações elevadas para ser de importância fisiológica ao consumidor, em torno de 6 e 7 log UFC/g de produto (KUMAR; KUMAR, 2016).

As contagens de *St. thermophilus* variaram entre 7,78 log UFC/g e 9,04 log UFC/g. Já as contagens de *L. bulgaricus* variaram entre 7,04 log UFC/g e 8,34 log UFC/g. As contagens de probióticos (*B. Lactis*) variaram entre 7,98 log UFC/g e 10,92 log UFC/g.

Avaliando-se as contagens dos microrganismos em cada formulação, ao longo do período de estocagem verificou-se que as contagens de *S. thermophilus* se mantiveram praticamente constantes ao longo de toda a estocagem e apresentaram valor significativamente inferior após 1 dia de elaboração nos iogurtes controle e FC2. De forma similar observou-se quanto à contagem de *L. bulgaricus* que o iogurte FC2 apresentou um valor inferior significativo com 1 dia de estocagem e no iogurte FC1 a contagem foi inferior com 21 dias de estocagem. Já o probiótico se manteve constante ao longo de todo período de estocagem, em todas as formulações, exceto no iogurte controle significativamente superior com 1 dia de elaboração. Também verificou-se que houve diferença significativa nas contagens do probiótico entre as amostras, sendo que o iogurte controle apresentou contagens superiores aos iogurtes FC1 e FC2 após 1, 7 e 14 dias de elaboração. No entanto, com 21 e 28 dias as contagens não apresentaram diferença significativa entre as três amostras (iogurtes FC1, FC2 e controle).

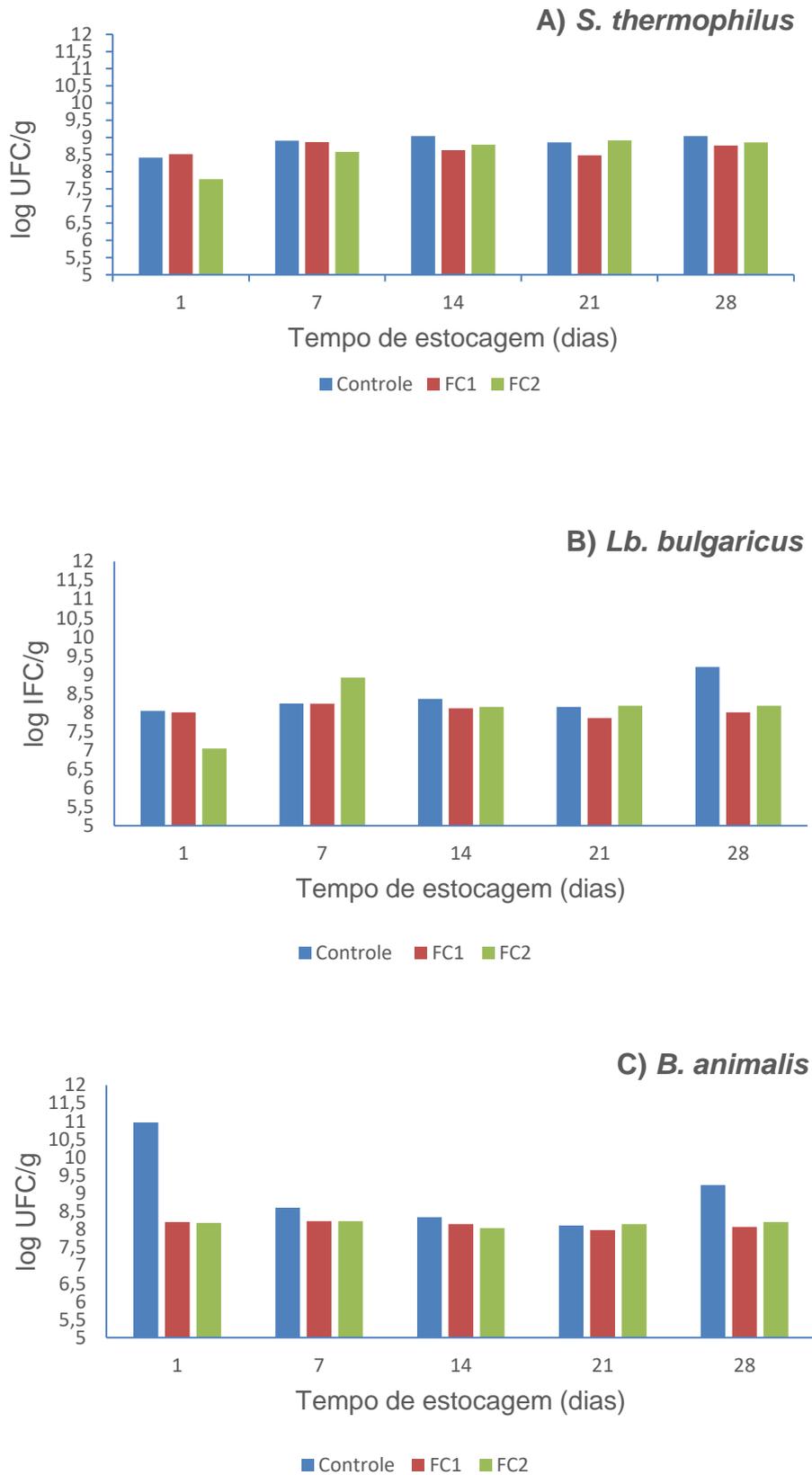


Figura 6 – Viabilidade dos microrganismos (A) *St. thermophilus*, (B) *L. bulgaricus* e (C) *B. animalis* durante o tempo de estocagem dos iogurtes (1, 7, 14, 21 e 28 dias).

Vinderola et al. (2000) também observaram contagens iniciais de bactérias lácticas de $10^8 - 10^9$ UFC/mL em iogurtes com probióticos. Gallina et al. (2018) verificaram contagens em torno de 8 log UFC/mL em iogurte probiótico com frutas vermelhas, empregando bifidobactérias. Akalin et al. (2004) observaram níveis de 10^7 UFC/g em iogurte quando empregaram *Bifidobacterium animalis*, verificando que não houve diferença significativa nas contagens até o final da estocagem, permanecendo dentro do limite recomendado de 1 milhão de células por grama de iogurte durante a estocagem. Tais resultados são similares aos evidenciados neste estudo, com a manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos. Desta forma, apesar do abaixamento do pH e da acidez elevada durante a estocagem, verifica-se a manutenção da viabilidade das bifidobactérias, mesmo em condição desfavorável de pH e acidez.

