



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM DESSALINIZAÇÃO**

**ELÓI DUARTE DE MÉLO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CULTURAS LÁCTEAS  
BIOCONSERVANTES NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,  
MICROBIOLÓGICAS, REOLÓGICAS E DE TEXTURA DO IOGURTE**

**CAMPINA GRANDE-PB  
2024**

ELÓI DUARTE DE MÉLO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CULTURAS LÁCTEAS  
BIOCONSERVANTES NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,  
MICROBIOLÓGICAS, REOLÓGICAS E DE TEXTURA DO IOGURTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Kepler Borges França

CAMPINA GRANDE-PB

2024

M528a

Mélo, Elói Duarte de.

Avaliação do efeito da adição de culturas lácteas bioconservantes nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e de textura do iogurte / Elói Duarte de Mélo. – Campina Grande, 2024.

149 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2024.

“Orientação: Prof. Dr. Kepler Borges França”.

Referências.

1. Iogurte – Armazenamento.
2. Bioconservantes Comerciais.
3. FRESHQ-11 (*Lactobacillus rhamnosus*).
4. HOLDBAC-YMB (*L. Rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*).
5. Meio Ambiente – Recursos Regionais. I. França, Kepler Borges. II. Título.

CDU 637.146.34(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
UNIDADE ACADEMICA DE ENGENHARIA QUIMICA  
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900  
Telefone: (83) 2101-1100  
Site: <http://cct.ufcg.edu.br>

## REGISTRO DE PRESENÇA E ASSINATURAS

ATA DA DEFESA PARA CONCESSÃO DO **GRAU DE DOUTOR** EM ENGENHARIA QUÍMICA,  
REALIZADA EM 29 DE NOVEMBRO DE 2024

(Nº 146)

CANDIDATO(A): **Elói Duarte de Mélo**. COMISSÃO EXAMINADORA: Bruna da Silveira Guimarães, Pesq., Dr<sup>a</sup>., UFCG/ **Presidenta da Sessão** e Examinadora Interna, Kepler Borges França, Prof., Dr., UFCG/ **Orientador**, Henrique César da Silva, Prof., Dr., IFPB/ Examinador Externo , Thaísa Abrantes Souza Gusmão, Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., UFCG /Examinadora Externa, Márcia Izabel Cirne França, Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., UEPB/Examinadora Interna. TITULO DA TESE: “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE CULTURAS LÁCTEAS BIOCONSERVANTES NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, REOLÓGICAS E DE TEXTURA DO IOGURTE”. ÁREA CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos Químicos - HORA DE INÍCIO: **09:00 horas** – LOCAL: Auditório do LABDES. Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o(a) candidato(a) **Elói Duarte de Mélo** foi arguido(a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização, no tema de sua tese, sendo **APROVADO**. Face à aprovação, declara o(a) Presidente da Comissão, achar-se a examinada, legalmente habilitado a receber o **Grau de Doutor**, no domínio da Engenharia Química, cabendo a Universidade Federal de Campina Grande, como direito, providenciar a expedição do Diploma, o que o mesmo faz jus. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata, que é assinada por mim, Maricé Pereira de Araújo - Secretária - do PPGEQ e os membros da Comissão Examinadora e o(a) candidato(a). Campina Grande, 29 de novembro de 2024.

MARICÉ PEREIRA DE ARAÚJO

Secretária

runa da Silveira Guimarães, Pesq., Dr<sup>a</sup>., UFCG  
Presidenta da Comissão e Examinador Interno

Kepler Borges França, Prof., Dr., UFCG  
Orientador

Henrique César da Silva, Prof., Dr., IFPB  
Examinador Externo

Tháisa Abrantes Souza Gusmão, Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>., UFGG  
Examinadora Externa

Márcia Izabel Cirne França, Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>.,UEPB  
Examinador Externo

Elói Duarte de Mélo  
Candidato



Documento assinado eletronicamente por **KEPLER BORGES FRANCA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 03/12/2024, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna da Silveira Guimarães, Usuário Externo**, em 03/12/2024, às 13:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA IZABEL CIRNE FRANÇA, Usuário Externo**, em 03/12/2024, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARICE PEREIRA DA SILVA, SECRETÁRIA**, em 04/12/2024, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **HENRIQUE CÉSAR DA SILVA, Usuário Externo**, em 05/12/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **ELÓI DUARTE DE MELO, Usuário Externo**, em 05/12/2024, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAISA ABRANTES SOUZA GUSMAO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2024, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **5005920** e o código CRC **B048CBF1**.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. Isaac Newton

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado os dons do Espírito Santo da ciência e da sabedoria que me conduziram até aqui, sem Ele, eu não seria nada!! Também agradeço a minha família, em especial a minha esposa Francisca Melo e meus filhos Matheus Alonso e Thiago Elói, pelos incentivos e paciência nos momentos necessários “sem tibungos”. Também a minha mãe Margarida e meus irmãos Edilson e Eliene. Ao grande professor Dr. Kepler Borges França, meu pai acadêmico, pelas grandes orientações e ensinamentos, bem como os professores de Engenharia de Alimentos, Dra. Thaísa Gusmão e Dr. Rennan Gusmão, pelas contribuições e orientações e também aos colegas do LABDES e do Laboratório de Engenharia de Alimentos, em especial a Renata Duarte e Pedro Ivo. Agradeço também aos coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, professor Dr. Wagner Brandão e a professora Dra. Karoline Brito e a Maricé, secretária de Pós-Graduação, pela disponibilidade e atenção a mim prestados. Também agradeço ao suporte financeiro temporário do CNPq e a empresa Nordeste Indústria de Laticínios LTDA (TriLebom) que foram fundamentais para que eu chegasse até esse momento da defesa da tese.

## RESUMO

Este estudo investigou o efeito dos bioconservantes comerciais FRESHQ-11 (*Lactobacillus rhamnosus*) e HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) em diferentes dosagens sobre a cinética de fermentação, pH, acidez titulável (%), inibição fúngica e parâmetros texturais (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) de iogurtes durante 28 dias de armazenamento a  $7\pm 1$  °C, tendo como referências o iogurte formulado apenas com o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima permitida (controle1) e o iogurte sem conservante químico (controle2), como alternativa para substituir ou reduzir a concentração de sorbato de potássio na conservação deste produto. Para tanto, foram formulados iogurtes com dois tipos de bioconservantes comerciais nas dosagens de 0,1% e 0,2% (v/v) e concentrações de sorbato de potássio de 0,015g/100g e 0,03g/100g. De modo geral, os dois bioconservantes comerciais reduziram o tempo de fermentação em relação ao iogurte controle1 (com 0,03g/100g de sorbato de potássio) e principalmente em relação ao iogurte controle2. Iogurtes com bioconservantes exibiram pH menor e acidez titulável (%) significativamente maior do que o iogurte controle2 ( $p < 0,05$ ). A sinérese de todos os experimentos diminuiu significativamente ao longo do período de armazenamento ( $p < 0,05$ ) durante os 28 dias a  $7\pm 1$ °C. Em experimentos contendo culturas bioprotetoras, os parâmetros de textura do iogurte foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que nos iogurtes controle1 e controle2 durante o período de armazenamento. Na fase I, os experimentos contendo culturas bioprotetoras tiveram um desempenho semelhante ao iogurte controle1 na inibição de bolores e leveduras, principalmente quando foi utilizada a cultura comercial FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) na dosagem de 0,2%v/v (iogurte F3). A contaminação inicial do iogurte com uma concentração de bolores e leveduras de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g alterou o comportamento do pH no período estudado, tendo em vista que na fase II, o pH com 28 dias de validade foi menor para todos os iogurtes estudados. No caso da acidez titulável (%), na fase II, observou-se uma leve diminuição nos iogurtes controle1 e H3 e um aumento considerável nos iogurtes controle2 e F3. A contaminação inicial com bolores e leveduras na concentração de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte contribuiu com o aumento da sinérese dos iogurtes controle1 e H3 e praticamente não teve efeito no iogurte F3 em relação a fase I. No entanto, o iogurte controle2 teve uma forte queda da sinérese e apresentou valores bem mais elevados para os parâmetros de textura na fase II. A contaminação inicial do iogurte com  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de bolores e leveduras não influenciou significativamente a performance desses parâmetros nos iogurtes controle1, H3 e F3. De uma forma geral, pode-se afirmar que os experimentos de iogurtes contendo os bioconservantes HOLDBAC-YMB e FRESHQ-11 tiveram um desempenho muito bom na inibição de bolores e leveduras mesmo com a contaminação inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g, principalmente no iogurte H3 quando se usou o bioconservante comercial HOLDBAC-YMB na dosagem de 0,2%v/v.

Palavras-chave: *L. rhamnosus*, *P. freudenreichii*, bioconservantes, iogurte e armazenamento.



## ABSTRACT

This study investigated the effect of commercial bio-preservatives FRESHQ-11 (*Lactobacillus rhamnosus*) and HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) at different dosages on the fermentation kinetics, pH, titratable acidity (%), fungal inhibition and textural parameters (firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index) of yogurt during 28 days of storage at  $7\pm 1$  °C, with references being yogurt formulated only with the chemical preservative potassium sorbate at the maximum permitted concentration (control1) and yogurt without chemical preservative (control2), as an alternative to replace or reduce the concentration of potassium sorbate in preserving this product. For this purpose, yogurts were formulated with two types of commercial bio-preservatives at dosages of 0.1% and 0.2% (v/v), and potassium sorbate concentrations of 0.015g/100g and 0.03g/100g. In general, the two commercial biopreservatives reduced the fermentation time in relation to the control1 yogurt (with 0.03g/100g potassium sorbate) and mainly in relation to the control2 yogurt. Yogurts with bio-preservatives exhibited a lower pH and significantly higher titratable acidity (%) than yogurt control2 ( $p < 0.05$ ). The syneresis of all experiments decreased significantly over the storage period ( $p < 0.05$ ) during the 28 days at  $7\pm 1$  °C. In experiments containing bio-protective cultures, the yogurt texture parameters were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in control1 and control2 yogurts during the storage period. In phase I, the experiments containing bioprotective cultures had a similar performance to the yogurt control1 in preventing molds and yeasts, especially when the commercial culture FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) was used at a dosage of 0.2%v/v (F3 yogurt). The initial contamination of the yogurt with a concentration of molds and yeasts of  $1.2 \times 10^1$  CFU/g altered the pH behavior during the studied period, considering that in phase II, the pH at 28 days of expiration was lower for all yogurts studied. In the case of titratable acidity (%), in phase II, a slight decrease was observed in control1 and H3 yogurts and a considerable increase in control2 and F3 yogurts. The initial contamination with molds and fermented yeasts at a concentration of  $1.2 \times 10^1$  CFU/g of yogurt contributed to the increase in syneresis of control1 and H3 yogurts and had practically no effect on F3 yogurt in relation to phase I. However, control2 yogurt had a strong decrease in syneresis and presented much higher values for the texture intervals in phase II. The initial contamination of the yogurt with  $1.2 \times 10^1$  CFU/g of molds and yeasts did not significantly influence the performance of these sessions in control1, H3 and F3 yogurts. In general, it can be stated that the yogurt experiments containing the biopreservatives HOLDBAC-YMB and FRESHQ-11 performed very well in inhibiting molds and yeasts, even with an initial contamination of  $1.2 \times 10^1$  CFU/mL, mainly in H3 yogurt when the commercial biopreservative HOLDBAC-YMB was used at a dosage of 0.2%v/v.

Keywords: *L. rhamnosus*, *P. freudenreichii*, biopreservatives, yogurt and storage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fluxograma de um processo de fabricação do iogurte com polpa de fruta.....	20
<b>Figura 2:</b> Reação de síntese do ácido láctico na fermentação.....	24
<b>Figura 3:</b> Classificação reológica dos fluidos.....	26
<b>Figura 4:</b> Curva generalizada da análise do perfil da textura (TPA).....	29
<b>Figura 5:</b> Esquema de compostos metabólicos produzidos e assimilados por bactérias lácticas e leveduras.....	34
<b>Figura 6:</b> Fluxograma da formulação do iogurte - Fase I.....	49
<b>Figura 7:</b> Processo de pasteurização do leite para preparação do iogurte .....	50
<b>Figura 8:</b> Incubação do iogurte em estufa na temperatura de $42\pm 1$ °C.....	51
<b>Figura 9:</b> Fluxograma da formulação do iogurte - Fase II .....	52
<b>Figura 10:</b> Placas do iogurte controle2 contaminado com 21 dias de armazenamento.....	54
<b>Figura 11:</b> Variação do pH em função do tempo (min) de fermentação .....	58
<b>Figura 12:</b> Variação do pH em função dos dias de armazenamento – Fase I.....	59
<b>Figura 13:</b> Variação do pH em função dos dias de armazenamento – Fase II.....	85
<b>Figura 14:</b> Comparação do pH nas Fases I e II com 28 dias de validade.....	86
<b>Figura 15:</b> Comparação da acidez titulável (%) nas Fases I e II com 28 dias de validade.....	87
<b>Figura 16:</b> Comparação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.....	89
<b>Figura 17:</b> Comparação da sinérese (%) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.....	90
<b>Figura 18:</b> Comparação da firmeza (g-força) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.....	93
<b>Figura 19:</b> Comparação da consistência (g-seg) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Distribuição dos exp. para o estudo do desempenho dos bioconservantes.....	47
<b>Tabela 02:</b> Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de validade – Fase I.....	61
<b>Tabela 03:</b> Variação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm em função dos dias de validade – Fase I.....	66
<b>Tabela 04:</b> Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento – Fase I.....	69
<b>Tabela 05:</b> Variação da firmeza (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase I.....	73
<b>Tabela 06:</b> Variação da consistência (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase I.....	76
<b>Tabela 07:</b> Variação da coesividade (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase I.....	77
<b>Tabela 08:</b> Variação do índice de viscosidade (g-seg) em função dos dias de validade – Fase I.....	79
<b>Tabela 09:</b> Concentração de bolores/leveduras em função dos dias de validade – Fase I.....	80
<b>Tabela 10:</b> Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de validade – Fase II.....	86
<b>Tabela 11:</b> Variação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm em função dos dias de validade – Fase II.....	88
<b>Tabela 12:</b> Variação da viscosidade (m.Pas) a 12 rpm em função dos dias de validade – Fase II.....	88
<b>Tabela 13:</b> Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento – Fase II.....	89
<b>Tabela 14:</b> Variação da firmeza (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase II.....	91
<b>Tabela 15:</b> Variação da consistência (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase II.....	91
<b>Tabela 16:</b> Variação da coesividade (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase II.....	91
<b>Tabela 17:</b> Variação do índice de viscosidade (g-seg) em função dos dias de validade – Fase II.....	92
<b>Tabela 18:</b> Conc. de bolores/leveduras (UFC/mL) em função dos dias de validade – Fase II.....	94

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AOAC INTERNATIONAL - Association of Official Analytical Chemists.

