



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

VIABILIDADE DE CULTURAS PROBIÓTICAS EM BEBIDA CARBONATADA À BASE DE SORO

Isabele de **Oliveira**¹; Fabiana Kátia Helena de Souza **Trento**²; Leila Maria **Spadoti**³; Patrícia Blumer **Zacarchenco**⁴; Adriana Torres **Silva e Alves**⁵

Nº 16214

RESUMO – Atribui-se às proteínas do soro grande valor nutricional, em razão de sua composição rica em aminoácidos essenciais com alta biodisponibilidade. Apesar das inúmeras vantagens que o soro de queijo apresenta em termos nutricionais ele também possui um forte efeito poluente, devido a sua elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Por esses motivos, as indústrias de alimentos têm procurado utilizar o soro de queijo na formulação de produtos alimentícios. As bebidas com adição de probióticos são cada vez mais populares e vão impulsionar o crescimento do mercado nos próximos anos. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade e estabilidade de culturas probióticas em uma bebida funcional carbonatada pasteurizada desenvolvida à base de soro de queijo. Em uma etapa preliminar foi definida a cultura probiótica a ser adicionada. A produção de bebida carbonatada à base de soro de queijo, adicionada de probióticos, mostrou-se uma tecnologia simples e o produto adequado para incorporação da cultura avaliada. A cultura adicionada, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, apresentou boa viabilidade e estabilidade durante a estocagem (25 dias a 4 °C ± 2). A bebida obtida apresentou qualidade microbiológica adequada e contagens dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Palavras-chaves: Alimento funcional, soro de queijo, subprodutos, bebidas, probióticos.

1 Autor: Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUCC, Campinas-SP; isabeleoli_@hotmail.com

2 Colaborador: Assistente de Pesquisa TECNOLAT-ITAL

3 Colaborador: Pesquisador TECNOLAT-ITAL

4 Colaborador: Pesquisador TECNOLAT ITAL

5 Orientador: Pesquisador do TECNOLAT-ITAL, Campinas - SP; atorres@ital.sp.gov.br



ABSTRACT- *Whey proteins have high nutritional value, due to its composition rich in essential amino acids with high bioavailability. Despite the countless advantages that cheese whey present in nutritional terms, it also has a strong polluting effect due to its high biochemical oxygen demand (BOD). For these reasons, food manufacturers have sought to use the whey in the formulation of food products. Beverages added with vitamins, probiotics, prebiotics, minerals and bioactive compounds (antioxidants) with healthiness functions are increasingly popular and will drive market growth in the coming years. This work aimed to evaluate the viability and stability of probiotic cultures in a carbonated functional pasteurized beverage developed from cheese whey. In a preliminary step it was defined the probiotic culture to be added. The production of carbonated beverage based on cheese whey, added of probiotic, proved to be a simple technology and the product suitable for incorporation of the evaluated culture. The added culture, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, showed good viability and stability during storage (25 days at 4 °C ± 2). The beverage obtained showed adequate microbiological quality and counts within the standards required by law.*

Keywords: Functional food, whey, byproducts, beverages, probiotics.

1 INTRODUÇÃO

O soro retém mais da metade dos nutrientes do leite, os quais são representados por sais, vitaminas, lactose, enzimas, e proteínas ricas em aminoácidos essenciais com alta biodisponibilidade (MELLO, 1989). Além disso, as proteínas do soro destacam-se pelo fato de grande parte delas serem precursoras de peptídeos biologicamente ativos, os quais podem produzir vários efeitos fisiológicos benéficos no corpo humano, podendo atuar no sistema imune, no nervoso e principalmente no cardiovascular (SPADOTI *et al.*, 2011). Apesar das inúmeras vantagens que o soro de queijo apresenta em termos nutricionais ele também possui um forte efeito poluente, devido a sua elevada demanda bioquímica de oxigênio.