Ainaz & Ehsani (2008) observaram que, apesar de haver um decréscimo na sobrevivência dos probióticos em iogurtes elaborados com leites ultrafiltrados o número de células viáveis foi maior que o controle, durante o período de estocagem de 21 dias, devido ao maior teor no conteúdo de proteína do iogurte, que favoreceu a sobrevivência dos microrganismos. Kozludzhova et al. (2015) elaboraram iogurtes probióticos (cepa probiótica de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) a partir de leite concentrado por ultrafiltração e observaram que todos os iogurtes tiveram quantidades significantes de células viáveis (acima de 10^{10} UFC/g).

5.4 Análises físicas (sinérese, capacidade de retenção de água e perfil de textura)

A sinérese ocorre quando há liberação espontânea da água do gel acompanhada pela redução do seu volume. Durante este fenômeno rearranjos produzidos pela força entre as moléculas de caseína podem levar à formação de ligações intermoleculares adicionais ocasionando contração do gel e expulsão do líquido (ANTUNES et al., 2004). É uma característica não desejável podendo influenciar negativamente a aceitação do iogurte pelo consumidor

Alguns fatores podem influenciar a sinérese nos iogurtes: 1) proteína: a formação do coágulo e aumento da consistência do produto é diretamente proporcional ao teor de proteína presente; 2) gordura: grandes glóbulos de gordura

presentes nos leites não homogeneizados diminuem a firmeza dos produtos fermentados pelo desarranjo da rede de gel das partículas de caseína; 3) tratamento térmico: melhora a estabilidade do produto diminuindo a separação do soro durante a estocagem pois ocorre uma distribuição uniforme da proteína por todo o iogurte o que resulta em um coágulo firme e menos suscetível à sinérese; 4) acidez: o aumento da acidez pela atividade das bactérias do iogurte durante a estocagem também pode causar sinérese, pois o ácido láctico precipita as partículas de caseína do iogurte; 5) alta temperatura de incubação; 6) agitação durante a formação do gel (RANI et al., 2012; VARELTZIS et al., 2016).

A capacidade de retenção de água determina o quanto as moléculas de uma matriz podem reter de água, com a finalidade de reduzir a liberação de água. Quando o sistema de redes de proteínas do iogurte apresenta baixa capacidade de retenção de água, a sinérese ocorre, resultando na perda de água após algum tempo de armazenamento (KPODO et al., 2014).

As propriedades de textura do iogurte incluem viscosidade, firmeza e sinérese. A viscosidade e firmeza podem ser afetadas pela composição (conteúdo de sólidos totais), tipo de cultura *starter* (algumas são produtoras de exopolissacarídeos) e tratamento térmico. Quando o leite é submetido a temperaturas mais altas em menor tempo, como no tratamento UHT, ocorre a diminuição da viscosidade e da firmeza e menor sinérese no iogurte devido à desnaturação das proteínas do soro (TRACHOO, 2002).

A textura do iogurte pode ser melhorada pelo aumento do teor de sólidos totais do leite (que por sua vez aumenta as propriedades viscoelásticas e a capacidade de retenção de água, reduzindo a sinérese) e pelo uso do sistema de ultrafiltração, que concentra o conteúdo proteico do leite minimizando a necessidade do uso de aditivos para a produção do iogurte (NARAYANA & GUPTA, 2014a).

De acordo com Debon et al. (2012) a firmeza é definida como o pico de força durante o primeiro ciclo de compressão. No iogurte grego o parâmetro de firmeza é uma propriedade que tem grande importância na qualidade do produto final (RAMOS et al., 2009). O índice de consistência representa o grau de resistência do fluido ao escoamento (ALMEIDA et al., 2019). Segundo Penna et al. (1997) o tratamento térmico influencia na consistência do iogurte devido à desnaturação das

proteínas do soro e sua interação com a caseína. A elasticidade é definida como a taxa na qual um material deformado retorna à sua forma original após a remoção da força de deformação aplicada (SHAMSIA & EL-GHANNAM, 2012).

Os valores obtidos nas análises de sinérese e capacidade de retenção de água (CRA) estão na Tabela 6. O iogurte controle foi o que apresentou maior valor de sinérese durante a estocagem. O maior teor de proteínas nos leites concentrados pela ultrafiltração empregados na elaboração dos iogurtes FC1 e FC2 contribuiu para menor sinérese desses produtos.

De acordo com Narayana e Gupta (2014a), a separação espontânea do soro ou sinérese ocorre devido à inabilidade da matriz proteica do gel e iogurte de conter a água. Quando o nível de sólidos totais é baixo, a estrutura da proteína é menos esponjosa e menos densa, e conseqüentemente a estrutura do gel pode não ser capaz de conter toda a água, liberando-a como sinérese do soro. De modo inverso, com o aumento dos sólidos totais pela adição de retentado de leite UF a taxa de proteína/sólidos totais aumenta o que torna a matriz proteica mais densa, e contribui para manter água presa, não ocorrendo, portanto, a sinérese. Isto se justifica uma vez que o controle apresentou maior sinérese, já que apresenta a menor relação proteína/sólidos totais (0,45), em comparação com o iogurte FC2 (0,56) e iogurte FC1 (0,61).

Não houve diferença significativa nas formulações FC1 e FC2 ao longo do período de estocagem. Após 21 dias, a amostra FC1 teve um aumento no valor de sinérese em relação aos demais dias durante a estocagem. No primeiro dia de estocagem não houve uma diferença significativa entre as amostras. Com 7 dias o valor da sinérese do iogurte controle teve um aumento em relação aos iogurtes FC1 e FC2, que permaneceu constante até 28 dias de estocagem refrigerada.