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CBT - Contagem Bacteriana Total

CCS - Contagem de Células Somáticas

CRA - Capacidade de Retenção de Água

EFSA - European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, Food and Drug Administration)

GRAS - Geralmente Reconhecido como Alimento Seguro

IN – Instrução Normativa

LAB - Bactéria ácido lácticas

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PAB - Propionibactérias lácteas

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPHO - Procedimentos Padrões de Higiene Operacionais

QPS - Qualified presumption of safety (Presunção qualificada de segurança)

TPA - Análise do Perfil de Textura

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UHT - Ultra-Alta Temperatura

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
1.1.	Objetivo geral.....	17
1.2.	Objetivos específicos.....	18
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1.	Iogurte .....	19
2.2.	Cinética de fermentação, Acidez Titulável e pH.....	23
2.3.	Comportamento reológico do iogurte.....	25
2.4.	Textura do iogurte.....	28
2.5.	Capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte .....	30
2.6.	Bolores e leveduras que causam problemas em produtos lácteos .....	30
2.6.1.	Bolores .....	31
2.6.2.	Leveduras .....	33
2.7.	Culturas com propriedades bioprotetoras .....	37
2.7.1.	Bactérias ácido lácticas (LAB) .....	39
2.7.2.	Propionibactérias lácteas (PAB).....	43
3.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.1.	Culturas Bioprotetoras Comerciais .....	46
3.2.	Distribuição dos Experimentos.....	47
3.3.	Preparação do iogurte.....	48
3.3.1.	Preparação do iogurte - Fase I .....	48
3.3.2.	Preparação do iogurte - Fase II.....	52
3.4.	Avaliação do Iogurte .....	54
3.4.1.	Análises Físico-Químicas .....	54
3.4.2.	Comportamento Reológico (Viscosidade).....	55
3.4.3.	Sinérese (Separação de soro) .....	56
3.4.4.	Análise de textura .....	56
3.4.5.	Análises Microbiológicas (Contagem de Bolores e Leveduras).....	56
3.5.	Tratamento Estatístico dos Dados.....	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1.	Efeito das culturas bioprotetoras na cinética de fermentação, pH e acidez titulável – Fase I	58
4.2.	Efeito das culturas bioprotetoras no comportamento reológico – Fase I.....	66
4.3.	Efeito das culturas bioprotetoras na capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte – Fase I .....	69
4.4.	Efeito das culturas bioprotetoras na textura do iogurte – Fase I.....	73

4.5.	Efeito das culturas bioprotetoras na inibição de bolores e leveduras – Fase I.....	80
4.6.	Efeito das culturas bioprotetoras no pH e acidez titulável – Fase II. ....	85
4.7.	Efeito das culturas bioprotetoras no comportamento reológico – Fase II.....	87
4.8.	Efeito das culturas bioprotetoras na capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte – Fase II.....	89
4.9.	Efeito das culturas bioprotetoras na textura do iogurte – Fase II .....	91
4.10.	Teste de Desafio das culturas bioprotetoras na inibição de bolores e leveduras – Fase II.....	94
5.	CONCLUSÕES.....	101
6.	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
APÊNDICE A	.....	128
APÊNDICE B	.....	139
APÊNDICE C	.....	144
APÊNDICE D	.....	149
APÊNDICE E	.....	203

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios é um dos principais pilares do setor de alimentos. Bebidas lácteas fermentadas, como iogurte, são muito populares. A fermentação é um dos métodos mais antigos conhecidos de fazer uso prático das atividades dos microrganismos. Os processos de fermentação são conhecidos pela humanidade desde os tempos pré-históricos e os desenvolvimentos da ciência e da tecnologia neste campo permitiram que fossem melhorados e utilizados em muitas áreas (Popović *et al.*, 2020).

Alimentos fermentados são uma importante fonte de bactérias vivas na dieta humana. Atualmente, os consumidores estão mais informados sobre alimentos e ingredientes, especialmente alimentos funcionais, que têm despertado muito interesse por suas vantagens na prevenção de vários problemas de saúde, aumento de várias funções físico-químicas e alto valor nutricional. Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, além de suas funções nutricionais, oferecem benefícios à saúde. Eles podem ajudar a reduzir o risco de doenças crônicas, como diabetes e câncer. Vários estudos recentes mostraram aumento da demanda por esses produtos naturais benéficos (Huang *et al.*, 2022; Rashwan *et al.*, 2022; Shori, 2022; Suwannasang *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022).

O iogurte com ingredientes funcionais é um tipo de alimento amplamente reconhecido e aceito pelos consumidores que, preocupados com o bem estar, o consideram um produto promotor da saúde que pode ajudar na digestão (Acevedo-Fani *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Mada *et al.*, 2022). Várias formulações de iogurte estão sendo produzidas atualmente para melhorar o valor nutricional, as propriedades de qualidade e os atributos funcionais dos produtos, bem como para atender à crescente demanda do consumidor por esse tipo de iogurte (Ban *et al.*, 2022; Rashwan *et al.*, 2022; Shalabi, 2022; Wijesekara *et al.*, 2022). O iogurte é um dos produtos lácteos fermentados mais consumidos pela combinação de leite pasteurizado com as bactérias de ácido láctico, especificamente *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* sob condições controladas (Rashwan *et al.*, 2022; Wijesekara *et al.*, 2022).

O consumo de iogurte pode estimular o sistema imunológico, auxiliar no controle de peso e diminuir o risco de desenvolver câncer, além de melhorar a absorção de minerais e vitaminas devido ao alto teor de proteínas, probióticos, bactérias do ácido láctico, vitaminas e teor de cálcio, bem como seu teor de gordura relativamente baixo (Wijesekara *et al.*, 2022). Enfim, a adição de ingredientes funcionais naturais melhora significativamente os efeitos biológicos do iogurte, incluindo suas propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antibacterianas e anticancerígenas (Rashwan *et al.*, 2023).

A prevenção da deterioração por bolores e leveduras em alimentos atualmente depende de métodos de prevenção (por exemplo, implementação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle-APPCC), tecnologias de obstáculo (por exemplo, tratamentos térmicos, remoção de água, embalagem de atmosfera modificada, salga, fermentação) e o uso de conservantes químicos, incluindo benzoato, propionato, sorbato, nitrato e sulfitos (Silva e Lidon, 2016). Para o controle de bolores e leveduras em produtos lácteos, o sorbato de potássio e a natamicina (E235), um conservante microbiano produzido por *Streptomyces natalensis* pertencentes ao grupo dos antimicóticos polieno-macrólidos, são os principais conservantes utilizados. As indústrias agroalimentares dependem principalmente de conservantes químicos para controlar o crescimento de contaminantes microbianos e estender a vida útil do produto, mas surgiu uma forte demanda social por alimentos menos processados e sem conservantes, e os regulamentos de aditivos estão em constante evolução para limitar seu uso (Fuselli *et al.*, 2012).

Além disso, a evolução da legislação, juntamente com a demanda dos consumidores, levou as indústrias a reduzir o uso de conservantes químicos em produtos lácteos fermentados. É necessário, então, encontrar estratégias alternativas para evitar a deterioração de fungos e/ou aumentar sua vida útil (Delavenne *et al.*, 2013).

A abordagem de 'rótulo limpo' da biopreservação avaliando o papel benigno das bactérias ácido lácticas (LAB) e seus metabólitos, juntamente com intervenções da biotecnologia moderna, podem ser uma grande promessa de produtos mais seguros e de qualidade, aceitáveis para ambos consumidores e órgãos reguladores que exigem da indústria alimentar a limitar o uso desses compostos químicos e desenvolver métodos naturais para a preservação de alimentos. Esses últimos aspectos, aliados à necessidade de produzir alimentos que atendam a elevados padrões de segurança e qualidade, têm levado à busca de alternativas ao uso de conservantes químicos (Pradhan e Kadyan, 2020).

Atualmente, a deterioração de alimentos causada pelo crescimento de bolores e leveduras tornou-se uma grande preocupação em todo o mundo. Em vários países em desenvolvimento, foi relatada uma perda de 25–40% dos produtos alimentícios pós-colheita devido à contaminação por fungos e micotoxinas. (Das *et al.*, 2021). Além de causar perdas econômicas consideráveis, a deterioração fúngica tem um efeito negativo na saúde pública e na segurança alimentar devido à produção de micotoxinas. O consumo de alimentos contaminados com bolores e leveduras pode causar diversos e poderosos efeitos tóxicos, incluindo teratogenicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (Milićević *et al.*, 2010).

Embora certos compostos químicos antifúngicos sejam aplicados no controle da contaminação fúngica, o desenvolvimento de resistência fúngica e potenciais riscos à saúde limitam o uso desses



produtos químicos (Muhialdin *et al.*, 2020). Assim, é essencial desenvolver uma estratégia eficaz e segura para resolver o problema da deterioração por bolores e leveduras.

Durante os últimos anos, a preservação biológica usando microrganismos bioprotetores ou seus metabólitos tem recebido atenção crescente. As LAB têm recebido atenção especial devido ao seu *status* geralmente reconhecido como seguro. Foi relatado que LAB tem atividade antifúngica potente contra muitos gêneros fúngicos (Pradhan *et al.*, 2021; Ramos-Pereira *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). Vários metabólitos bioativos (como substâncias proteicas, dipeptídeos cíclicos, ácidos orgânicos, ácidos graxos e peróxido de hidrogênio) gerados por LAB estão intimamente associados ao efeito inibitório de bolores e leveduras (Bukhari *et al.*, 2020). A produção desses compostos antifúngicos depende da especificidade da cepa de LAB (Schmidt *et al.*, 2018).

Neste contexto, os agentes microbianos correspondentes a culturas bioprotetoras, fermentados, sobrenadantes sem cultura ou moléculas purificadas, que exibem atividades antifúngicas representam um interesse crescente como alternativa à preservação química. Do ponto de vista aplicado, a diferença entre o número de estudos e o número de culturas microbianas disponíveis indica que são necessários esforços para facilitar sua aplicação em produtos alimentares (Leyva Salas *et al.*, 2018).

Atualmente, a biopreservação por bactérias do ácido láctico (LAB) é a alternativa mais promissora aos conservantes químicos na indústria de laticínios devido ao seu status Geralmente Considerado como Seguro (GRAS) e ao status de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) nos Estados Unidos e na UE, respectivamente (Shi e Maktabdar, 2022). Conseqüentemente, alimento com LAB possui imagem saudável e natural. No entanto, embora formulações antifúngicas comerciais baseadas em LAB estejam disponíveis para aplicação em diferentes formatos de alimentos, ainda são necessárias pesquisas mais detalhadas para entender o efeito das mesmas sobre a qualidade alimentar final, estabilidade durante o processamento, mecanismo de ação, atividades de sinergismo, segurança, etc., potencial para exploração comercial de alimentos (Pradhan e Kadyan, 2020).

Além disso, a maioria das culturas bioprotetoras comerciais existentes atualmente propõem a sua aplicação juntamente com os conservantes químicos, principalmente o sorbato de potássio, como uma proteção alimentar adicional, ou seja, os fabricantes não propõem a substituição dos conservantes químicos nas dosagens recomendadas por eles. Recentemente, os efeitos benéficos para a saúde de certas LAB também foram reconhecidos por muitos pesquisadores, devido aos quais muitas LAB são agora comumente usadas como probióticos (Pradhan e Kadyan, 2020).

Também existem na literatura várias pesquisas que estudaram o desempenho das culturas bioprotetoras sobre os parâmetros microbiológicos, físico-químicos e reológicos de leites fermentados. No entanto, essas pesquisas não estudam a diminuição da concentração do conservante

químico, mas a sua substituição; e geralmente foram realizadas em países desenvolvidos cuja matéria-prima usada para formular o leite fermentado tem uma qualidade microbiológica bem superior ao da matéria-prima obtida no Nordeste brasileiro onde pesquisas com culturas bioprotetoras são muito escassas ou inexistentes. Portanto, essas conclusões precisam ser mais investigadas quanto a eficácia das LAB comerciais como antifúngicos do iogurte principalmente na realidade higiênico-sanitária e temperatura ambiente da região Nordeste do Brasil durante a obtenção, armazenamento e transporte da matéria-prima e também durante o processamento e conservação de iogurte e bebida láctea.

O fato é que a bacia leiteira na região Nordeste do Brasil é formada na sua maioria por pequenos produtores que não têm condições de investirem em uma estrutura adequada para a obtenção do leite em suas propriedades, sendo a ordenha realizada de forma manual em condições de higiene inadequadas. Por exemplo, num trabalho realizado por Neto *et al.* (2012) que foi desenvolvido com o objetivo de estudar a influência sazonal sobre a composição centesimal, a CCS (Contagem de células somáticas) e a CBT (contagem bacteriana total) de leite cru refrigerado em 116.989 amostras de leite da região nordeste, constatou que as maiores médias foram observadas nos períodos mais chuvosos entre os meses de março a maio. Esse período favoreceu o aumento da contaminação ambiental, o acúmulo de lama nas instalações e a maior ocorrência de tetos sujos no momento da ordenha. Mesmo a CBT apresentando uma tendência de redução, 66,84% das amostras estavam acima do permitido pela legislação (Neto *et al.*, 2012).

Segundo Strassburger *et al.* (2019), o setor lácteo brasileiro vem apresentado problemas de qualidade da sua matéria prima, repetindo erros que demonstram a necessidade em melhorias nas etapas de manejo, resfriamento e coleta, mas principalmente uma mudança cultural de todos os envolvidos, com isso perdendo em competitividade e não atingindo mercados importantes para o fortalecimento da cadeia do leite como um todo. A qualidade do leite não indica apenas a saúde do sistema mamário do animal, mas também demonstra as condições gerais de manejo e higiene adotados nas propriedades rurais e indústrias processadoras. Dessa forma, as pesquisas apresentadas demonstraram alterações no indicador avaliado (CBT), tanto nas amostras de produtores, como de tanques de transporte, silos de estocagem, que apresentaram contaminação em desacordo com a legislação (Strassburger *et al.*, 2019).

Outro fato agravante é que geralmente nessas pequenas propriedades a água não é potável. Santos *et al.* (2015) constataram que há a presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes na água usada pelos produtores de leite, o que a torna imprópria para sua utilização no manejo de ordenha principalmente para realizar a higienização dos úberes e tetos das vacas e das mãos dos ordenhadores, como também dos utensílios, latões e reservatórios de leite. Neste contexto, segundo estes pesquisadores, se usada pode favorecer a contaminação do leite e dos equipamentos de ordenha.