Por esses motivos, uma alternativa que as indústrias de alimentos têm empregado, é utilizar o soro de queijo na formulação de diversos produtos alimentícios suplementados de vitaminas, probióticos, prebióticos, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2002). As bebidas com adição de vitaminas, probióticos, prebióticos, minerais e compostos bioativos (antioxidantes) com funções de



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

saudabilidade são cada vez mais populares e vão impulsionar o crescimento do mercado nos próximos anos (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008).

Bebidas carbonatadas são produtos com grande aceitabilidade junto ao mercado consumidor. Uma das matérias-primas utilizadas na elaboração do produto em questão pode ser o soro de queijo. O processo de carbonatação é barato, seguro, e aparentemente, não tem nenhum efeito negativo sobre os produtos lácteos (PAULA, 2005). A adição de probióticos ao produto pode agregar maior funcionalidade a um produto que já conta com os benefícios do soro. O desenvolvimento de produtos lácteos contendo bactérias probióticas é um foco importante do setor industrial, e geralmente, a produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas com concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida de prateleira é um desafio tecnológico (KOURKOUTAS *et al.*, 2005).

Assim este trabalho teve como objetivo desenvolver uma bebida funcional carbonatada à base de soro de queijo adicionada de probióticos e acompanhar a viabilidade dessas culturas durante a estocagem.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Testes preliminares e processamentos da bebida em Planta Piloto

O trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios (TECNOLAT) do ITAL. Foi necessária a realização de uma primeira etapa onde foram feitos testes preliminares para definição da cultura probiótica a ser adicionada à bebida. Foram avaliados 2 tipos de culturas probióticas, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen), e *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Chr. Hansen). Numa segunda etapa do trabalho foram realizados os processamentos em planta piloto.

A fabricação da bebida na primeira e segunda etapa do trabalho foi realizada conforme a seguinte metodologia: Utilizou-se em todas as fabricações, soro doce, proveniente da fabricação de queijo Minas Frescal. A bebida foi elaborada, a partir do soro, açúcar, citrato de sódio (estabilizante), ácido fumárico e ácido cítrico (acidulantes), sorbato de potássio (conservante), aromatizante e pectina (estabilizante) e adicionada da cultura probiótica. O processamento da bebida foi realizado de acordo com Fluxograma representado na Figura 1.