Após um dia de fabricação os iogurtes não apresentaram dessoragem significativa, resultado similar a Caetano Silva et al. (2010), que não observaram este fenômeno no tempo zero de estocagem em iogurte probiótico. Gallina et al. (2018) também verificaram resultados semelhantes no primeiro dia de estocagem de iogurtes probióticos, sendo que a sinérese média na superfície das amostras foi de 0cm; 0,12cm; 0,24cm e 0,38 cm, com 1, 10, 20 e 30 dias de armazenamento. A diminuição da sinérese é um efeito desejável para obtenção de um iogurte estável e de maior aceitabilidade (CAETANO SILVA et al., 2010).

Tabela 6. Análises físicas (sinérese e capacidade de retenção de água) dos iogurtes durante o período de estocagem.

	Dias	1	7	14	21	28
Sinérese (cm)	Controle	0,25±0,21 ^{a, A}	0,33 ± 0,06 ^{a, A}	0,30 ± 0,17 ^{a, A}	0,40 ± 0,10 ^{a, A}	0,33 ± 0,06 ^{a, A}
	FC1	0,0 ^{a, A}	0,0 ^{b, A}	0,0 ^{b, A}	0,23 ± 0,21 ^{ab, A}	0,0 ^{b, A}
	FC2	0,0 ^{a, A}	0,0 ^{b, A}	0,0 ^{b, A}	0,0 ^{b, A}	0,0 ^{b, A}
Capacidade de retenção de água (%)	Controle	72,1±0,20 ^{1bA}	48,75±4,40 ^{bB}	41,54±0,03 ^{b,B}	42,67±0,73 ^{b,B}	41,38±0,5 ^{c,B}
	FC1	87,12±0,10 ^{aA}	80,87±0,73 ^{a,A}	79,98±5,89 ^{a,A}	77,49±5,28 ^{a,A}	81,95±0,17 ^{a,A}
	FC2	70,54±0,06 ^{c,A}	54,84±0,60 ^{b,B}	50,53±1,41 ^{b,B}	47,91±3,78 ^{b,B}	50,63±0,38 ^{b,B}

^A Valores seguidos de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ao longo do tempo de estocagem, ao nível de 5% de significância.

^a Valores seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre as amostras no mesmo tempo de estocagem, ao nível de 5% de significância.

¹ Média dos valores de sinérese (n=3), capacidade de retenção de água (n=2).

EL-Khair (2009) reportou em seu trabalho que iogurtes feitos com incorporação de retentados de leites desnatados obtidos por ultrafiltração tiveram sinérese mínima ao contrário do iogurte controle feito com adição de leite em pó desnatado, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

No primeiro dia de estocagem os três iogurtes diferiam entre si ($p < 0,05$) nos valores na análise de capacidade de retenção de água. Com 7 dias houve uma diminuição da capacidade de retenção de água (CRA) dos iogurtes controle e FC2, no entanto, esta diminuição permaneceu constante durante o período de estocagem não diferindo significativamente. O iogurte FC1 manteve valores de capacidade de retenção de água significativamente superiores aos obtidos para o iogurte controle e FC2, em todos os tempos de estocagem. Além disto, o iogurte FC1 não apresentou diminuição na sua CRA durante a estocagem.

O maior valor de CRA do FC1 também evidencia uma menor possibilidade de dessoragem ao longo de todo o período de estocagem, provavelmente devido ao alto teor de proteína presente neste iogurte. O alto conteúdo de proteína torna a estrutura do gel mais forte, retendo mais água, aumentando a capacidade para retenção da água (NARAYANA & GUPTA, 2013). Pode-se observar que o iogurte controle (padrão) foi o que apresentou o maior decréscimo nos valores de capacidade de retenção de água ao longo da estocagem e conseqüentemente a maior susceptibilidade à sinérese.

A adição de sólidos e o tratamento térmico são fatores que podem influenciar a capacidade de retenção de água nos iogurtes. Sodini et al. (2005) verificaram que iogurtes fortificados com concentrados protéicos de soro tiveram um aumento de 33% para 46% na capacidade de retenção de água. Davanço et al. (2009) compararam o efeito tempo/tratamento térmico em iogurtes firmes e concluíram que iogurtes elaborados com leites tratados a 85°C/20 minutos e 87°C/25 minutos foram os que apresentaram maiores valores de capacidade de retenção de água e menor sinérese.

Narayana & Gupta (2013) observaram que a capacidade de retenção de água do iogurte de manga aumenta significativamente com o aumento no teor de sólidos totais. Aumentando o nível de sólidos totais especialmente proteínas lácteas aumenta a densidade da rede do gel de iogurte e aumenta a capacidade de retenção de água (KRASAEKOOPT et al., 2004). Os iogurtes com 10,8%; 11,0% e

12,0% de sólidos totais apresentaram CRA de 63,71%, 64,96% e 71,53%, respectivamente (NARAYANA & GUPTA, 2013). Já neste estudo obteve-se valores superiores de CRA para os iogurtes controle, FC1 e FC2, os quais continham teores de sólidos totais de 11,35%, 13,92% e 10,79%, respectivamente.

Narayana e Gupta (2013) também elaboraram iogurtes com teor de sólidos totais de 19%, a partir de leite desnatado ultrafiltrado 5 vezes adicionado de creme de leite, cuja capacidade de retenção de água foi significativamente maior (63,93%) quando comparado ao iogurte convencional de manga (53,61%) o que foi atribuído à elevada quantidade de proteína, que tornou a estrutura do gel mais firme e dificultou a exsudação da água

Narayana e Gupta (2014b) verificaram que iogurtes elaborados com leites ultrafiltrados tiveram maiores valores iniciais de capacidade de retenção de água (64,4%), quando comparados com o iogurte controle (58,3%) e observaram que esses valores aumentaram em 6,88% e 9,31% respectivamente após 9 dias de estocagem com posterior queda até 21 dias de estocagem. De modo semelhante, os iogurtes controle e FC2 do presente estudo que apresentavam valores iniciais de 72,11% e 70,54%, respectivamente, tiveram queda dos valores para 48,75 e 54,84% respectivamente após 7 dias e posterior estabilidade até 28 dias de estocagem. O menor teor de proteína e o aumento do período de estocagem contribuíram para a diminuição da CRA nos iogurtes controle e FC2.