Além disso, muitos produtores não fazem a desinfecção dos tetos das vacas antes e após a ordenha, ou seja, o *pré-dipping* e *pós-dipping*. Por exemplo, o *pré-dipping* é o procedimento de desinfecção dos tetos antes da ordenha, através da aplicação de produto antisséptico, geralmente por imersão dos tetos. Os principais objetivos desta ação são: reduzir a incidência de infecções intramamárias, ajudando a reduzir novos casos de mastite (Santos e Fonseca, 2007).

Também há falhas no armazenamento e transporte do leite, pois tem muitos tanques de resfriamento cujo leite é coletado após 3 e 4 dias de armazenamento, mas o correto é coletar com 2 dias segundo a Instrução Normativa N° 77, de 26 de novembro de 2018 do MAPA. Isso faz com que haja grande crescimento de bactérias, bolores e leveduras porque o leite é armazenado por mais tempo. Outro fato é que a higienização dos tanques de resfriamento geralmente é realizada de forma inadequada sem usar os produtos químicos e utensílios recomendados pelos fabricantes (Strassburger *et al.*, 2019).

Todos estes problemas relatados tem uma influência direta na qualidade microbiológica do iogurte preparado com essa matéria-prima tendo em vista que de acordo com Viljoen (2001), diversos fatores tornam o ambiente de produção propício para o desenvolvimento de bolores e leveduras nos produtos lácteos, dentre eles, destacam-se: qualidade da matéria-prima, condições de processamento, má higienização dos equipamentos, do ambiente, dos manipuladores, a eficiência da pasteurização, além de ingredientes, como polpas de frutas, mel, açúcar e castanhas.

Portanto, nesse contexto de problemas durante a obtenção da matéria-prima e de consumidores que procuram cada vez mais produtos naturais e sem conservantes químicos, essa pesquisa propõe o desenvolvimento de processos fermentativos na produção de iogurte com a adição de culturas bioprotetoras para substituir o conservante químico sorbato de potássio ou diminuir a sua concentração. Essa tecnologia vai proporcionar inúmeros benefícios à indústria produtora e aos seus consumidores, pois além de estar fornecendo um produto inovador do ponto de vista de saúde pública, vai contribuir em muito para a redução do custo de produção para a indústria alimentícia.

## 1.1. Objetivo geral

Avaliar o uso do conservante químico sorbato de potássio *versus* os bioconservantes comerciais FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) e HOLDBAC YM-B (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) no processo de fermentação láctea para obter novas formulações em função de suas concentrações no iogurte como uma alternativa aos conservantes químicos na sua conservação.

## 1.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito das culturas bioprotetoras comerciais sobre a cinética de fermentação do iogurte em função do tipo e da dosagem, tendo como referências o iogurte formulado apenas com o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima permitida e o iogurte sem agentes antifúngicos (Fase I);
- Estudar o efeito das culturas bioconservantes comerciais em diferentes dosagens na inibição fúngica e sobre os parâmetros físico-químicos, reológicos e da textura do iogurte, tendo como referências o iogurte formulado apenas com o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima permitida e o iogurte sem conservante químico (Fase I);
- Analisar o banco de dados obtido para o iogurte nos itens 1 e 2 da fase I e, para as formulações de melhor desempenho com relação a inibição fúngica, realizar um estudo contaminando o iogurte intencionalmente com uma concentração conhecida de bolores e leveduras (Fase II).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Iogurte

De acordo com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite fermentado (BRASIL, 2007), “*entende-se por leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microorganismos específicos. Estes microorganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade*”. Segundo essa mesma legislação, “*entende-se por Iogurte, Yogur ou Yoghurt daqui em diante o produto incluído na definição anterior cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final*”.

A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo  $10^7$  UFC/g no produto final para o cultivo láctico específico empregado durante todo o prazo de validade. No entanto, a recomendação mínima diária para produtos lácteos probióticos, deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL (Brasil, 2008).

O consumo mundial de iogurte destacou-se na década de 1960 devido à adição de polpa de frutas para a atenuação do sabor ácido, resultando em uma maior aceitação popular do produto (Rocha *et al.*, 2008).

O iogurte é amplamente fabricado em todo o mundo, e existem aproximadamente 400 nomes genéricos para produtos tradicionais e comerciais (Reza, Amir e Sara, 2012). De acordo com o “2020 Yogurt Market Research Report” divulgado pela QY Research, o mercado global de iogurte atingiu US\$ 70 bilhões em 2019 (Moria e Du, 2020). No contexto atual de grande saúde, os produtos lácteos fermentados probióticos são a primeira escolha dos consumidores devido aos seus benefícios para a saúde, propriedades sensoriais particulares e vida útil prolongada (Beltrn-Barrientos *et al.*, 2016). Esses efeitos benéficos estão intimamente relacionados aos probióticos e seus metabólitos.

Com isso, o mercado de iogurtes funcionais tem sido promissor. As empresas, na tentativa de conquistar o paladar e a preferência do consumidor, vêm buscando inovações por meio de sabores e aromas diferenciados, fórmulas aperfeiçoadas, acréscimo de nutrientes, embalagens mais atrativas e práticas.

O processo de fabricação do iogurte na indústria é bastante simples, conforme ilustrado na Figura 1. Utiliza em grande parte os equipamentos disponíveis nas indústrias lácteas ou demandam pequeno investimento.

**Figura 1** - Fluxograma de um processo de fabricação do iogurte com polpa de fruta.



Fonte: O autor

Em escala industrial, a fabricação de iogurte envolve a suplementação do leite com ingredientes lácteos, com o objetivo de aumentar o teor de proteínas. Pode-se também adicionar outros ingredientes não lácteos como açúcar, amido, estabilizantes a base de gelatina e conservante químico. Em seguida, a mistura segue para a pasteurização para garantir a qualidade microbiológica do produto e desnaturar as proteínas. Em seguida, a mistura é resfriada até a temperatura de fermentação e encaminhada aos tanques para dar início ao processo fermentativo. Nesse momento, as culturas iniciadoras são adicionadas à formulação. Após a fermentação, o coágulo formado é quebrado, a mistura é resfriada, podendo haver a adição de corantes, aromas e/ou frutas e finalmente segue para o envase e refrigeração.

O uso de culturas iniciadoras tem o objetivo de melhorar o processo de fermentação de leites fermentados. Elas são responsáveis por um processo simbiótico, onde uma bactéria estimula o crescimento da outra. *Streptococcus thermophilus* multiplica-se rapidamente produzindo dióxido de carbono e ácido fórmico. Assim, estimula a multiplicação de *L. bulgaricus* através da redução de pH, o qual por sua vez, produz peptídeos e aminoácidos necessários para a multiplicação de *Streptococcus thermophilus*. Em um período de aproximadamente 4 horas em processo fermentativo é possível observar uma proporção extremamente semelhante de ambos os microrganismos (Serafeimidou *et al.*, 2012). O ácido láctico produzido durante esse processo é o principal responsável pela coagulação do leite através da redução do pH até o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,65) (Dos Reis *et al.*, 2014).

Os microrganismos utilizados como culturas iniciadoras no preparo de iogurtes não são reconhecidos como microrganismos probióticos uma vez que não são de origem entérica e não são capazes de aderir e colonizar o trato gastrointestinal humano (Brasil, 2008).

Os iogurtes estão entre os alimentos mais utilizados como carregadores de microrganismos probióticos no mundo. De acordo com a pesquisa realizada por Food Processing (2014), o nível de conscientização dos consumidores de diferentes tipos de alimentos probióticos tem aumentado significativamente, como resultado principalmente da publicidade. Além disso, os iogurtes já são correlacionados com alimentos que trazem benefícios à saúde e suas características sensoriais têm sido de maior aceitabilidade pelos consumidores com a inclusão de frutas e outros sabores.

Estão disponíveis na literatura relatos de iogurtes comerciais contaminados, que não atendem aos requisitos microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira. Por exemplo, do total de 39 amostras de iogurtes comerciais avaliados por Rodrigues e Santos (2007), constatou-se a presença de bolores e leveduras filamentosos e leveduriformes em 53,84% das amostras e a presença de coliformes termotolerantes em 5,13%.

A busca por um alimento livre de patógenos e/ou deteriorantes é constante, no entanto, estudos comprovam que as doenças de origem alimentar e intoxicações alimentares ainda ocorrem com grande frequência, causando sintomas como gastroenterites e diarreias, sendo um grande problema de saúde pública. As fontes de contaminação mais frequentes na origem de surtos de doenças alimentares são: práticas inadequadas de manipulação, matérias-primas contaminadas, contaminação cruzada, falta de higiene durante a preparação, além de equipamentos e estrutura operacional deficiente (Marriott *et al.*, 2018).

A deterioração fúngica dos alimentos é responsável por cerca de 5 a 10% da perda de alimentos em todo o mundo (Pitt e Hocking, 2009). Produtos lácteos, incluindo produtos lácteos cultivados, como queijo e iogurte, são suscetíveis à deterioração por bolores e leveduras (Garnier *et al.*, 2017a). A contaminação fúngica pode ocorrer em todo o processamento contínuo de laticínios, a

partir de fontes ambientais, incluindo ambientes de produção primária, como a fazenda leiteira, até o ambiente de processamento do produto acabado (Nicole *et al.*, 2022).

O ambiente de processamento, especificamente após a pasteurização, representa a fonte mais comum de contaminação fúngica de produtos lácteos. Além disso, o ar da instalação de processamento é uma rota de transmissão comum para contaminantes fúngicos (Radha e Nath, 2014). Por exemplo, durante um estudo prospectivo de 1 ano de contaminação fúngica do ar em uma fábrica de iogurte na Grécia, os bolores e leveduras *Penicillium spp.* e *Cladosporium spp.* representou a espécie mais comumente isolada das amostras de ar interno da planta (Beletsiotis *et al.*, 2011). A contaminação por leveduras também pode ser transmitida pelo ar (Beletsiotis *et al.*, 2011), mas mais frequentemente se origina de superfícies, ingredientes do fornecedor (por exemplo, preparações de frutas) e do ambiente de produção (Bokulich e Mills, 2013).

Em geral, os bolores deteriorantes associados a laticínios podem crescer bem a baixa temperatura, baixa atividade de água, baixo pH e atmosferas de baixa tensão de oxigênio. Para produtos lácteos tratados termicamente, a ocorrência de contaminação por bolores pode ser devida à contaminação pós-processamento durante a embalagem ou à resistência térmica dos esporos do bolor (Garnier *et al.*, 2017a). Pitt e Hocking (2009) isolaram algumas espécies resistentes ao calor de cream cheese e bebidas lácteas tratadas termicamente, como *Eupenicillium brefeldianum* e *Talaromyces macrosporus*, respectivamente. Para produtos lácteos tratados com Ultra-Alta Temperatura (UHT), a ocorrência de contaminação pode ser devida ao pós-processamento, como o isolamento de *Fusarium oxysporum* de bebidas lácteas com sabor UHT (Pitt e Hocking, 2009).

A demanda por produtos alimentícios sem conservantes é crescente e a bioconservação é uma alternativa potencial para substituir ou reduzir o uso de conservantes químicos (Xu *et al.*, 2021). Os métodos tradicionais para controlar a deterioração fúngica do iogurte incluem o uso de aditivos alimentares, como o sorbato de potássio (Davidson *et al.*, 2013). Controlar a ocorrência de bolores e leveduras e suas toxinas por métodos físicos e químicos não é eficiente o suficiente e é impopular entre os consumidores (Xu *et al.*, 2021).

Como os consumidores exigem produtos alimentícios com rótulo limpo, no entanto, a indústria alimentícia é desafiada a produzir os mesmos produtos de qualidade com o mesmo prazo de validade sem o uso de aditivos alimentares tradicionais (Devlieghere *et al.*, 2004). Uma maneira de obter um produto alimentício *clean label* com prazo de validade semelhante aos produtos tradicionais é por meio do uso de bioconservantes (Crowley *et al.*, 2013b). Uma vez que estes podem ser declarados na lista de ingredientes como culturas lácticas, o que garante um rótulo mais limpo ou *clean label* (Fischer e Titgemeyer, 2023). A bioconservação ou biopreservação é definida como a extensão



da vida de prateleira e aumento da segurança dos alimentos por meio de recursos naturais, o que inclui os microrganismos ou seus metabólitos (Yusuf, 2018).

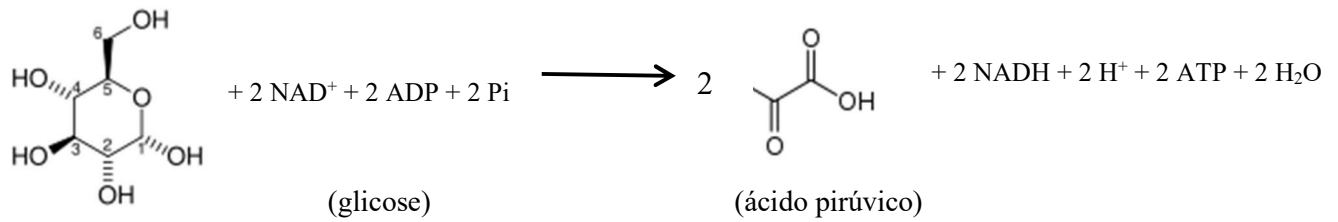
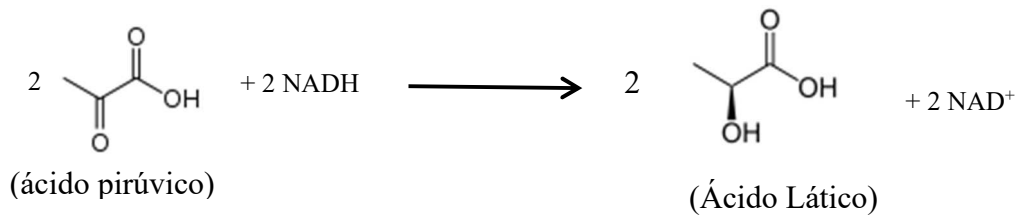
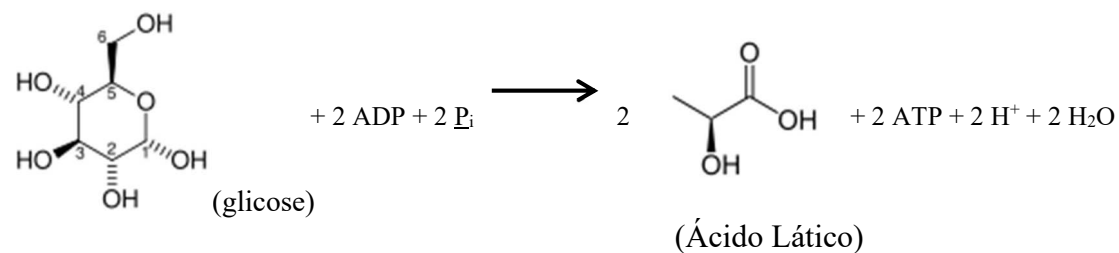
A incidência de contaminação em produtos comerciais demonstra a necessidade de implantação de programas visando garantir a segurança alimentar para a população, tais como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), uma vez que os produtos de origem animal são altamente perecíveis e grandes veiculadores de doenças alimentares (Marriott *et al.*, 2018).