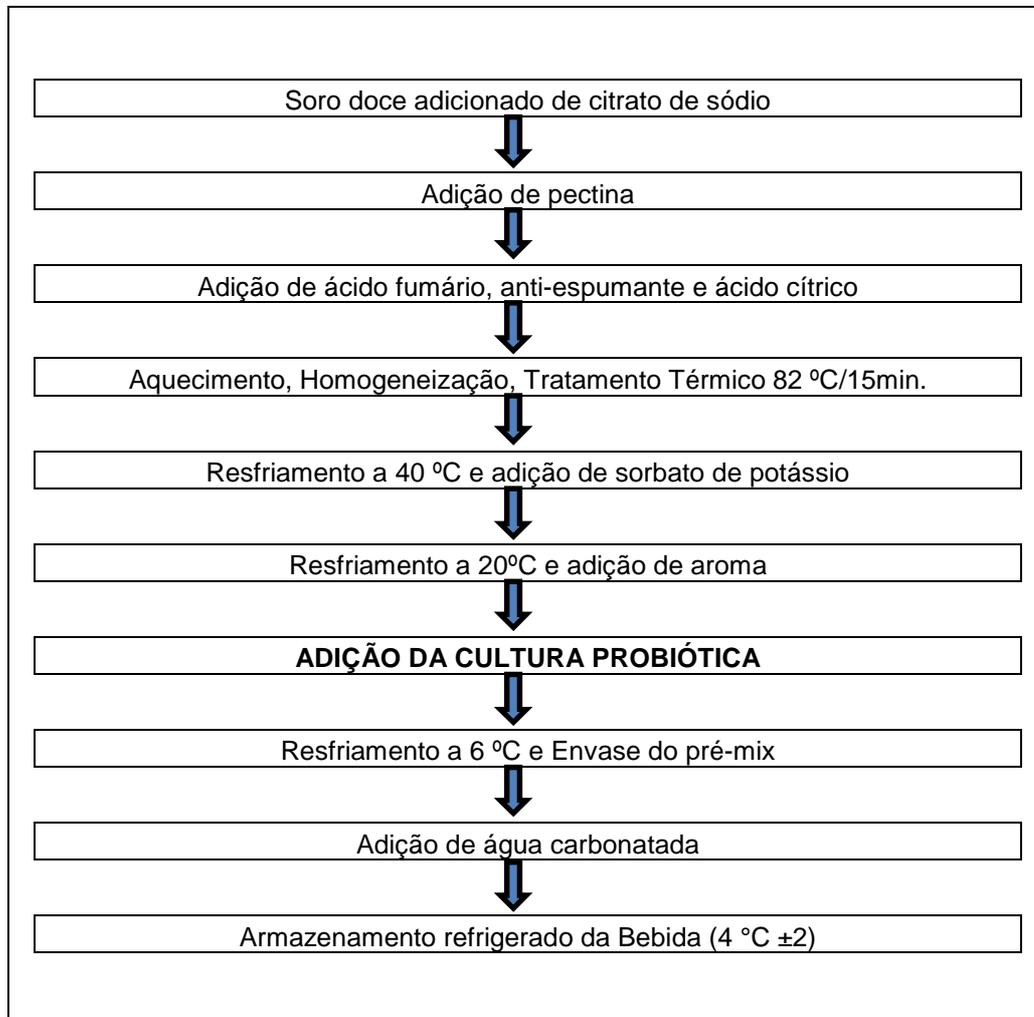


Figura 1. Representação esquemática do processamento da bebida carbonatada a base de soro com adição de probiótico.

2.2. Determinações Analíticas

Foram feitas análises da bebida, logo após a fabricação, para verificação da qualidade microbiológica da mesma, segundo a APHA (2004). As análises realizadas foram determinação de coliformes a 30 °C e a 45 °C ou termotolerantes, contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, bolores e leveduras e detecção de *Salmonella sp.* Além disso, a viabilidade da cultura probiótica, o pH e a acidez foram avaliados semanalmente durante a estocagem refrigerada de 28 dias. Os experimentos foram repetidos por duas vezes.



2.3. Contagem das culturas probióticas em meios seletivos

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* La-5, utilizou-se o meio MRS ágar (Difco) adicionado de clindamicina (Sigma) (CASTEELE, 2006). Para a análise de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 foi utilizado o Ágar MRS (Difco) suplementado com Dicloxacilina (Sigma), Cloreto de Lítio (Vetec) e L-cisteína (Inlab) (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004). Em ambas as contagens, a sementeira foi feita por profundidade e incubação anaeróbia (Anaerogen, Oxoid) a 37 ± 1 °C por 72 ± 3 horas. Foram feitos testes de catalase e coloração de Gram (LABORCLIN), para confirmação de Gram positivo, e verificação de morfologia característica (HARRIGAN, 1998).

2.4. Valores de pH e Acidez Titulável

O pH foi medido em potenciômetro digital modelo Micronal – B 474. A acidez foi realizada por titulação com NaOH 0,1N e expressa em % de ácido láctico (% AL) (BRADLEY *et al.*, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes preliminares: Escolha da cultura probiótica

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos nos testes preliminares de preparo da bebida carbonatada em escala laboratorial. Estão apresentados os resultados das bebidas fabricadas com adição das duas culturas probióticas e estocadas em câmara fria por 1, 7, 14, 21, e 25 dias.

Tabela 1. Resultados da contagem de *Lb.acidophilus* La-5 e *Bf. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e valores de pH na bebida carbonatada durante o armazenamento refrigerado.