A Figura 7 mostra as variações nos parâmetros de textura dos iogurtes ao longo do período de estocagem. A firmeza aumentou significativamente durante a estocagem, para todas as amostras de iogurte. De acordo com Sodini et al. (2004) durante a estocagem pode ocorrer uma mudança na textura, com aumento na firmeza devido a leve acidificação, sinérese, hidratação da proteína e produção de exopolissacarídeos pelas bactérias do fermento. O iogurte FC1 apresentou firmeza significativamente maior que os iogurtes controle e FC2, que não diferiram entre si, em cada período de tempo. A firmeza está diretamente correlacionada com o teor de sólidos do produto, desta forma, como o iogurte FC1 apresenta teor de sólidos totais superior aos demais, isso justifica a maior firmeza observada.

O aumento no teor de proteínas pela ultrafiltração ou suplementação do leite com concentrado proteico do soro ou caseinato confere ao iogurte uma firmeza maior do que quando o leite é apenas suplementado com leite em pó desnatado,

devido à alta concentração de sólidos totais (>10%), resultando em maior relação proteína/sólidos totais (SODINI et al., 2004).

Comparando iogurtes elaborados com leites desnatados ultrafiltrados, Narayana e Gupta (2016) observaram que o iogurte concentrado 1,5 vezes apresentou valor de firmeza ideal (1,89 N) quando comparado ao iogurte concentrado 2 vezes e iogurte controle com valores de firmeza 2,40N e 1,35 N, respectivamente.

Narayana e Gupta (2013) verificaram que a firmeza aumentou com o aumento no teor de sólidos totais; iogurtes com 10,8%, 11% e 12% de sólidos totais tiveram valores de firmeza de 2,59N; 2,89N e 4,60N respectivamente.

A consistência das amostras apresentou variações ao longo do tempo de estocagem sendo que não houve diferença significativa na consistência das amostras de iogurtes FC1 e FC2, com 1 e 28 dias. Já no iogurte controle a consistência se manteve constante, aumentando apenas com 28 dias. Houve diferença significativa na consistência das amostras sendo que o iogurte FC1 apresentou consistência superior aos iogurtes controle e FC2 em todos os tempos de estocagem.

Não houve diferença significativa nos valores de elasticidade entre as amostras de iogurtes controle, FC1 e FC2 em nenhum dos tempos da estocagem. Já verificando cada amostra ao longo do período de estocagem observou-se que a elasticidade da amostra controle se manteve praticamente constante durante a estocagem apresentando um valor levemente e superior com 28 dias de estocagem. A elasticidade das demais amostras se mantiveram sem diferenças significativas durante a estocagem. De acordo com Sandoval-Castilla et al. (2004) o predomínio de proteína na composição do iogurte promove um grande número de ligações caseína-caseína que são quebradas durante a aplicação do estresse e logo reformadas após a liberação do mesmo, o que pode justificar os valores observados para as amostras avaliadas.

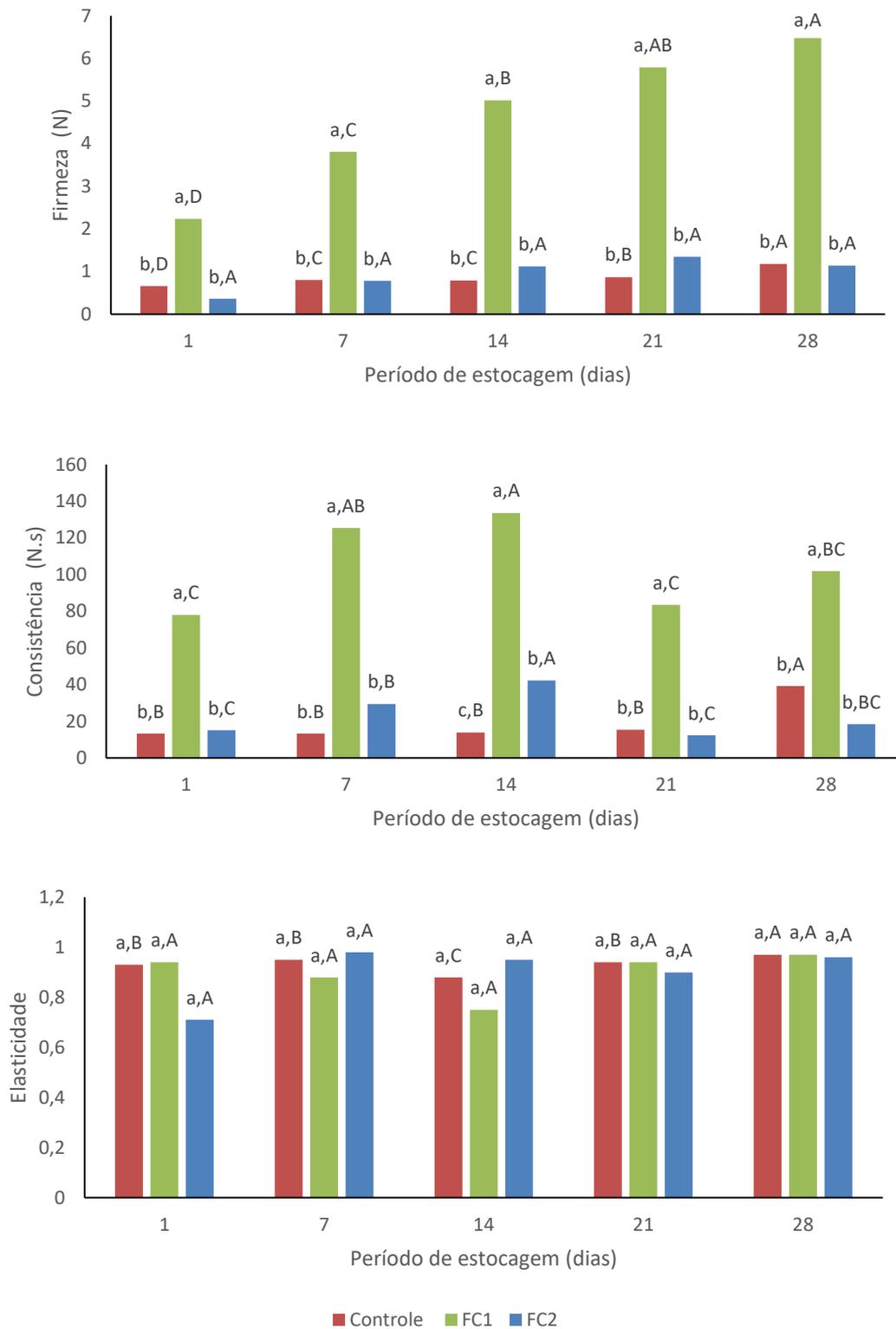


Figura 7 – Variações nos parâmetros de textura nos iogurtes durante o tempo de estocagem: (A) Firmeza, (B) Consistência, (C) Elasticidade.