As Boas Práticas de Fabricação seguem um conjunto de normas relacionadas aos ingredientes, aditivos e insumos, processos, serviços de suporte, edificações, armazenamento e expedição do produto. Tem como objetivo oferecer ao consumidor um produto de qualidade tecnológica e sanitária, além de aperfeiçoar a produção e aumentar o mercado consumidor. O APPCC avalia toda linha produtiva e estabelece sistemas de controle preventivo, com intuito de evitarem falhas na qualidade do produto durante todo seu processamento. Aliada à implantação de programas de qualidade na produção de alimentos, a conservação biológica, com a aplicação de culturas bioprotetoras, como as de bactérias lácticas, pode proporcionar uma proteção adicional para melhorar a qualidade dos produtos lácteos (Paula, 2010).

## **2.2. Cinética de fermentação, Acidez Titulável e pH**

A fermentação é um processo antigo de preparação de alimentos no mundo, em que o crescimento e a atividade de microorganismos são usados para conservar os alimentos (Rezac *et al.*, 2018). De um modo geral, a fermentação láctea é um processo em que a lactose é transformada em ácido láctico por ação dos microrganismos. É um processo anaeróbico, de baixo rendimento energético e sem liberação de CO<sub>2</sub>. As bactérias do gênero *Lactobacilos* promovem o desdobramento da lactose em ácido láctico. O acúmulo desse ácido no leite torna-o “azedo”, indicando uma redução do pH. Esse fato provoca a precipitação das proteínas do leite, formando o coalho. Os processos de fermentação utilizados na produção de produtos lácteos são bem conhecidos, sendo preciso selecionar as condições de processo adequadas, como temperatura, oxigênio, quantidade e características do(s) microrganismo(s) e tempo de processo (Hornbaek *et al.*, 2015).

Como se pode observar na Figura 2, os lactobacilos (bactérias presentes no leite) executam a fermentação láctica, em que o produto final é o ácido láctico. Para isso, eles utilizam como ponto de partida, a lactose, o açúcar do leite, que é desdobrado, por ação enzimática que ocorre fora das células bacterianas, em glicose e galactose. A seguir, os monossacarídeos entram nas células, onde ocorre a fermentação.

**Figura 2:** Reação de síntese do ácido láctico na fermentação**Glicólise:****Ácido Láctico:****Reação completa:**

A fermentação tem um forte efeito na acidez titulável e no pH em função do tempo de fermentação, pois, à medida que o ácido láctico é produzido por bactérias de ácido láctico, resulta no aumento da acidez titulável e na diminuição do valor do pH em iogurtes e bebidas lácteas. A produção de ácido depende do crescimento dos microrganismos e suas habilidades para fermentar alguns carboidratos disponíveis no leite. Durante a fermentação do iogurte, as duas culturas, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* utilizam prontamente a lactose, que é o principal açúcar fermentável no leite, e produzem quantidades substanciais de ácido no leite. Após 4-6 h de fermentação, o pH obtido fica em torno de 4,70. Essas bactérias do ácido láctico (BAL) são caracterizadas por sua alta demanda por fatores essenciais de crescimento, como peptídeos e aminoácidos. Esses microrganismos usam sua própria atividade proteolítica, um sistema complexo de proteinases e peptidases, que os permite usar a caseína do leite como fonte de aminoácidos e nitrogênio. O substrato essencial para tal proteólise é a caseína; no entanto, também pode ocorrer degradação limitada de proteínas do soro (Amani *et al.*, 2016).

### 2.3. Comportamento reológico do iogurte

Um dos parâmetros importantes que afetam a qualidade do produto é a viscosidade aparente, que depende de fatores como a composição e acidez titulável do leite e sua matéria seca, temperatura de aquecimento, tipo de fermento utilizado, aditivos e condições de armazenamento (Lee e Lucey, 2003). A desnaturação das proteínas do soro antes da fermentação tem um grande efeito no aumento da viscosidade do iogurte, o que pode ser devido ao aumento da capacidade das proteínas de se ligarem (Capela *et al.*, 2006).

A viscosidade é uma característica importante em diversas áreas do processamento de alimentos. Pode ser considerada como a resistência interna do fluido ao escoamento. Uma explicação didática sobre o escoamento do fluido é dividi-lo em camadas, assim quando o mesmo flui sobre uma superfície, a camada superior flui mais rapidamente e devido às forças de interações moleculares arrasta todo o fluido, exceto a camada de fluido junto à superfície, que permanece estacionária (Fellows, 2006).

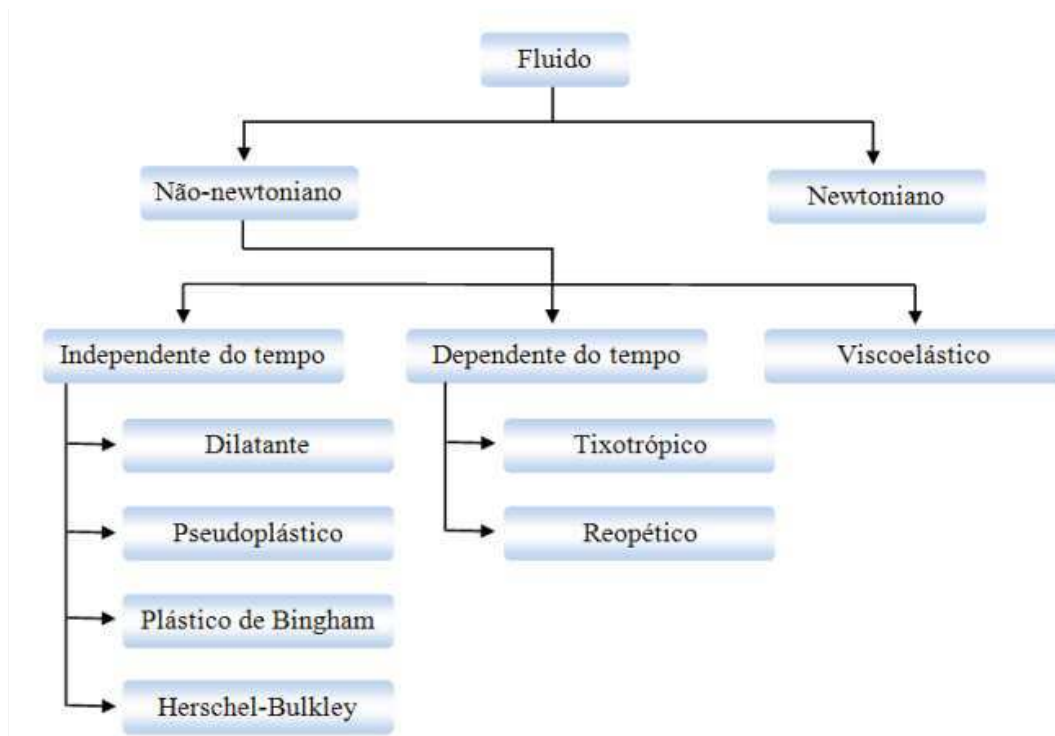
Segundo Toneli *et al.* (2005), reologia é o estudo do comportamento dos materiais quando se aplicam tensão ou deformação, sendo que de acordo com Fellows (2006), a tensão que move o fluido é conhecida como tensão de cisalhamento, proporcional a força de cisalhamento aplicada. Os fluidos podem ser divididos em newtonianos e não newtonianos (Figura 3). Os newtonianos apresentam relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, sendo a viscosidade constante (Vicente, 2015).

Os fluidos não newtonianos classificam-se com relação ao tempo (reopéticos e tixotrópicos) e com relação ao escoamento (pseudoplásticos e dilatantes), nos quais a viscosidade varia com o aumento da taxa de deformação (Shiroma, 2012).

De modo geral, os fluidos não-newtonianos podem ser:

- Fluidos dilatantes: a viscosidade aparente aumenta com a taxa de deformação;
- Fluidos pseudoplásticos: a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de deformação;
- Fluidos plásticos (Bingham e Herschel-Bulkley): estes fluidos não fluem até que uma tensão de cisalhamento crítica seja excedida, a partir de então se a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação for linear, trata-se de um plástico de Bingham, caso contrário, o fluido será do tipo Herschel-Bulkley;
- Fluidos tixotrópicos: apresenta menor viscosidade com o tempo para uma taxa de deformação constante;
- Fluidos reopéticos: neste caso, a estrutura se fortalece com o tempo e a viscosidade aumenta com o tempo a uma taxa de deformação constante;
- Fluidos viscoelásticos: estes exibem propriedades viscosas e elásticas ao mesmo tempo.

Figura 3: Classificação reológica dos fluidos (Adaptado de STEFFE, 1996).



O conhecimento de propriedades reológicas é de grande importância no processamento, manuseio, controle de qualidade e desenvolvimento de produtos alimentícios. Muitos alimentos apresentam comportamento não-newtoniano, onde a sua viscosidade pode variar com o tempo, além de ser função das condições de escoamento. Este é o caso do iogurte que apresenta uma estrutura em gel bastante complexa (Mendonça, 2002). Num estudo de três marcas de iogurtes comerciais, Mathias *et al.* (2013), concluíram que todas as amostras de iogurte apresentaram comportamento não newtoniano pseudoplástico e tixotrópico. As três marcas comerciais apresentaram diferentes faixas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento. O iogurte que utiliza goma alfarroba como espessante apresentou os maiores valores de viscosidade e histerese. O modelo de Herschel-Bulkley apresentou a melhor adequação às curvas de fluxo e viscosidade ( $r > 0,99$ ) e confirmou a característica pseudoplástica para as três amostras de iogurte avaliadas.

O iogurte é uma fonte de proteínas de alto valor biológico, de aminoácidos essenciais, de cálcio e de fósforo sendo considerado um alimento saudável. A textura e dessoramento do iogurte são dois fatores que influenciam fortemente a sua aceitação, sendo que ocorre forte preferência por parte dos consumidores por iogurtes homogêneos, lisos, sem sinérese e com consistência tal que se possa comê-lo com a colher (Vedamuthu, 2019a). Desta forma, a qualidade do produto final é de grande importância na sua aceitação e esta é influenciada principalmente por sua consistência e sua viscosidade.

A textura do produto e a propensão à sinérese (separação do soro) são umas das principais características que irão definir a qualidade do iogurte (Lee e Lucey, 2010). Geralmente, para se aumentar a viscosidade do produto, a prática utilizada nas indústrias é o aumento do teor de sólidos pela adição de leite em pó ou soro de leite em pó. Porém, também podem ser adicionados espessantes com este fim, deixando uma textura mais firme, diminuindo a sinérese e aumentando a aceitabilidade do iogurte.

Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados como espessantes e sua origem pode ser vegetal ou microbiana. Entre os polissacarídeos, estão o amido, a pectina, a carragena, os alginatos, a goma xantana, a goma gelana e a goma arábica. Entre os materiais proteicos, estão os caseinatos e a gelatina (Toneli *et al.*, 2005). Segundo Walstra *et al.* (2006), três dos espessantes mais utilizados são o amido, a pectina e a gelatina.

Muitos fatores podem afetar a reologia do iogurte, como o teor de sólidos, as temperaturas de tratamento térmico do leite e da fermentação, a pressão de homogeneização, dentre outros (Pasephol *et al.*, 2008). Também exerce influência na reologia do iogurte os tipos de culturas lácteas que são adicionadas durante o processo de fabricação. Muitos fabricantes de fermentos fazem um balanceamento entre as culturas *S. salivarius subsp. thermophilus* e *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus* com o objetivo de se obter um produto mais viscoso ou menos viscoso de acordo com o interesse da indústria.

Com relação as culturas bioprotetoras, ainda existe uma lacuna de pesquisas muito grande com relação a influência das mesmas no comportamento reológico do iogurte. Num estudo de Li *et al.* (2013), durante um período de armazenamento, a viscosidade diminuiu gradualmente com o tempo. A diferença entre as quatro amostras de iogurte adicionadas de *L. Casei AST18* e o iogurte em branco (sem culturas bioprotetoras) não foi significativa ( $P > 0,05$ ), mostrando que *L. Casei AST18* não exerceu influência significativa na viscosidade. Nesse mesmo estudo, concluiu-se que a capacidade de retenção de água do iogurte diminuiu gradativamente com o tempo. A diferença entre as quatro amostras de iogurte adicionadas de *L. Casei AST18* e a amostra em branco não foram significativas ( $P > 0,05$ ).

O objetivo dos estudos reológicos é verificar o comportamento estrutural dos alimentos frente aos possíveis processamentos, permitindo o dimensionamento correto de bombas, tubulações, trocadores de calor, operações de agitação e envase, sem afetar a qualidade do produto final (Oliveira *et al.*, 2008). Além destas, outras aplicações do estudo reológico encontram-se no controle de qualidade, na análise sensorial e em testes de tempo de prateleira (Drake, 2007).

Modelos como os de Ostwald de Waele, Hershel-Bulkley e Casson, apesar de não levarem em consideração a dependência com o tempo, têm sido bem aplicados para descrever o

comportamento reológico destes fluidos pseudoplásticos (Toneli *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2008). Durante o processo de fabricação do iogurte vários fatores além da formulação, afetam a textura do produto final, dentre eles está o bombeamento através de tubulação, por ser o iogurte um produto tixotrópico (Vélez-Ruiz, 2019).

Devido a este comportamento, o conhecimento dos parâmetros reológicos e de como estes variam com o tempo e com a taxa de cisalhamento é muito importante para a fixação de parâmetros de projeto de processo, o monitoramento e controle das operações unitárias que envolvem a sua fabricação e para o controle de qualidade do produto final (Vélez-Ruiz, 2019).

#### **2.4. Textura do iogurte**

A importância da textura vem se revelando nos últimos anos como um parâmetro essencial na qualidade de um produto e, pode ser determinante para a aceitabilidade deste por parte do consumidor, que vem se tornando cada vez mais sofisticado. De acordo com Pascua (2013), o consumo de alimento as vezes segue um procedimento pré-definido e a intensidade dos atributos de textura é marcada de acordo com a sua ordem de aparição durante o processo de alimentação. Assim sendo, torna-se evidente que a percepção da textura é um processo dinâmico, que é baseado na percepção obtida através da deformação oral contínua dos alimentos.