Tempo	<i>Bf. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	Resultados (UFC/ mL) ^{ab}	pH	Resultado (UFC/ mL) ^{ab}	pH
1 dia	$1,5 \times 10^7$	4,23	$1,1 \times 10^7$	4,22
7 dias	$1,7 \times 10^7$	4,13	$3,9 \times 10^6$	4,13
14 dias	$3,8 \times 10^6$	4,25	$5,5 \times 10^5$	4,15
21 dias	$2,4 \times 10^5$	4,02	$1,0 \times 10^3$	3,94
25 dias	$5,2 \times 10^5$	4,06	$2,5 \times 10^3$	3,99

^a UFC/ mL – Unidade formadora de colônia por mL da amostra

^b Valores médios da análise em duplicata

Observa-se na Tabela 1 que a cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* apresentou menor viabilidade durante a estocagem, apresentando uma queda de 4 ciclos enquanto que a cultura de *Bifidobacterium animalis* apresentou uma queda de dois ciclos. Quanto ao pH, as proteínas do soro do leite segundo Santos (2004), possuem um forte poder tamponante, assim a



alteração observada pela medida do pH foi pequena. Com base nesses resultados definiu-se a cultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* como a cultura a ser adicionada à bebida.

3.2 Processamentos em escala piloto da bebida adicionada da cultura probiótica

Após a definição da cultura probiótica foram realizados os processamentos da bebida em escala piloto. Os resultados das análises higiênicas sanitárias das bebidas são apresentados na Tabela 2 e da viabilidade da cultura, pH e acidez durante a estocagem na Tabela 3. A morfologia apresentada pela cultura probiótica adicionada à bebida pode ser visualizada na Figura 2 e a etapa de adição da mesma na Figura 3.

Tabela 2. Resultados das Análises higiênicas - sanitárias da bebida carbonatada à base de soro.

Microrganismo	Resultados
Contagem total de aeróbios mesófilos (UFC/ mL) ^a	< 1 ^c
Contagem total de aeróbios psicotróficos (UFC/ mL)	< 1 ^c
Coliformes a 30-35 °C (NMP/ mL) ^b	< 0,3 ^c
Coliformes a 45 °C (NMP/ mL)	< 0,3 ^c
<i>Salmonella</i> spp (presença/ ausência em 25ml)	Ausente
Bolores e leveduras (UFC/ mL)	< 1 ^c

^aUFC/ mL – Unidade formadora de colônia por mL da amostra ^cValor estimado, abaixo do limite de detecção do método

^bNMP/ mL – Número mais provável por mL da amostra

Tabela 3. Resultados das contagens de *Bf. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e determinação do pH e acidez titulável da bebida carbonatada.

Tempo	Resultados (UFC/ mL) ^{ab}	Morfologia celular e coloração de Gram	Catalase	pH	Acidez titulável (% Ac. láctico)
0 dias	2,8 x 10 ⁷	Bastonetes curtos e curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa	3,98	0,52
7 dias	6,6 x 10 ⁶	Bastonetes curtos e curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa	3,95	0,51
14 dias	7,1 x 10 ⁶	Bastonetes curtos e curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa	3,95	0,47
21 dias	1,2 x 10 ⁷	Bastonetes curtos e curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa	4,05	0,56
28 dias	7,7 x 10 ⁶	Bastonetes curtos e curvados e com arranjo típico para bifidobactérias G+	Negativa	4,07	-

^a UFC/ mL – Unidade formadora de colônia por ml da amostra
G+: Microrganismos Gram positivos