^A Valores seguidos de letras iguais para cada amostra não diferem estatisticamente entre si ao longo do tempo de estocagem. ^a Valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente entre as amostras no mesmo tempo de estocagem, ao nível de 5% de significância.

Kozludzhova et al. (2015) demonstraram que o iogurte com probiótico elaborado com leite integral ultrafiltrado, com fator de concentração de 2, teve melhor textura que o iogurte com fator de concentração 3. Iogurtes fortificados com leites ultrafiltrados possuem maior viscosidade e firmeza quando comparados com iogurtes produzidos com leite em pó desnatado e leite evaporado (TRACHOO, 2002).

Debon et al. (2012) compararam a textura em leites fermentados, com e sem adição do prebiótico inulina, obtidos a partir de permeados de microfiltração, verificando que o uso da inulina contribuiu para a obtenção de um leite fermentado mais firme que o controle. Iogurtes elaborados a partir de concentrado de ultrafiltração e com retentado de ultrafiltração adicionado de leite obtiveram valores de firmeza variando entre 1,88N e 2,09 N e adesividade entre -2,09N.s e -2,46 N.s, sendo que os iogurtes apresentavam teores de sólidos totais de 13,6% e gordura de 3,3% (NARAYANA e GUPTA, 2014a).

Neste trabalho, o iogurte FC1 elaborado a partir de retentado de UF apresentou valor de firmeza de 2,24 N com 1 dia de fabricação, já os iogurtes controle e FC2, com menor teor de sólidos e proteínas apresentaram conseqüentemente, menor firmeza. Este valor para a amostra FC1 foi ligeiramente superior em comparação aos resultados mostrados pelos autores citados e provavelmente pode ser atribuído não somente aos maiores valores de sólidos totais e proteínas, mas também devido ao menor teor de gordura em FC1.

Magenis et al. (2006) observaram que iogurte elaborado com 80% de retentado de leite desnatado ultrafiltrado adicionado de 20% de retentado de soro de queijo apresentaram menor firmeza (9,60g) e adesividade (-5,41 g.s) e maior coesividade (0,78) quando comparado com iogurte elaborado com 100% de retentado de leite desnatado ultrafiltrado. Para aqueles elaborados somente com leite UF os valores de firmeza (14,14 g) e adesividade (-12,94g.s) foram superiores e a coesividade (0,71) inferior. Os autores atribuíram ao soro de queijo o aumento da coesividade e diminuição da firmeza e adesividade; apenas o atributo elasticidade teve o mesmo valor em ambos os iogurtes (0,91).

Shamsia & El-Ghannam (2012) compararam parâmetros de textura entre iogurte grego elaborado pelo método tradicional (controle) com 5 iogurtes gregos,

elaborados com retentados ultrafiltrados, com e sem adição de permeado concentrado em pó e acidulante glucona delta lactona – GDL. Foram denominados de iogurte 1 e 2, aqueles elaborados só com leite retentado e 2% e 4% de cultura de iogurte respectivamente. O iogurte 3 foi elaborado com leite retentado adicionado de 1% permeado concentrado em pó e 2% de cultura de iogurte; o iogurte 4 foi elaborado com leite retentado, 4% de GDL e 2% de cultura de iogurte; e o iogurte foi 5 elaborado com leite retentado adicionado de 1% permeado concentrado em pó, 1% GDL e 2% de cultura de iogurte. Observou-se que não houve correlação entre a adição de permeado concentrado em pó e GDL nos parâmetros de elasticidade, cujos valores variaram entre 0,938mm a 0,995mm, e adesividade, cujos valores variaram entre -553g.sec. a -723g.sec.; porém a adição de 1% de concentrado permeado diminuiu os valores de coesividade nos iogurtes 3 e 5 (0,391g/cm e 0,414g/cm, respectivamente) quando comparados com os iogurtes 1 (0,445g/cm), 2 (0,459g/cm), 4 (0,427g/cm) e controle (0,427g/cm).

Avaliando a textura de iogurtes gregos elaborados sem e com adição de creme, denominados T1 e T2 respectivamente, Ramos et al. (2009) verificaram que não houve diferença significativa entre os iogurtes para os parâmetros de coesividade e elasticidade; no entanto para os parâmetros associados à adesividade, gomosidade e firmeza foram observados valores maiores no iogurte sem adição de creme (T1), com diferença significativa ao nível de 5% de significância quando comparados ao iogurte (T2), cujos valores inferiores foram atribuídos à interação entre a gordura do creme com outras substâncias do iogurte.

Portanto, os valores de textura são amplamente relacionados ao teor de sólidos e ao conteúdo proteico da matriz, que realiza interações intercadeias das micelas de caseína, como observado para os iogurtes FC1 e controle.

De acordo com Uduwerella (2018) o tratamento térmico do leite concentrado por ultrafiltração antes da fermentação promove a desnaturação das proteínas do soro que interagem com as caseínas fazendo com que ocorra um aumento na dureza do gel pela melhora da capacidade de retenção de água e conseqüentemente diminuição da sinérese.