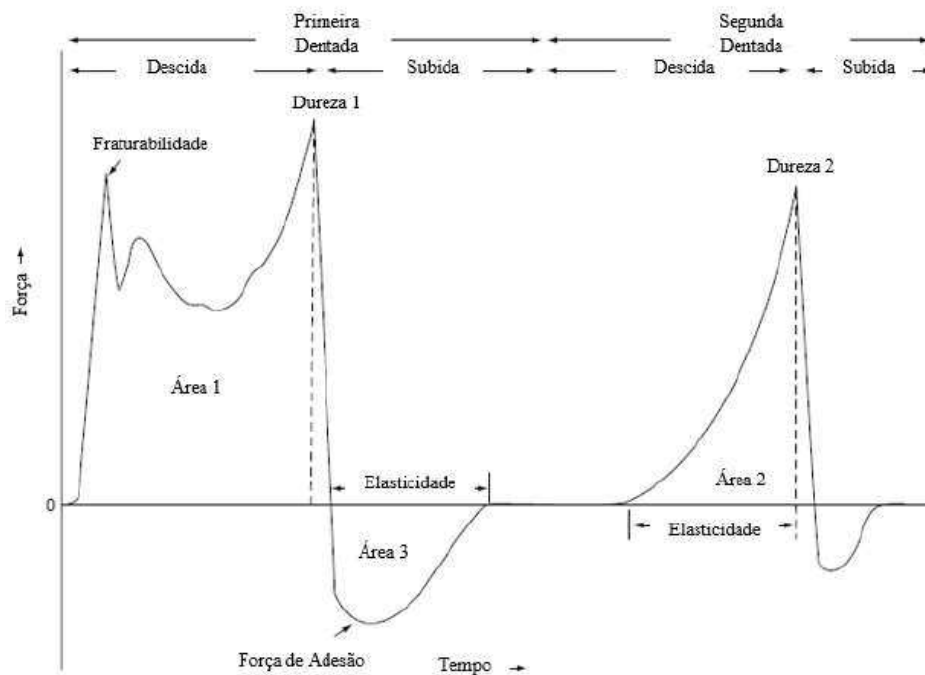
Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a textura pode ser definida como o conjunto de propriedades do alimento, compostas por características físicas perceptíveis pelo tato e que se relacionam com a deformação, desintegração e fluxo do alimento, sob a aplicação de uma força. A textura é uma combinação de sensações derivadas dos lábios, língua, mucosa bucal, dentes e do ouvido. Cada área é sensível a pequenas diferenças de pressão e apresenta diferenças para cada atributo ou característica do produto. O conjunto de impressões obtidas na mastigação é responsável pela aceitação ou rejeição do produto.

Dentre os instrumentos de medição de textura disponíveis, o mais utilizado é o analisador de textura TAXT2, o que mede a força e as propriedades de textura de produtos alimentícios, através da deformação dos mesmos em várias maneiras e da medição da força necessária para alcançar a deformação (Schramm, 2000).

A Análise do Perfil de Textura (TPA) é uma técnica instrumental muito utilizada para medir a resistência de diferentes materiais, isto é possível mediante a utilização do texturômetro, que pode analisar diferentes tipos de alimentos (Ramos e Gomide, 2007) e criada para diminuir a incidência dos problemas e das interferências à análise sensorial com julgadores.

O teste consiste em dois ciclos completos de compressão e descompressão, de uma pequena amostra do alimento, de forma a simular a ação dos dentes durante o processo de mastigação (Figura 4). A força necessária, durante os dois ciclos, para comprimir a amostra é medida e representada graficamente numa curva de deformação tempo versus força. Uma vez que o método de TPA é usado na tentativa de refletir a percepção humana da textura, o primeiro e o segundo ciclo de compressão são geralmente referidos como primeira e segunda mordida (Ramos & Gomide, 2007).

Figura 4: Curva generalizada da análise do perfil da textura (TPA) (Adaptado de Bourne, 2002).



Os parâmetros são calculados automaticamente através das relações entre as áreas dos picos do gráfico (Figura 4). Os atributos de qualidade que podem ser detectados em um teste de TPA são a fraturabilidade, dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e mastigabilidade, os quais são relacionados à curva de força versus tempo (Telis *et al.*, 2005).

Desta forma, Bourne (2002) definiu:

- Fraturabilidade (originalmente denominada como fragilidade): “força da primeira quebra significativa na curva”. Como uma rutura, constitui um fenómeno visível relacionada com a macroestrutura da amostra, deve ser identificada como uma mudança na inflexão da curva cuja magnitude deve ser definida.
- Dureza ou firmeza: “pico da força durante o primeiro ciclo de compressão”;
- Coesividade: “resistência das uniões internas que formam o corpo do produto”;
- Adesividade ou índice de viscosidade: “área de força negativa para a primeira mordida, representando a força necessária para puxar o êmbolo afastando-o da amostra do alimento”;

- Elasticidade: “altura a que os alimentos se recuperam durante o tempo que decorre entre o fim da primeira dentada e o início da segunda”;
- Gomosidade: “força x coesividade”;
- Mastigabilidade: “gomosidade x elasticidade” (BOURNE, 2002).

A dureza ou firmeza é definida como a força necessária para deformar a amostra, enquanto a coesividade ou adesividade é definida como a força necessária para separar a sonda da amostra de teste.

## **2.5. Capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte**

Uma das principais desvantagens do iogurte é a sinérese, que na verdade é o aparecimento de soro ou soro na superfície do iogurte. A sinérese do iogurte ocorre devido ao encolhimento da estrutura tridimensional da rede de proteínas, o que leva a uma diminuição na capacidade de ligar as proteínas do soro com a água (Khan-Mohammadi *et al.*, 2023). Em geral, a estrutura do iogurte pode ser explicada como uma rede tridimensional de cadeias e aglomerados de micelas de caseína que mantiveram sua forma esférica (Supavititpatana *et al.*, 2010). Geralmente o enfraquecimento das ligações de hidrogênio e eletrostáticas do gel e o aumento da repulsão iônica aumentam a hidratação.

A capacidade de retenção de água (CRA) é definida como a capacidade de reter a fase aquosa no gel resultante e geralmente é o inverso da sinérese resultante do encolhimento da rede de gel de proteína, que está associada à incapacidade da rede de gel de reter a fase líquida (Aryana e Olson, 2017).

## **2.6. Bolores e leveduras que causam problemas em produtos lácteos**

Os bolores, em geral, são microrganismos aeróbios estritos, reproduzem por esporos, necessitam para seu crescimento e multiplicação das seguintes condições: i) Temperatura: 20 – 30 °C (crescimento rápido), 10 °C (crescimento lento); ii) pH 2 a 9; iii) Umidade; iv) Fonte de carbono: heterotróficos (carboidratos, proteínas). A utilização de meios acidificados a pH  $3,5 \pm 0,1$  promove seletivamente o crescimento de bolores e leveduras, inibindo a maioria das bactérias presentes no alimento (Brasil, 2003).

As leveduras diferenciam dos bolores na sua forma e reprodução, mas necessitam das mesmas condições ambientais para se desenvolverem. Apresentam-se predominantemente como organismos unicelulares e sua reprodução se faz por gemulação. Por estas características sua reprodução é mais rápida quando comparada à dos bolores (Brasil, 2003).



### 2.6.1. Bolores

De acordo com um estudo realizado por Alzamily (2022), dentre os isolados de bolores que contaminaram os produtos lácteos, foi verificado que *Penicillium* foi dominante com uma porcentagem de 42,85%, seguido por *Aspergillus* com 32,14%, depois *Cladsporium* 14,30%, *Fusarium* 7,14% e, finalmente, *Alternaria* 3,57%.

A deterioração de produtos lácteos por bolores que causa mais impacto na aceitabilidade consiste em alterações visíveis devido ao crescimento de um talo na superfície do produto. A deterioração do bolor também pode levar à formação de sabores desagradáveis. Por exemplo, *Moniliella suaveolens* e *Cladosporium herbarum* demonstraram produzir cetonas causando defeito de rancidez na manteiga, enquanto *Penicillium glabrum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum* e *Cladosporium cladosporioides* produziram sabores estranhos, incluindo 2-metilisoborneol e geosmina, que possuem fortes notas de bolor e terra (Pitt e Hocking, 2009).

A maioria das espécies de bolores que são responsáveis pela deterioração de produtos lácteos pertencem aos filos Ascomycota e Mucoromycota, incluindo vários *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Geotrichum spp.* (Pitt e Hocking, 2009). O *Penicillium* é mais frequentemente relatado (cerca de 40 espécies), seguido pelo *Aspergillus* com 10 espécies (Garnier *et al.*, 2017a). Snyder *et al.* (2016), relataram a deterioração do iogurte por *Mucor circinelloides* e Buehler *et al.* (2017), identificaram *Mucor*, *Rhizopus* e *Sistotrema* no iogurte. Entre os bolores de deterioração associados a laticínios, a contaminação por *Penicillium* e *Mucor* é frequentemente relatada.

Numa revisão bibliográfica, Shi e Maktabdar (2022), observaram nas pesquisas que *Penicillium spp.*, um dos principais gêneros envolvidos na deterioração de produtos lácteos, são isolados principalmente de queijos duros e semiduros, manteiga, iogurte, leite e queijos de leite de cabra ou ovelha. Segundo esses pesquisadores, é relatado na literatura que 50~90% dos bolores de deterioração em queijo são espécies de *Penicillium*. Entre essas espécies, *P. commune*, *P. nalgiovense* e *P. roqueforti* desempenham um papel dominante na microbiota de deterioração, enquanto outras espécies de *Penicillium* parecem ser encontradas com menos frequência, como *P. expansum*, *P. granulatum* e *P. Palitans* (Nicole *et al.*, 2022). Buehler *et al.* (2017) relataram que o gênero mais comum isolado de iogurte, leite e queijo foi *Penicillium*, como *P. roqueforti*. *P. glabrum* é de ocorrência comum em matérias-primas e às vezes causa deterioração de queijo e margarina (Pitt, 2014).

A fisiologia das espécies de *Penicillium* é altamente evoluída, o crescimento de cepas de *Penicillium* tem uma exigência nutricional muito baixa. Isso ajuda a se adaptar a uma extensa gama de habitats vivos. As espécies de *Penicillium* são capazes de crescer em pH baixo (pH 2 - 3), baixa temperatura (abaixo de 5°C e algumas a 0°C), baixa atividade de água (cerca de 0,8) e algumas

espécies, como *P. roqueforti*, podem crescer a baixos níveis de oxigênio (normalmente 2%, crescimento lento em 0,5% O<sub>2</sub>). Algumas espécies de *Penicillium* com estados ascospóricos apresentam notável resistência ao calor e algumas espécies de *Penicillium*, em particular *P. roqueforti*, apresentam resistência a conservantes como os sais de sorbato. No entanto, seu crescimento pode ser inibido em um alto teor de CO<sub>2</sub> (40%) (Pitt, 2014).

As espécies de *Mucor* são encontradas amplamente na natureza, incluindo solo, ar e matérias-primas ou alimentos. Até o momento, aproximadamente 20 espécies de *Mucor* foram isoladas de vários alimentos (Shi e Maktabdar, 2022). Laticínios, frutas e legumes frescos, cereais, nozes e produtos cárneos são regularmente contaminados por *Mucor spp.*. Cinco espécies importantes de *Mucor* são consideradas relacionadas à deterioração de alimentos (*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. piriformis*, *M. plumbeus* e *M. racemosus*) (Botha e Botes, 2014).

As principais espécies de *Mucor* encontradas em queijos são *M. circinelloides*, *M. fuscus*, *M. lanceolatus*, *M. plumbeus* e *M. racemosus* (Morin-Sardin *et al.*, 2016). Garnier *et al.* (2017a) identificaram *M. circinelloides*, *M. racemosus* e *M. spinosus* a partir de queijo duro. No tradicional queijo de ovelha eslovaco, *M. circinelloides* foi identificado como o fungo predominante (Laurenčík *et al.*, 2008).

Alguns gêneros de bolores e leveduras podem produzir metabólitos secundários tóxicos, micotoxinas. Por exemplo, *M. circinelloides* é considerado um patógeno oportunista devido à capacidade de produção da micotoxina ácido 3-nitropropiónico (Hollmann *et al.*, 2008). Além disso, várias outras espécies de deterioração de fungos, incluindo espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, têm a capacidade de criar micotoxinas que podem ser perigosas para a saúde humana. Para efeitos potencialmente tóxicos, como impactos nefrotóxicos, neurotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, a presença de metabólitos tóxicos em alimentos e rações representa uma séria preocupação global para a saúde humana (Izzo *et al.*, 2022).

As espécies de *Mucor* são capazes de utilizar aerobicamente uma grande variedade de fontes de carbono, fermentando carboidratos e amônia ou nitrogênio orgânico. Para as condições de crescimento, as espécies de *Mucor* são capazes de crescer a temperaturas que variam de 0°C (por exemplo, *M. flavus*, *M. piriformis*, *M. plasmaticus* e *M. racemosus*) a 40°C (por exemplo, *M. recurvus*), a maioria das espécies de *Mucor* é capaz de crescer e esporular a temperaturas de 20°C a 30°C; As espécies de *Mucor* ocorrem em valores de pH entre 4 e 8; o valor limite da atividade hídrica para *Mucor* parece estar entre 0,92 e 0,93 (Botha e Du Preez, 1999).

### 2.6.2. Leveduras

As leveduras são microrganismos eucarióticos, fungos unicelulares, sendo classificadas como ascomicetos ou basidiomicetos. Geralmente são células esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular é binária. As leveduras são encontradas em produtos manufaturados que contêm gordura ou grande quantidade de açúcar, tais como os produtos lácteos (Jacques e Casaregola, 2008).

Leveduras podem interagir com outros microrganismos presentes em produtos lácteos, por três diferentes meios: (i) inibem ou eliminam microrganismos indesejáveis ou patogênicos que podem causar defeitos na qualidade do produto, (ii) inibem a cultura iniciadora, (iii) contribuem positivamente no processo de fermentação e maturação dando suporte a cultura iniciadora (Jakobsen e Narvhus, 1996).

O desenvolvimento de leveduras em produtos lácteos ocorre devido à capacidade desses microrganismos de tolerarem baixas temperaturas e acidez titulável, assimilar/fermentar a lactose ou galactose, assimilar ácidos orgânicos, tais como o succinato, ácido lático e cítrico, possuem atividade proteolítica e lipolítica sobre a caseína e a gordura presentes no leite, baixa atividade de água, resistência à salinidade e a desinfetantes (Jacques e Casaregola, 2008).