^b Valores médios da análise em duplicata

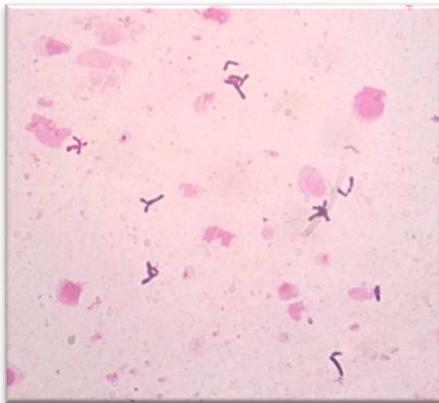


Figura 2. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 presente na bebida carbonatada em objetiva de 1000x



Figura 3. Adição da cultura probiótica, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, ao pré mix

De acordo com a Tabela 2 observa-se qualidade microbiológica adequada para o produto. Estando os resultados de acordo com os padrões exigidos pela legislação brasileira para bebidas lácteas. Além disso, de acordo com a Tabela 3, pode-se observar que a cultura probiótica, *B. animalis*, adicionada à bebida, apresentou boa viabilidade durante o armazenamento do produto, com contagens entre $2,8 \times 10^7$ e $7,7 \times 10^6$ UFC/ mL (final estocagem).

De acordo com a ANVISA (2016) a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo. Se considerarmos uma recomendação diária para bebida de 200 mL (1 copo), seriam consumidas em torno de 10^9 - 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) do probiótico *B. animalis* diariamente presentes na bebida carbonatada à base de soro adicionada de probióticos.

4 CONCLUSÕES

A cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 foi selecionada para produção da bebida em escala piloto, já que a mesma apresentou boa viabilidade durante a estocagem e não conferiu sabor estranho ao produto.

A produção de bebida carbonatada à base de soro de queijo adicionada de probióticos mostrou-se uma tecnologia simples e o produto adequado para incorporação da cultura avaliada. A bebida obtida apresentou qualidade microbiológica adequada e estabilidade durante a estocagem.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

Na bebida carbonatada adicionada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB12), estocada a $4 \pm 2^{\circ}$ C, o número de bactérias viáveis da cultura probiótica mostrou-se dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira, o que poderá proporcionar efeitos benéficos aos consumidores e conferir ao produto a alegação de funcional.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa PIBIC e ao ITAL-TECNOLAT pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS

- ANVISA. Comissões Tecnocientíficas de Acesso em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**: lista das alegações aprovadas. 2016. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 22/05/2016.
- A.P.H.A. 2004. *Standard methods for the microbiological examination of dairy products*. 17th ed. **American Public Health Association. Washington, D.C.**
- BRADLEY, R. L. *et al.* Chemical and physical methods. In: MARSHALL, R.T. (Ed) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 1992, **American Public Health Association, Washington**, p. 433 – 529.
- CASTEELE, S. V.; VANHEUVERZWIJN, T.; RUYSSSEN, T.; VAN ASSCHE, P.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1470-1476, 2006.
- HARRIGAN, W.F. **Laboratory methods in food microbiology**. Academic Press, San Diego, 1998.
- KOURKOUTAS Y, XOLIAS V, KALLIS M, BEZIRTZOGLU E, KANELLAKI M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochem.**, v. 40, n.1, p. 411- 416, 2005.
- MELLO, E. M. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de soro por ultrafiltração**. 1989. Dissertação (Mestrado) - UNICAMP, Campinas.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probiótico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, São Paulo, 2002.
- PAULA, J.C.J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. Tese. Universidade Federal de Viçosa, 2005, 57p.
- PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas, **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFM, 2008.



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-135-6

SANTOS, M. V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In : DURR, J. W. ; CARVALHO, M. P. ; SANTOS, M. V. ; **O compromisso com a qualidade do leite**. Passo Fundo : Editora UPF, v.1, p269-283, 2004.

SPADOTI, L. M. et al. Peptídeos bioativos obtidos de proteínas do soro de queijo: potenciais ingredientes de alimentos promotores de saúde. **Indústria de Laticínios**, v. XV, p. 80-83, 2011.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 151-156, 2004.