6. CONCLUSÃO

Os iogurtes obtidos a partir dos leites ultrafiltrados (FC1 e FC2) mostraram teores concentrados de proteínas, os quais podem ser classificados como tipo grego. A composição do iogurte FC1 teve algumas características físicas favorecidas, tais como melhores atributos de textura, maior capacidade de retenção de água e ausência de sinérese quando comparado aos demais. Durante a estocagem ocorreu aumento da acidez e consequente diminuição no pH dos iogurtes, fenômenos considerados normais em produtos lácteos fermentados. Os aminoácidos livres foram liberados ao longo da estocagem, indicando a ocorrência de proteólise. As diferenças físicas e físico-químicas dos iogurtes ultrafiltrados (FC1 e FC2) não impactaram na viabilidade dos probióticos e das bactérias do iogurte, pois o aumento no teor de proteína dos iogurtes favoreceu a sobrevivência das bactérias que se mantiveram estáveis em níveis elevados durante os 28 dias de estocagem refrigerada. A técnica de ultrafiltração se mostrou adequada em elevar os teores de proteínas sem a necessidade de adição de sólidos para elaboração do iogurte tipo grego. Também não reduziu totalmente a lactose disponibilizando o açúcar para a fermentação pelas bactérias, o qual pode ter impactado positivamente na viabilidade destes microrganismos. Estudos posteriores serão necessários para validar os resultados obtidos numa escala piloto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. L. J.; SANTOS, E. R. M.; PEREIRA, T. S.; SANTOS, N. C.; BARROS, S. L.; SILVA, V. M. A.; RIBEIRO, V. H. A.; ALMEIDA, R. D.; SANTIAGO, A. M.; LUIZ, M. R. Bioactive compounds and rheological study of physalis (*P. peruviana*) pulp as a result of maltodextrin concentration. **International Journal of Development Research**, v. 9, n. 8, p. 29205-29210, 2019.

AINAZ, A.; EHSANI, M. R. Probiotic survival in yoghurt made from ultrafiltered skim milk during refrigeration storage. **Research Journal of Biological Sciences**. v.3, n.10, p. 1163-1165, 2008.

ANTUNES, A. E. C.; CAZETO, T. F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n.2, p.107-114, 2004.

AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**. v.39, p.613-621, 2004.

ALMEIDA, M. H. B.; SZOELLNER, S.; CRUZ, A. G.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L. M. J.; FREITAS, M. C. J.; SANT'ANA, A. Potentially probiotic açai yogurt. **International Journal of Dairy Technology**. v.61, p.178-182, 2008.

BARBADOS, Ö. Strategies for yoghurt manufacturing. In: YILDIZ, F. (ed.). **Development and manufacture of yogurt and functional dairy products**. Inglaterra: Boca Raton, CRC Press, 2010, cap. 2, p. 47-96.

BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; ADILOV, E. F. Production of amino acids by yogurt bacteria. **Biotechnology Progress**. v.14, p.963-965, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68 de 12/12/2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. V - Métodos quantitativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2011. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 241, de 26/07/2018, **Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.**

BRAZUELO A.; SUÁREZ E.; RIEIRA, F. A.; ALVAREZ, R. Protein-enriched yoghurt by ultrafiltration of skin milk. **Journal Science of Food and Agriculture.** v. 69, p.283-290, 1995.

BURGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of mono and disaccharides in foods by interlaboratory study: Quantitation of Bias components for liquid chromatography. **Journal of AOAC International,** v. 75, n. 3, p. 443-464, 1992.

BLIGH, E. G. & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.** v.37, p.911-917, 1959.

CAETANO SILVA, M. E. C.; BERTOLDO PACHECO, M. T.; ANTUNES, A. E. C. Estudo da viabilidade tecnológica da aplicação de coacervado de proteínas de soro de leite com carboximetilcelulose em iogurte probiótico. **Brazilian Journal of Food Technology.** v.13, p. 30-37, 2010.

CHEN, C.; ZHAO, S.; HAO G.; YU, H.; TIAN H.; ZHAO,G. Role of acid bacteria on the yoghurt flavour: a review. **International Journal of Food Properties.** v.20, n.1, p.316-330, 2017.

DAVANÇO, F. V.; HARA, E. T.; SATO, R. T.; SIVIERI, K.; COSTA, M. R.; DE RENSIS, C. M. V. B. Avaliação do efeito do tratamento térmico na capacidade de retenção de água do iogurte através da metodologia de superfície de resposta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.** n. 369, v. 64, p. 3-7, 2009.

DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E. S.; PETRUS, J.C.C.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; AMBONI, R. D. M. C.; VIEIRA, C. R. W. Storage stability of prebiotic fermented milk obtained from permeate resulting of the microfiltration process. **Food Science and Technology**. v. 47, p.96-102, 2012.

DIAS, M. L. L. A.; SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; LIVERA, A. V. S.; ANDRADE, S. A. C.; XIMENES, G. N. C. Physicochemical, sensory, and microbiological evaluation and development of symbiotic fermented drink. **Food Science Technology**. Campinas, v.33, n.4, p. 805-811, 2013.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**. v.16, p.1181-1189, 2006.

EUROPEAN PARLIAMENT, 2016. disponível em: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document//E-8-2016-002744ASW_EN.html
Acesso em 06/08/2020.

EL-Khair, A. A. A. Production and evaluation of a high protein version of non-fat yoghurt. **Research Journal of Agriculture & Biological Sciences**. v.5, n.4, p. 310-316, 2009.

FLACH, J., M.B. VAN DER WAAL, A.F.M. KARDINAAL, J. SCHLOESSER, R.M.A.J. RUIJSCHOP; E. CLAASSEN Probiotic research priorities for the healthy adult population: A review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12. **Food Science & Technology**. **Cogent Food and Agriculture**. v.4, n.1, p.1-29, 2018.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. F. (Ed.). **Standard Methods for the examination of dairy products** (17th ed.). American Public Health Association, Washington, D.C., 2004, p. 227-247.

GALLINA, D. A.; ZACARCHENCO, P. B.; ANTUNES, A. E. C. Leites e bebidas funcionais: Um panorama técnico de uma tendência que apresenta enorme potencial de crescimento no mercado lácteo nacional. **Leite & Derivados**, São Paulo, v.20, n.125, p. 66-76, 2011.

GALLINA, D. A.; BARBOSA, P. P. M. Viabilidade de bactérias (starter e probióticas) em bebidas elaboradas com iogurte e polpa de manga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.72, n. 2, p.85-95, 2017.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C. Controle e adequação. In: ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. (eds.) **Brasil Dairy Trends 2020. Tendências do mercado de produtos lácteos**. Campinas: ITAL, p.171-209, 2017.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E. C. Redução de açúcares e lactose em produtos lácteos. **Revista Indústria de Laticínios**. Ano XXII, nº 130, p. 64-66, 2018.