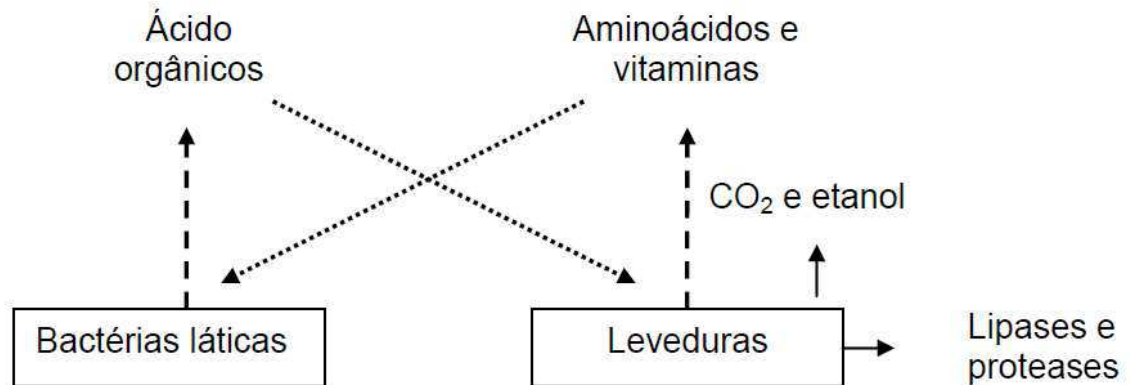
As bactérias lácticas que não fazem parte da cultura láctica, oriundas do leite ou do ambiente promovem diferentes características na fermentação de produtos lácteos, além de oferecerem um ambiente propício para o crescimento de leveduras (Wouters *et al.*, 2002).

Um efeito sinérgico positivo é a presença de algumas leveduras na maturação de certos queijos e em alguns produtos lácteos fermentados. Conforme a Figura 5, as bactérias lácticas produzem ácidos orgânicos, como o ácido lático e o cítrico. Por sua vez, as leveduras assimilam esses ácidos, formando álcool e CO<sub>2</sub>, aumentando assim o pH, criando um microambiente favorável para o crescimento de outras bactérias na superfície do queijo, como *Brevibacterium linens* (Paula, 2010). Além disso, as leveduras ao metabolizarem o ácido lático liberam vitaminas, tais como vitamina B, ácido pantotênico, niacina, riboflavina e biotina, as quais são importantes para o desenvolvimento das bactérias lácticas.

As leveduras produzem também outros metabólitos, como ácidos graxos de cadeia curta, proteases, lipases e outros compostos importantes para o desenvolvimento de aroma no queijo, como o etanol, acetaldeído, etilacetato e etilbutirato (Viljoen, 2003).

No entanto, poucos estudos relatam a protocooperação de bactérias lácticas e leveduras, sendo ainda pouco compreendidos (Ferreira e Viljoen, 2003). Acredita-se que para esse efeito ocorrer, as leveduras precisam alcançar altas densidades celulares e devem competir e interagir com outros organismos presentes, principalmente as LABs (Wouters *et al.*, 2002).

**Figura 5:** Esquema de compostos metabólicos produzidos e assimilados por bactérias lácticas e leveduras.



Fonte: Paula, 2010.

Por outro lado, as interações negativas de leveduras com bactérias lácticas em produtos lácteos fermentados podem levar a problemas econômicos e sensoriais. Deteriorações decorrentes de leveduras são particularmente comuns em produtos lácteos fermentados e em alguns queijos (Jacques e Casaregola, 2008). *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia* e *Candida* são os gêneros de leveduras tipicamente encontradas em queijos, iogurtes e outros leites fermentados (Atanassova *et al.*, 2003). *Candida edax*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, e principalmente *Debaryomyces hansenii* foram encontradas em amostras queijo Minas Frescal, leite pasteurizado tipo A, B e C, iogurte, manteiga e ricota (Silva, 2003).

O crescimento excessivo de certas leveduras em produtos lácteos pode levar a formação de gases, sabores e odores desagradáveis, despigmentações, modificações na textura, formação de limo e sedimentos, e crescimento superficial, como *D. hansenii* e *C. edax* (Álvarez-Martín *et al.*, 2008). Adicionalmente, algumas espécies de leveduras como *C. albidus*, *C. laurentii* são patógenos oportunistas, podendo ser capazes de causar diversos tipos de infecções em indivíduos susceptíveis, como os imunocomprometidos ou hospitalizados (Jacques e Casaregola, 2008).

Elevadas contaminações por leveduras são encontradas nas plantas de processamento. A presença desses microrganismos ocorre por várias fontes de contaminação, desde a obtenção da matéria-prima até o produto final. Diversos fatores tornam o ambiente de produção propício para o desenvolvimento de leveduras nos produtos lácteos, dentre eles, destacam-se: má qualidade da matéria-prima, condições de processamento, má higienização dos equipamentos, do ambiente, dos manipuladores, a eficiência da pasteurização, além de ingredientes, como polpas de frutas, mel, açúcar e castanhas (Viljoen, 2001). Outro fator agravante é a resistência das leveduras aos sanitizantes comerciais e outros produtos de desinfecção. Laubscher e Viljoen (1999) isolaram culturas de leveduras presentes no queijo Cheddar: *Candida versatilis*, *Candida rugosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera custesiana*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon beigeli*, *Torulaspota delbrueckii*. As leveduras apresentaram resistência, após 60 min de exposição a todos os sanitizantes comerciais

(clorinato, detergente ácido, detergente pasteurizado, sabonete germicida, detergente em pó, detergente alcalino, sanitizante iodopor, sanitizante ácido de peróxido) comumente utilizados nas indústrias de processamento de queijos.

O uso do leite cru contaminado por mastite bovina (inflamação das glândulas mamárias) pode afetar a produção e a qualidade do leite e derivados. Diversos microrganismos podem estar envolvidos na mastite, dentre esses as leveduras (Costa *et al.*, 2008). Espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Candida* têm sido isoladas em leite provenientes de animais acometidos por mastite. Costa *et al.* (2008) coletaram amostras de leite bovino e detectaram que as leveduras encontradas apresentaram pouca expressão na etiologia da mastite dos rebanhos estudados, no entanto o gênero mais encontrado foi *Candida spp.* Se o leite nestas condições for utilizado pela indústria e ocorrer falhas na pasteurização, a presença destes microrganismos poderá ser mantida até o produto final. Em contrapartida, sabe-se que as bactérias lácticas produzem efeitos antimicrobianos sobre leveduras presentes em produtos lácteos fermentados, pela produção de ácidos orgânicos, antibióticos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Atassanova *et al.*, 2003).

Os bolores e leveduras filamentosos podem deteriorar os alimentos e apresentar perigo à saúde humana devido à produção de micotoxinas. Em indivíduos imunocomprometidos ou hospitalizados, as leveduras podem colonizar o trato gastrointestinal e translocarem pela corrente sanguínea provocando infecções. O baixo valor de pH dos iogurtes e bebidas lácteas favorece o crescimento de leveduras, resultando na deterioração desses produtos lácteos fermentados (Atassanova *et al.*, 2003).

*Candida edax* são fungos ascomicetos, geralmente isolados de solo, produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas, fermentam a lactose e utilizam o ácido láctico. No Brasil, o isotipo *Stephanoascus smithiae* é comumente encontrado. Trata-se de um microrganismo não patogênico, que assimila maltose, galactose, sacarose, citrato e fermenta maltose, glucose e galactose (Prachyakij *et al.*, 2007). Por se tratar de um microrganismo característico de solos, cogita-se a possibilidade de sua transferência para plantas e delas para os frutos.

Como os iogurtes são acrescidos de polpas de frutas, provavelmente a presença da *Candida edax* no produto seja pelo uso de frutos contaminados. Kavas *et al.* (2006) investigaram a ocorrência e o tipo de leveduras presentes em queijos e iogurtes produzidos na região da Turquia. Foi encontrado *Candida sp.* em todos os produtos analisados.

*Debaryomyces hansenii* é um grupo heterogêneo, não patogênico, sendo osmo, halo e xerotolerantes, possuem habilidade de desenvolverem em baixas temperaturas e assimilam lactato, citrato e galactose. Produz enzimas lipolíticas e proteolíticas, as quais metabolizam a gordura e as proteínas do leite. Possui crescimento ótimo de 20-25 °C, porém podem crescer entre 5-10 °C (Breuer

e Harms, 2006). Além disso, acumulam lipídios em suas células e produzem compostos voláteis importantes no queijo, tais como ácidos, álcoois, carbonil e sulfatos.

Alguns estudos relatam que *D. hansenii* fornece fatores de crescimento para bactérias, tais como vitaminas (tiamina, ácido pantotênico, nicotínico, fólico e biotina) e aminoácidos (Wouters *et al.*, 2002; Breuer e Harms, 2006). *Debaryomyces hansenii* sintetiza e tolera várias toxinas produzidas por outros microrganismos. Algumas cepas podem inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes (bolores e leveduras filamentosos) em efeito simbiótico com as LABs. Esse efeito inibitório é causado principalmente, pelo abaixamento do pH por LAB e pela produção de álcool e CO<sub>2</sub> por leveduras (Breuer e Harms, 2006). Liu e Tsao (2009a) observaram que apesar do efeito inibitório ser dependente do tipo de fungo filamentoso e da quantidade de esporos, estudos comprovam que esta levedura possui capacidade antimicrobiana sobre esses fungos *Aspergillus*, *Byssochlamys* e *Eurotium* presentes em queijos e iogurtes armazenados sem refrigeração.

A presença de *Debaryomyces hansenii* em produtos lácteos fermentados pode causar odor desagradável (Breuer e Harms, 2006). As contaminações em iogurtes se dão por diversas origens, conforme já citado anteriormente. Elgadi, Gardir e Dirar (2008) isolaram espécies de leveduras presentes no leite cru bovino. De acordo com a morfologia e testes bioquímicos realizados, dentre as espécies, foi constatada a presença de *Debaryomyces hansenii*.

Os produtos alimentares são suscetíveis à deterioração dos bolores e leveduras devido à sua composição natural rica em nutrientes. Esta susceptibilidade depende, no entanto, de vários fatores, nomeadamente (i) a natureza da matriz alimentar (material vivo ou não, líquido ou sólido), sua composição (teor de nutrientes, tipo de soluto) e biológico (por exemplo, sua microbiota natural), parâmetros físicos-químicos (atividade da água, pH); (ii) gestão durante a colheita de frutas e vegetais (maturidade, manuseio) e armazenamento de matérias-primas (temperatura, higrometria e duração); (iii) processos tecnológicos aplicados durante a fabricação (por exemplo, aquecimento, secagem, salga, fermentação, adição de conservante) incluindo limpeza / desinfecção passos; e (iv) condições de armazenamento após a fabricação (tipo, atmosfera e extensão da embalagem, temperatura, umidade relativa). Características intrínsecas da matriz alimentar e também extrínseca associada fatores controlam o desenvolvimento de certos gêneros ou espécies de bolores e leveduras.

Neste contexto, é crucial reduzir as perdas alimentares, controlando a contaminação por bolores e leveduras em todas as fases das cadeias do processo alimentar. Três estágios principais podem ser definidos para agrupar fatores de contaminação fúngica: (i) o campo, onde a água, o solo e o ar são nichos fúngicos naturais; (ii) matérias-primas - como culturas pós-colheita, carnes e leite - onde a ocorrência de fungos está relacionada ao manejo de alimentos durante a colheita ou coleta,

transporte, armazenamento e embalagem (Pitt e Hocking, 2009) e (iii) durante o processamento de alimentos durante a fabricação.

Em relação à qualidade, o impacto das contaminações fúngicas pode levar a defeitos visuais e / ou outros. Em relação aos defeitos visuais, o mais óbvio é o aspecto do produto com crescimento fúngico aparente devido a presença notável de colônias de talo ou fermento que acabam levando a podridão. A presença de manchas pretas, brancas, verdes, cor-de-rosa ou amarelas também podem ser associadas ao desenvolvimento de bolores e leveduras (Pitt e Hocking, 2009). Isso geralmente leva à eliminação de todo o produto no nível industrial ou consumidor. De acordo com a natureza da mercadoria e o tipo de contaminante, o impacto pode ser menos evidente para observar, mas o metabolismo fúngico pode levar a vários defeitos organolépticos, incluindo a produção de gás, alterações de sabores e as mudanças de textura. Um dos melhores sabores desconhecidos associados à contaminação por bolores e leveduras corresponde ao desenvolvimento de aroma semelhante a animal ligado a fenóis voláteis (4-etil fenol, guaiacol ou catecol).

## **2.7. Culturas com propriedades bioprotetoras**

Atualmente há uma demanda forte e crescente dos consumidores por alimentos benéficos mais “naturais”, ou seja, menos processados e sem conservantes (Huang *et al.*, 2022; Rashwan *et al.*, 2022; Shori, 2022; Suwannasang *et al.*, 2022; Tang *et al.*, 2022). No entanto, a biopreservação não é um conceito novo, pois tem sido usado há milhares de anos em alimentos fermentados. Também chamado de biocontrole ou bioconservação é definida como a extensão da vida de prateleira e aumento da segurança dos alimentos por meio de recursos naturais, o que inclui os microrganismos ou seus metabólitos (Yusuf, 2018). As culturas bioprotetoras de alimentos podem, assim, ser definidas como cepas bacterianas ou fúngicas de grau alimentício que foram selecionadas por suas propriedades antimicrobianas. Eles diferem das culturas iniciadoras ou adjuntas que são usadas principalmente por suas funções tecnológicas (produção de ácido e aroma, papel na textura, cor, etc.).

Em relação às culturas bioprotetoras utilizadas em produtos alimentícios, além de serem eficazes no controle da deterioração causada pelos bolores e leveduras, ser seguro para o consumo humano é o mais importante. As culturas bioprotetoras selecionadas não devem ter impacto negativo nas propriedades de qualidade dos alimentos e na saúde humana, exibir e manter-se ativas durante a fabricação e armazenamento de alimentos. Os principais requisitos desejáveis das culturas bioprotetoras em produtos alimentícios incluem: (1) As culturas devem ser GRAS (“geralmente reconhecidos como seguros”); (2) Permanecer ativo com o menor inóculo possível durante a fabricação e distribuição do produto para reduzir o custo; (3) Ser resistente ao antibiótico, liofilização ou congelamento; (4) Nenhuma produção de quaisquer substâncias nocivas para o ser humano, tais

como a amina biogénica; e (5) Nenhum efeito sobre as propriedades sensoriais intrínsecas, como sabor e textura (Shi e Maktabdar, 2022).

A proteção da qualidade dos produtos lácteos tem sido um dos aspectos mais importantes para a indústria, sobretudo pela exigência de mercado por produtos saudáveis e seguros. Apesar de grandes avanços na produção de lácteos e da implementação de procedimentos eficazes de controle sanitário, como BPF (Boas Práticas de Fabricação), PPHO (Procedimentos Padrões de Higiene Operacionais) e APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), diversos estudos têm mostrado que muitos microrganismos patogênicos ainda não estão sob controle e que produtos contaminados ainda podem chegar aos consumidores.

Salas *et al.* (2017) fizeram uma revisão que apresenta os principais tipos de bolores e leveduras encontrados em produtos alimentares, os microorganismos antifúngicos testados para bioproteção de alimentos e seus mecanismos de ação. Nesse sentido, foi dado um foco em particular sobre os recentes estudos *in situ* e as restrições associadas ao uso de antifúngicos agentes microbianos para biopreservação alimentar. A crescente demanda social por produtos alimentares menos processados e mais naturais – enquanto conservando a qualidade, a segurança e a vida de prateleira desses produtos - levantou a questão da substituição do conservante químico. Neste contexto, bactérias e bolores e leveduras, bem como seus metabólitos naturais são alternativas de interesse para uso em alimentos como ferramentas bioprotetoras para combater a deterioração causada por bolores e leveduras respondendo assim as demandas dos consumidores e da legislação.

Do ponto de vista aplicado, a diferença entre o número de estudos e o número de culturas microbianas disponíveis indica que são necessários esforços para facilitar sua aplicação em produtos alimentares. Um dos principais aspectos diz respeito ao papel crucial de estudos *in situ* usando alvos fúngicos adaptados durante processos de triagem ou confirmação de atividade antifúngica. Além disso, a avaliação de segurança, neutralidade organoléptica e estabilidade de atividade das culturas bioprotectas precisam ser avaliadas antes do marketing.

Do ponto de vista cognitivo, enquanto compostos antifúngicos foram amplamente estudados, e geralmente foram mostrados para atuar de forma sinérgica, ainda há falta de conhecimento sobre o quadro geral sobre o que as moléculas estão envolvidas e suas ações/mecanismo(s). A combinação de instrumentos analíticos bioquímicos e métodos nos permitem decifrar mecanismos de ação antifúngica, identificando potencialmente novas alavancas para atividade antifúngica. Finalmente, encontrar agentes antifúngicos naturais é um fator chave, que só pode ser considerado em boas práticas e dentro do contexto APPCC como uma das tecnologias de obstáculos para prevenir a deterioração de bolores e leveduras (Salas *et al.*, 2017).



A deterioração dos alimentos é um problema importante para a indústria alimentar, levando ao desperdício de alimentos, perdas econômicas substanciais para os fabricantes e consumidores e um impacto negativo nas marcas. Entre as causas, a contaminação por bolores e leveduras pode ser encontrada em vários estágios da cadeia alimentar (por exemplo, pós-coleta, durante o processamento ou armazenamento). O desenvolvimento de bolores e leveduras leva a defeitos sensoriais de alimentos que variam de deterioração visual a alterações visíveis de odor, sabor ou textura, mas também podem ter impactos negativos para a saúde através da produção de micotoxinas em alguns bolores. Para evitar a deterioração microbiana e assim prolongar a vida útil do produto, são utilizados diferentes tratamentos - incluindo fungicidas e conservantes químicos.

Paralelamente, as autoridades públicas encorajam a indústria alimentar a limitar o uso desses compostos químicos e desenvolver métodos naturais para a preservação de alimentos. Isso é acompanhado por uma forte demanda social por produtos alimentícios de "etiqueta limpa", pois os consumidores procuram produtos mais naturais, menos severamente processados e mais seguros. Neste contexto, os agentes microbianos correspondentes a culturas bioprotetoras, fermentados, sobrenadantes sem cultura ou moléculas purificadas, que exibem atividades antifúngicas representam um interesse crescente como alternativa à preservação química.

Nos últimos anos, muitas cepas de várias espécies microbianas com propriedades antifúngicas foram identificadas. Eles foram isolados de várias fontes, como frutas, vegetais, cereais, leite, carne e outros produtos relacionados com alimentos. O isolamento de novas culturas bioprotetoras tem sido recentemente estendido a outros ambientes, como amostras de solo de profundidade (Wang *et al.*, 2015) e antártica (Vero *et al.*, 2013), a fim de descobrir microorganismos potencialmente produtores de novos metabólitos antifúngicos.

### **2.7.1. Bactérias ácido lácticas (LAB)**

As bactérias ácido lácticas (LAB) constituem um grupo de microrganismos que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas comuns. Entretanto, não apresentam uma definição única; sendo, portanto, descritas amplamente como microrganismos gram-positivos, não esporulantes, quase sempre catalase negativa, anaeróbios, aerotolerantes, ácido tolerantes e com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação de carboidratos (Pfeiler e Klaenhammer, 2007).

As LAB encontram-se sob as formas de cocos ou bacilos e estão associadas a ambientes nutricionalmente ricos e complexos como vegetais, leite, carne e trato gastrointestinal humano e animal. A fonte de energia é proveniente de matérias orgânicas, em especial os carboidratos e por isso são denominados quimiorganotróficos. Classificam-se como mesófilos ou termófilos,

apresentando temperatura ótima de crescimento variando de 30 a 37 °C e de 45 a 50 °C respectivamente (Ferreira, 2003).

Desde os tempos antigos, as LABs são amplamente utilizadas na produção de alimentos devido à sua capacidade de produzir metabólitos eficientes, como o ácido láctico e sintetizar uma ampla gama de metabólitos que impactam positivamente as propriedades nutricionais, sensoriais e tecnológicas dos produtos alimentícios (Pawlowska *et al.*, 2012). A segurança da LAB tem sido avaliada por diferentes pesquisadores em uma extensão limitada em seres humanos. O LAB recebeu o status de GRAS e QPS pela American Food and Drug Agency (FDA) e pela European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos - EFSA), respectivamente. Assim, a LAB tem sido amplamente utilizado como culturas iniciais de produtos alimentares fermentados, probióticos. Mais importante ainda, as LAB são consideradas culturas bioprotetoras promissoras contra organismos indesejados em produtos alimentícios, especialmente em produtos lácteos fermentados.

Um grande número de microorganismos foram testados nos últimos anos quanto à sua atividade antifúngica contra a degradação de alimentos aumentando assim a vida de prateleira dos produtos alimentares. As bactérias ácido lácticas (LAB) são, de longe, os principais microorganismos testados para aplicação em produções de produtos lácteos e de padaria, os dois principais setores alimentares estudados para biopreservação contra bolores e leveduras (Salas *et al.*, 2017). Durante a fermentação, essas bactérias produzem ácidos lácticos e outros ácidos orgânicos reduzindo assim o pH do produto alimentar tornando-o desfavorável ao crescimento de microorganismos indesejados como bactérias patogênicas, leveduras e bolores. Além disso, algumas dessas bactérias também produzem metabólitos com atividade antimicrobiana.

A LAB abrange um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram-positivas, de baixa GC, tolerantes a ácidos, que produzem ácido láctico como o principal produto metabólico final da fermentação de carboidratos. LAB pertence à ordem *Lactobacillales*, que inclui 6 famílias, 36 gêneros e mais de 200 espécies. Eles são encontrados em vários biótopos, como o meio ambiente, plantas, microbiota humana e animal. Eles são em grande parte usados na fabricação de uma grande variedade de alimentos fermentados, onde contribuem para melhorar a vida útil, propriedades organolépticas e valor nutricional desses alimentos.

As principais LAB em alimentos fermentados correspondem às espécies pertencentes aos *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* pois foram as mais estudadas devido a atividade antifúngica (Crowley *et al.*, 2013) e também foram os mais avaliados *in situ* nos últimos anos. Entre essas, a *Lactobacillus plantarum* é a espécie mais estudada que representa cerca de um terço dos

relatórios sobre LAB e muitos diferentes cepas foram testadas como antifúngicas nos alimentos desde 2013 (Salas *et al.*, 2017).

Cepas de *L. plantarum* e seus metabólitos foram testados em uma ampla gama de alimentos onde inibiram diferentes espécies de bolores e leveduras como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula* e *Pichia spp.* *L. plantarum* é omnipresente espécies (Scholz e Kilian, 2016) e é encontrada em uma ampla gama de nichos ecológicos, como leite (Delavenne *et al.*, 2012). *L. plantarum* é também amplamente presente em alimentos fermentados, incluindo diferentes variedades de queijo (Zhang *et al.*, 2014), e, portanto, tem potencial para ser testado como uma cultura antifúngica em uma grande variedade de aplicações. A triagem de LAB para cepas que exibem atividade antifúngica demonstrou que *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *Lactocaseibacillus casei* incluem cepas com atividade antifúngica (Xu *et al.*, 2021).

Outras espécies de *Lactobacillus* também foram recentemente identificadas como potenciais culturas antifúngicas, como *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus Sakei* que quando adicionadas como culturas adjuvantes em alimentos fermentados, mostraram ser capazes de prolongar a vida útil de vários produtos: bebidas fermentadas (Ryu *et al.*, 2014) e iogurte e queijos (Crowley *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Delavenne *et al.*, 2015).

Num estudo realizado por Lačanin *et al.* (2017), de um total de 11 *L. rhamnosus* pesquisadas, 10 foram isoladas do iogurte e uma do queijo. As demais LABs estudadas, num total de 101, foram isolados de diferentes amostras, incluindo carne fermentada (salame, presunto, salsicha) e produtos lácteos (leite cru de vaca, ovelha e cabra, iogurte, soro de leite, colostro e queijo).

Hornbaek *et al.* (2015) relatam o uso de *L. paracasei* para conferir propriedades antifúngicas para um produto lácteo fermentado e concluíram que esta cultura tem um efeito significativamente maior contra leveduras em comparação com culturas bioprotetoras comerciais do mercado. Eles relataram ainda que *L. paracasei* quando combinado com *L. rhamnosus* exibem uma sinergia significativa aumentando o efeito antimicrobiano. Portanto, o efeito antimicrobiano dos dois grupos de bactérias combinados (*L. paracasei* e *L. rhamnosus*), surpreendentemente, é maior do que a soma dos efeitos individuais dos dois grupos de bactérias.

Paula (2010) relatou que as culturas probióticas comerciais *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* podem ser utilizadas como bioconservantes de produtos lácteos, oferecendo produtos seguros com ampla vida de prateleira. Segundo este estudo, no desenvolvimento das bebidas lácteas fermentadas por culturas probióticas *L. acidophilus* houve inibição de *Cryptococcus albidus* e nos produtos com *L. casei*, houve inibição de ambas as culturas de leveduras adicionadas (*Cryptococcus Laurentii* e *Cryptococcus albidus*), durante todo o período de estocagem refrigerada.

A presença da levedura alterou os valores de acidez titulável, pH e tempo de fermentação, sem afetar a viabilidade das bactérias lácticas.

Até agora, os ácidos orgânicos fracos são considerados como os principais produtos finais de fermentação do metabolismo de carboidratos do LAB, que incluem ácido lático, ácido acético, ácidos propiônicos, ácido azelaico, ácido hidrocinaâmico, ácido DL-fenil-lático, ácido DL-hidroxi-fenil-lático, ácido p-cumárico, ácido polipórico, ácido 2-hidroxi-benzóico, ácido 4-hidroxi-benzóico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido succínico, ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, etc (Leyva Salas *et al.*, 2017). Dentre os ácidos orgânicos produzidos pelo LAB, os metabólitos mais bem caracterizados e mais eficazes produzidos pelo LAB são o ácido lático e o ácido acético, que são bioativos em sua forma protonada em pH baixo (ARENA, M. P. *et al.*, 2016). Garnier *et al.* (2020) também relataram que os ácidos propiônico, lático, acético e butírico foram os produtos de fermentação mais abundantes gerados pelo *L. rhamnosus*. Entre os microrganismos que possuem propriedades antimicrobianas, as bactérias ácido lácticas (LAB) produzem uma grande variedade de substâncias antimicrobianas, incluindo além dos ácidos orgânicos, ácidos graxos, reuterina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (Lassois *et al.*, 2008).

Além dessas substâncias, a contribuição dos voláteis antifúngicos produzidos pelas LABs não pode ser negligenciada ou subestimada. Três compostos voláteis em grandes quantidades produzidos pelas LABs em creme azedo (diacetil, acetoína e um composto volátil não identificado) apresentaram efeitos inibitórios sobre o crescimento de *P. commune* (Leyva Salas *et al.*, 2019). Arrebola *et al.* (2010) também relataram as atividades antifúngicas de voláteis como diacetil, acetoína, 2-butanona e ácidos graxos voláteis. Aunsbjerg *et al.* (2015a) identificaram um volátil principal, diacetil, num fermentado contendo células de *L. paracasei* em um meio definido, exibiu fortes efeitos inibitórios em duas cepas de *Penicillium*. Lo *et al.* (2018) relataram que doze das treze cepas de *L. rhamnosus* produziram alto diacetil. A produção de diacetil pela LAB pode ser afetada por vários fatores, como pH, substratos e temperatura.

Além disso, estudos recentes descobriram que as interações entre os metabólitos microbianos produzidos por diferentes culturas bioprotetoras podem estar envolvidas nos efeitos antifúngicos. Por exemplo, Lee *et al.* (2020) sugeriram que, nas combinações de LAB, os tipos de LAB e suas razões de inoculação influenciaram marcadamente os tipos e concentrações de metabólitos produzidos durante a fermentação do kimchi (condimento típico da culinária coreana que tem hortaliças como a base de seu preparo, junto com um molho vermelho bem apimentado). Da mesma forma, Schwenninger *et al.* (2008) demonstraram que a combinação de *L. paracasei subsp. paracasei* SM20 e *Propionibacterium jensenii* aumentou a produção de ácido acético e ácido

propiónico, mas diminuiu a concentração de lactato. Foi levantada a hipótese de que o lactato foi consumido pela combinação.

Nos últimos anos, os pesquisadores pretendem filtrar culturas LAB bioprotetoras mais eficientes. Diversas pesquisas caminham com esse objetivo. Além dos vários estudos já relatados nessa revisão bibliográfica, mais recentemente, por exemplo, Shi e Knøchel (2021), descobriram que *L. plantarum* LP37 e *L. plantarum* LP48 exibiram interação positiva no crescimento de bolores em placas de ágar de iogurte. O efeito antifúngico da combinação melhorou significativamente.