GALLINA, D. A.; ORMENESE, R.C.S.C; GARCIA, A. O. Iogurte probiótico com polpa de frutas vermelhas: caracterização físico-química e microbiológica, aceitabilidade sensorial e viabilidade dos probióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 4, p. 196-208, 2018.

GERMANI, A.; LUNEIA R.; NIGRO, F.; VITIELLO V.; DONINI, L. M.; del BALZO, V. The yogurt amino acid profile's variation during the shelf life. **Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità**. v.26, p.205-212, 2014.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of aminoacids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n.6, p. 912-916, 1989.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERESTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term

probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v.11, p.506-514, 2014.

ILLUPAPALAYAM, V. V.; SMITH, S. C.; GAMLATH, S. Consumer acceptability and antioxidant potential of probiotic-yoghurt with spices. **Food and Science Technology**. v. 55, p.255-262, 2014.

JØRGENSEN, C, E.; ABRAHAMSEN, R. K. RUKKE, E.; HOFFMANN, T. K., JOHANSEN, A.; SKEIE, S. B. Processing of high-protein yoghurt - a review. **International Dairy Journal**. v.88, p.42-59, 2019.

ISOULARI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best practice & research clinical gastroenterology**. v.18, p. 299-313, 2004.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Bulletin of the IDF N° 411/2007**. Selective enumeration of bifidobacteria in dairy products: development of a standard method, 20 p., 2007.

IRIGOYEN, A.; ORTIGOSA, M.; GARCIA, S.; ÍBÁÑEZ, F. C.; TORRE, P. Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. **International Journal of Dairy Technology**. v.65, p. 1-7, 2012.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**. v. 78, p.80-88, 2000.

KAILASAPATHY K., HARMSTORF, I., PHILLIPS M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **Journal of Food Science and Technology**. v. 41, n.7, p.1317-1322, 2008.

KALAB, M.; ALLAN-WOJTAS, P.; and PHIPPS-TODD, B. E. Development of Microstructure in Set-Style Nonfat Yogurt - A Review. **Food Structure**: v. 2, n.1,1983.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A.A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**. v.7, p.58-63, 2016.

KAUR, A., ARORA, M.; PANDOVE G. Probiotics and its health benefits. **Journal of Global Biosciences**, v. 3, n. 3, p. 686-693, 2014.

KOSIKOWSKI, F. V. Low Lactose Yogurts and Milk Beverages by Ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**. v.62, p. 41-46, 1979.

KOZLUDZHOVA, S.; GORANOV, B.; BOYANOVA, P.; YANAKIEVA, V.; DUSHKOVA, M., DINKOV, K. Probiotic yoghurts from ultrafiltered concentrated milk. **Food Technology**. n. 2, p.51- 63, 2015.

KPODO, F. M. K.; AFOAKWA, E. O.; AMOA, B. B.; BUDU, A. S.; SAALIA, F. K. Effect of ingredient variation on microbial acidification, susceptibility to syneresis, water holding capacity and viscosity of soy-peanut-cow milk yoghurt. **Journal of Nutritional Health Food Engineering**. v. 1, n.2, p. 74-79, 2014.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Comparison of texture of yogurt made from convencionally treated milk and UHT milk fortified with low-heat skim milk poder. **Journal of food Science**. v.69, n. 6, p.276-280, 2004.

KUMAR,A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yoghurts using free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* culture. **Journal of Food Science and Technology**. v.53, n.1, p 667-675, 2016.

LATIMER JR., G.W. (Ed.) **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 19th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2012. cap. 9, met. 999.10, p.16-19.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Formation and Physical Properties of Yoghurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v.23, n.9, p.1127-1136, 2010.

LIMA, S. C. G; GIGANTE, M. L. ; ALMEIDA, T. C. A. Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de sólidos nas características sensoriais do iogurte tipo firme. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.8, n.1, p.75-84, 2006.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yoghurt as a probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v.11, p. 1-17, 2001.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; CERQUEIRA JÚNIOR, N. G.; OLIVEIRA, R. V. B.; SOLDI, V.; BENEDET, H. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **Internacional Journal of Food Science and Technology**. v. 41, p.560-568, 2006.

MANTOVANI, F. D.; BASSETO, M. C.; SOUZA, C. H. B.; ARAGON, D. C.; de SANTANA, E. H. W.; PIMENTEL, T. C.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Is there an impact of the dairy matrix on the survival of *Lactobacillus casei* Lc-1 during shelf life and simulated gastrointestinal conditions? **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.100, p.32-37, 2019.

MOINEAU-JEAN, A.; CHAMPAGNE, C. P.; ROY, D.; RAYMOND, Y.; LaPOINTE, G. Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. **International Dairy Journal**. v. 93, p.35-44, 2019.

MORENO-MONTORO, M.; OLALLA, M.; GIMÉNEZ-MARTINEZ, R.; BERGILLOS-MECA, T.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; CABRERA-VIQUE, C.; ARTACHO, R.; NAVARRO-LARCÓN, M. Ultrafiltration of skimmed goat milk increases its nutritional value by concentrating nonfat solids such as proteins, Ca, P, Mg and Zn. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 7628-7634, 2015.

NARAYANA, N.M.N.K.; GUPTA, V.K. Effect of total milk solid content adjusted by adding ultrafiltered milk retentate on quality of set mango yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**. v.66, p.570-575, 2013.

NARAYANA, N.M.N.K.; GUPTA, V.K. Quality of cow milk plain set yoghurt as affected by ultrafiltration process. **Tropical Agricultural Research & Extension**. v.16, n. 3, p.74-80, 2014a.

NARAYANA, N.M.N.K.; GUPTA, V.K. Effect of refrigerated stored on quality of set yoghurt made from ultrafiltered milk. **Proceedings of Jaffna University International Research Conference**. p. 5-11, 2014b.

NARAYANA, N.M.N.K.; GUPTA, V.K. Quality of plain set yoghurt as affected by levels of ultrafiltration concentration of milk and inoculum of yoghurt culture. **Food Science and Technology**, n.4, v.6, p. 508-514, 2016.

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, n.1, p.1-21, 2002.

OZER, B. H.; ROBINSON, R. K.; GRANDINSON, A. S.; BELL, A. E. Gelation properties of milk concentrated by different techniques. **International Dairy Journal**. v.8, p.793-799, 1998.

PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, M. N.; BARRUFALDI, R. Análise de consistência de iogurte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.17, n.2, p.98-101, 1997.

PIMENTEL, T. C.; ANTUNES, A. E. C.; ZACARCHENCO, P. B.; CORTEZ, M. A.; BOGSAN, C. S. B.; OLIVEIRA, M. N.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G. Brazilian yoghurt -like products. In: **Yoghurt in health and disease prevention**. p.331-351, cap. 19, 2017.

PREMARATNE, R. J.; COUSIN, M. A. Changes in the chemical composition during ultrafiltration of skim milk. **Journal of Dairy Science**. v. 74, p.788-795, 1991.

PRICE, W. J. & ROOS, J. T. H. . Analysis of fruit juice by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.20, p.437-439, 1969.

RAMOS, T. M.; GAJO, A. A.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; PINHEIRO, A. C. Perfil de textura de Labneh (iogurte grego). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. n. 369, v.64, p. 8-12, 2009.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S. K. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. **Food Chemistry**. n.135, p.1411–1418, 2012.

RANI, R.; UNNIKRISHNAN, V.; DHARAIYA, C. N.; SINGH, B. Factors affecting syneresis in yoghurt: a review. **Indian Journal of Dairy and Biosciences**. v. 23, 2012.

REIS, S. M.; PINTO, M. S.; BRANDI, I. V. Efeito no teor de sólidos não gordurosos e da concentração de sacarose na acidificação do iogurte por bactérias lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. n.378, p.34-39, 2011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; AGUIRRE-MANDUJANO, E.; VERNON-CARTER, E. J. Microstructure and texture of yoghurts as influenced by fat replacers. **International Dairy Journal**. v. 14, p.151-159, 2004.

SHAMSIA, S. M.; EL-GHANNAM, M. S. Manufacture of labneh from cow's milk using ultrafiltration retentate with or without addition of permeate concentrate. **Alexandria Science Exchange Journal**. v. 33, p.26-32, 2012.

SODINI, I.; REMEUF, F.; HADDAD, S.; CORRIEU, G. The relative effect of milk base, starter ad process on yogurt texture: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.44, p.113-137, 2004.

SODINI, I.; MATTAS, J.; TONG, P. S. Influence of pH and heat treatment of whey protein concentrates in yoghurt. **International Dairy Journal**. v. 16, p.1464-1469, 2005.

TAMIME, A.Y.; DEETH, H. C. Yoghurt: Technology and Biochemistry. **Journal of Food Protection**, vol. 43, nº 12, p. 939-977, 1980.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Background to manufacturing practice. In: **Yoghurt: science and technology**. Fisrt ed., Inglaterra, Pergamon Press, cap 2, 1985, p.7-89.

TAMIME, A.Y.; DAVIES, G.; CHEHADE, A. S.; MAHDI, H. A. The production of 'Labneh' by ultrafiltration: a new technology. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.42, n. 2, p.35-39, 1989.

TAMIME, A. Y.; KALÁB, M.; DAVIES G.; MAHDI, H. A. Microstructure and firmness of Labneh (hight solids yoghurt) made from cow's, goat's and sheep's milks by a tradicional method or by ultrafiltration. **Food Structure**.v.10, p. 37-44, 1991.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Background to manufacturing practice **In: Yoghurt: science and technology**. 2nd ed. Inglaterra, Boca Reaton: CRC Press,1999, cap 2, p.11-128.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Background to manufacturing practice. **In: Tamime and Robinson' yoghurt: science and technology**. 3rd, USA, Boca Raton: CRC Press, 2007, cap 2, p.13-161.

TAMIME, A.Y. Technology of Evaporators, Membrane Processing and Dryers In: **Dairy powders and concentrated products**. Chichester, U.K.: Wiley-Blackwell, 2009, cap.3, p. 99-148.

TAMIME, A. Y.; HICHEY, M.; MUIR, D.D. Strained fermented milks – A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. **International Journal of dairy Technology**. v.67, n.3, p.305-333, 2014.

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7251**: Microbiology of food and animal stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique. 3rd ed., 2005.

THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 4831**: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms - Most probable number technique, 3rd ed., 2006.

TRACHOO N. Yogurt: The fermented milk. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 24, n. 4, p.727-737, 2002.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

UDUWERELLA, G.; CHANDRAPALA, J.; TODOR, V. Preconcentration of yoghurt base by ultrafiltration for reduction in acid whey generation during Greek yoghurt manufacturing. **International Journal of dairy Technology**. v.71, n. 1, p. 71-80, 2018.

VALENCIA, A. P.; DOYEN, A.; BENOIT, S.; MARGNI, M.; POULIOT, Y. Effect of ultrafiltration of milk prior to fermentation on mass balance and process efficiency in greek-style yogurt manufacture. **Foods**. v.7, n.144, p.1-10, 2018.

VARELTZIS, P.; ADAMOPOULOS, K.; STAVRAKAKIS, E.; STEFANAKIS, A.; GOULA, A. M. Approaches to minimize yoghurt syneresis in simulated tzatziki sauce preparation. **International Journal of dairy Technology**. v. 69, n. 2, p.191-199, 2016.

VIALTA, A.; REGO, R. A. (Ed.). **Brasil Ingredients Trends 2020**. Campinas: ITAL, 389p.2014.Disponível:<http://www.brasilingredientstrends.com.br/files/assets/basic-html/page-81.html#>. Acesso 06/08/2020.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**. v. 33, p. 97-102, 2000.

WEERATHILAKE, W. A. D. V.; RASIKA, D. M. D.; RUWANMALI, J. K. U.; MUNASINGHE, M. A. D. D. The evolution, processing, varieties and health benefits of yoghurt. **International Journal of Scientific and Research Publications**. v. 4, p.1-9, 2014.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v.8, n.4, p. 170-177, 1986.

YILDIZ, F. **Development and Manufacture of Yogurt and Funcional Dairy Products**. CRC Press, 2010, p.58-62.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; REGO, R. A. (Ed). **Brasil Dairy Trends 2020**. Campinas: ITAL, 243p., 2017. Disponível em: <http://brasildairyrends.com.br/60/#zoom=z>. Acesso 06/08/20.