Além das interações entre as culturas LAB, as combinações de LAB com outras cepas bacterianas, como bactérias do ácido propiónico, também foram bastante estudadas. Schwenninger e Meile (2004) sugeriram que o efeito antifúngico das cepas de *L. paracasei subsp. paracasei* (SM20, SM29 ou SM63) aumentou devido à combinação com *Propionibacterium jensenii* SM11. As culturas combinadas atrasaram o crescimento de leveduras em iogurte e queijos a 6°C sem afetar as propriedades de qualidade dos produtos lácteos. Além disso, Fernandez *et al.* (2017) indicaram que atividade antifúngica sinérgica foi observada entre *L. rhamnosus* A238 e *Bifidobacterium animalis* contra *P. chrysogenum* em queijo cottage.

Atualmente, existem algumas culturas bioprotetoras disponíveis comercialmente para controlar a deterioração fúngica de produtos lácteos fermentados. HOLDBAC YM-B (Fermentech/Danisco Brasil) composto por co-culturas de *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, HOLDBAC YM-XPM (DuPont ApS, Dinamarca) composto por co-culturas de *L. paracasei* e *L. plantarum* são utilizados na produção de iogurte para controlar o crescimento de leveduras e bolores de deterioração; HOLDBAC YM-XPK (*L. plantarum*) é aplicado como cultura bioprotetora em todos os tipos de queijos; FreshQ (Chr. Hansen, Dinamarca) são compostos de culturas bioprotetoras que atuam sinergicamente com a cultura inicial de produtos lácteos fermentados contra organismos fúngicos que causam deterioração.

### 2.7.2. Propionibactérias lácteas (PAB)

Salas e colaboradores (2017) também relatam que as propionibactérias lácteas (PAB) são consideradas como antifúngicas. O gênero *Propionibacterium*, pertencente à classe *Actinobacteria*, é uma bactéria Gram-positiva, de alto teor de GC, dividida em propionibactérias "cutâneas" e "clássicas" (também conhecidas como "lácteas") com base em seus principais biótopos de isolamento (Stackebrandt *et al.*, 2006). A PAB e a taxonomia das espécies relacionadas foram recentemente reconsideradas, com, em particular, o PAB "lácteo" separado no gênero *Propionibacterium*, composto por *P. freudenreichii*, as principais espécies utilizadas na fabricação de queijo e outras três

espécies, e um novo gênero - *Acidipropionibacterium* - que engloba as espécies anteriores *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii* e outras três espécies (Scholz e Kilian, 2016).

A *Propionibacterineae* é um dos dez subgrupos da classe *Actinobacteria*. A subclasse *Propionibacterium* inclui *Propionibacteriaceae*, *Propionibacterium*, *Luteococcus*, *Micrococcus* e *Propioniferax*. Recentemente, os gêneros *Friedmanniella*, *Tessaracoccus*, *Micropruina* e *Propionimicrobium* foram adicionados à família *Propionibacteriaceae*. As bactérias do ácido propiônico (PAB) foram identificadas pela primeira vez por Von Freunderich e Orla Jensen em 1906 e divididas conforme dito anteriormente em dois grupos como PAB clássico, que são encontrados no queijo, e o PAB de origem na pele, os "cutâneos" (Cousin *et al.*, 2011). Os membros do grupo cutâneo são os membros dominantes da flora microbiana encontrada na pele humana (Darilmaz, 2010).

Em um estudo de rastreio *in vitro* revelou que quase todas as cepas PAB estavam ativas *in vitro* contra cinco espécies de bolores. Apenas duas cepas de *P. acidipropionici* e *P. freudenreichii* atrasaram ligeiramente o crescimento de *A. Niger* e *P. corylophilum* em rolos de pão de leite pulverizados com culturas antifúngicas (Le Lay *et al.*, 2016).

Segundo Yerlikaya *et al.* (2020), embora as propionibactérias *spp.* serem usadas para muitos fins, incluindo cultura biopreservativa e adjuvante, *P. freudenreichii* também pode ser adequado para a produção de bebidas lácteas probióticas e que não há efeitos adversos nas propriedades físico-químicas, reológicas, microbiológicas e sensoriais do produto.

Várias pesquisas vêm sendo realizadas para descobrir e isolar propionibactérias *spp.* Geralmente as bactérias clássicas do ácido propiônico são comumente encontradas no leite cru, na manteiga e, principalmente, nos queijos do tipo suíço, onde desempenham um papel importante no seu processo de maturação. Durante a produção do queijo, as bactérias do ácido láctico (LAB), especialmente as espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus*, convertem lactose em lactato (Darilmaz, 2010).

Além do uso em laticínios, eles podem ser usados para fermentar alguns componentes de outros produtos alimentícios. Em particular, eles podem aumentar o período de armazenamento de produtos alimentícios fermentados graças aos seus componentes antimicrobianos. No entanto, essas conclusões precisam ser mais investigadas quanto a sua eficácia como antimicrobiano principalmente na realidade higiênico-sanitárias e temperatura ambiente do Nordeste brasileiro durante a obtenção da matéria-prima e também durante o processamento de iogurte e bebida láctea.

Outro fato interessante é que algumas pesquisas apontam que “essas bactérias são usadas na indústria de fermentação para a produção de vitaminas B2 e B12, ácido propiônico, b-galactosidase e bacteriocina (Leblanc *et al.*, 2006)”. Em outros estudos, concluiu-se que o propionato, também produzido por bactérias do ácido propiônico, aumenta a absorção de cálcio e ferro no intestino

(Bougle *et al.*, 1999). Além disso, estudos indicam também que as bactérias de ácido propiônico podem aumentar o número de *Bifidobacterium spp.* no sistema intestinal (Kaneko *et al.*, 1994) e também afetam a atividade das enzimas fecais (Suomalainen *et al.*, 2008). Outros autores concluíram curiosamente que *P. freudenreichii*, que é comercialmente usado na indústria farmacêutica, tem um papel importante na produção de vitamina B12 (Chamlagain *et al.*, 2016).

Em outro estudo, a cepa *P. freudenreichii* NIZO B2336, que é conhecida por produzir grandes quantidades de riboflavina, foi usada na produção de iogurte, e os iogurtes foram administrados a ratos alimentados com uma dieta deficiente em riboflavina. De acordo com os resultados, em ratos alimentados com iogurte contendo ácido propiônico, os valores de riboflavina foram maiores do que aqueles alimentados com iogurte normal (Leblanc *et al.*, 2006). Estas pesquisas demonstram a importância das propionibactérias também na indústria farmacêutica.

Estudos realizados por Darilmaz e Beyatli (2019) relataram que uma cepa de *P. freudenreichii* pode ter um uso potencial como probiótico para a desconjugação de sais biliares em estudos in vivo. Além disso, as fortes propriedades anticarcinogênicas do ácido rumínico, o outro isômero produzido, é outra propriedade funcional da bactéria do ácido propiônico (Wang *et al.*, 2007).

Os probióticos são microrganismos vivos que fornecem benefícios à saúde para os hospedeiros após a ingestão de quantidades suficientes (Hill *et al.*, 2014). Iogurte e produtos lácteos fermentados são conhecidos como os principais transportadores de bactérias probióticas (Cordeiro *et al.*, 2019; Garcia *et al.*, 2019; Sarfraz *et al.*, 2019; Vasconcelos *et al.*, 2019). Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são frequentemente usados em produtos probióticos como culturas probióticas na indústria de alimentos devido aos seus efeitos na promoção da saúde (Darilmaz e Beyatli, 2019). Além desses dois gêneros, algumas cepas de outras bactérias do ácido láctico e *Propionibacterium spp.* também foram considerados probióticos (Champagne *et al.*, 2018; Ranadheera *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2019).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em um laticínio localizado no município de Caturité-PB em parceria com os Departamentos de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Em todos os experimentos com os iogurtes, as análises físico-químicas (pH e acidez titulável) e microbiológicas (Contagem de bolores e leveduras) foram realizados no laticínio. As análises do comportamento reológico (viscosidade aparente) foram realizadas no Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) e as análises de textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) e separação de soro (sinérese) foram realizadas no Laboratório de Análises Físicas de Engenharia de Alimentos.

#### 3.1. Culturas Bioprotetoras Comerciais

Para o estudo foram utilizadas uma cultura comercial composta apenas por bactérias lácticas (LAB) e uma cultura comercial composta por bactérias lácticas (LAB) e propionibactérias lácteas (PAB) com ações bioprotetoras:

1. *Lactobacillus rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU) fornecida pela IFF Health & Biosciences, França, representada no Brasil pela Fermentech/Danisco;
2. *Lactobacillus rhamnosus* (FreshQ® 11) fornecida pela Novanesi, Dinamarca.

Essas culturas foram preparadas para os experimentos de acordo com a dosagem recomendada pelos fabricantes ou com uma dosagem dobrada. Para isso, cada cultura foi dissolvida em 1,0L de leite pasteurizado na temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , armazenada em microtubos esterilizados de 1,5mL e mantida congelada a  $-10^\circ\text{C}$  por 15 dias. Na ocasião do uso, cada cultura diluída foi retirada do congelamento e colocada em banho-maria a  $45^\circ\text{C}$  até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 2,0mL ou 4,0mL da cultura bioprotetora para cada 2,0L de leite na temperatura de  $42\pm 1^\circ\text{C}$  juntamente com as culturas lácteas liofilizadas comerciais YoFlex Harmony 1.0 (*S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*), denominadas aqui de culturas iniciais, fornecido pela Novanesi, Dinamarca, em que um envelope foi desenvolvido para inocular 1000g de iogurte. Para a realização de todos os experimentos, foi dissolvido um envelope contendo essas culturas iniciais em 1,0L de leite pasteurizado na temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , armazenadas em microtubos esterilizados de 1,5mL e mantidas congeladas a  $-10^\circ\text{C}$  por 15 dias. Na ocasião do uso, cada cultura diluída foi retirada do congelamento e colocada em banho-maria a  $45^\circ\text{C}$  até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi agitada lentamente com bastão de vidro por 5 minutos para distribuir as culturas de forma uniforme.



### 3.2. Distribuição dos Experimentos

Os experimentos foram realizados em duas fases. Na fase I foram formulados 8 tipos de iogurtes em escala de laboratório usando 2,0L de leite pasteurizado integral fornecido pelo laticínio sem realizar nenhuma contaminação inicial dos mesmos após a etapa de resfriamento. Em função dos resultados da fase I com relação a inibição fúngica, 4 tipos de iogurtes foram formulados também em escala de laboratório usando 2,0L de leite pasteurizado integral e, após a etapa de resfriamento, foi realizado uma contaminação intencional com uma concentração conhecida de bolores e leveduras.

Na fase I, para o estudo da capacidade bioconservante e de seus efeitos no iogurte e comparação com o conservante químico, para os 2 tipos de culturas bioprotetoras comerciais foram usadas as dosagens de 0,1% e 0,2% (v/v) e as concentrações do conservante químico sorbato de potássio de 0,015g/100g e 0,03g/100g, que é a concentração máxima permitida para leites fermentados pela Instrução Normativa 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura. A concentração de sorbato de potássio de 0,015g/100g foi usada juntamente com a dosagem de 0,1%v/v de cada cultura bioprotetora para estudar o efeito da diminuição do conservante químico e a introdução das culturas bioprotetoras sobre a inibição fúngica.

Também houve experimentos em que não se usou culturas bioprotetoras e outros também não se usou o sorbato de potássio. Além disso, não se elaborou iogurtes contendo as culturas comerciais *HOLDBAC-YMB* e *FRESHQ-11* juntas na mesma formulação. Portanto, para cada cultura bioprotetora estudada, foram analisadas duas variáveis: Dosagem em % v/v da cultura bioprotetora e a concentração do conservante químico sorbato de potássio, conforme a Tabela 01.

Tabela 01: Distribuição dos experimentos para o estudo do desempenho dos bioconservantes.

<b>Exp.</b>	<b>Conservante Químico (g/100g)</b>	<b>Culturas Bioconservantes comerciais</b>	<b>Conc. (v/v)</b>	<b>Denominação</b>
1	0,030	Ausente	0,0%	<b>controle1</b>
2	0	Ausente	0,0%	<b>controle2</b>
3	0,015	<i>HOLDBAC YM-B</i>	0,1%	<b>H1</b>
4	0,015	<i>FRESHQ-11</i>	0,1%	<b>F1</b>
5	0	<i>HOLDBAC YM-B</i>	0,1%	<b>H2</b>
6	0	<i>FRESHQ-11</i>	0,1%	<b>F2</b>
7	0	<i>HOLDBAC YM-B</i>	0,2%	<b>H3</b>
8	0	<i>FRESHQ-11</i>	0,2%	<b>F3</b>

Este estudo baseia-se em metodologias adaptadas de pesquisas semelhantes anteriores, como aquelas conduzidas por Zhao e Liang (2022), Fayyaz *et al.* (2020), Li *et al.* (2013), entre outros, em que se comparou os parâmetros do iogurte contendo culturas bioprotetoras em diferentes dosagens com um iogurte controle contendo apenas culturas iniciais. A diferença desses estudos para a presente

pesquisa é que os mesmos usaram outras culturas bioprotetoras ou cepas diferentes e não compararam o desempenho dos iogurtes contendo bioconservantes com o iogurte contendo o conservante químico sorbato de potássio, além da qualidade microbiológica inferior da matéria-prima utilizada no presente estudo.

O primeiro experimento da fase I foi realizado usando a concentração de 0,03g/100g do conservante sorbato de potássio como o único agente químico antimicrobiano. Este iogurte, portanto, foi o iogurte controle1 e os parâmetros das análises físico-químicas, microbiológicas, comportamento reológico, sinérese e textura foram usados para comparação com os iogurtes preparados com as culturas de bactérias lácticas (LAB) e propionibactérias lácteas (PAB).

Em seguida, foi realizado o experimento 2 sendo o iogurte formulado sem conservante químico e sem bioconservantes. Este iogurte, portanto, foi o iogurte controle2 sendo também usado como referência para comparação dos parâmetros mencionados.

Posteriormente, foram realizados os experimentos 3 e 4 usando o conservante sorbato de potássio na concentração de 0,015g/100g juntamente com as culturas bioprotetoras na dosagem de 0,1%v/v (2,0mL de bioconservante / 2000mL de iogurte) recomendada pelos fabricantes conforme a Tabela 01. Depois, foram realizados os experimentos 5 e 6 usando apenas as culturas bioprotetoras na dosagem recomendada pelos fabricantes de 0,1% (v/v) como agentes antimicrobianos, sem o conservante sorbato de potássio.

Finalmente, foram realizados os experimentos 7 e 8 usando apenas as culturas bioprotetoras como agentes antimicrobianos na dosagem de 0,2%v/v (4,0mL de bioconservante / 2000mL de iogurte).

### **3.3. Preparação do iogurte**

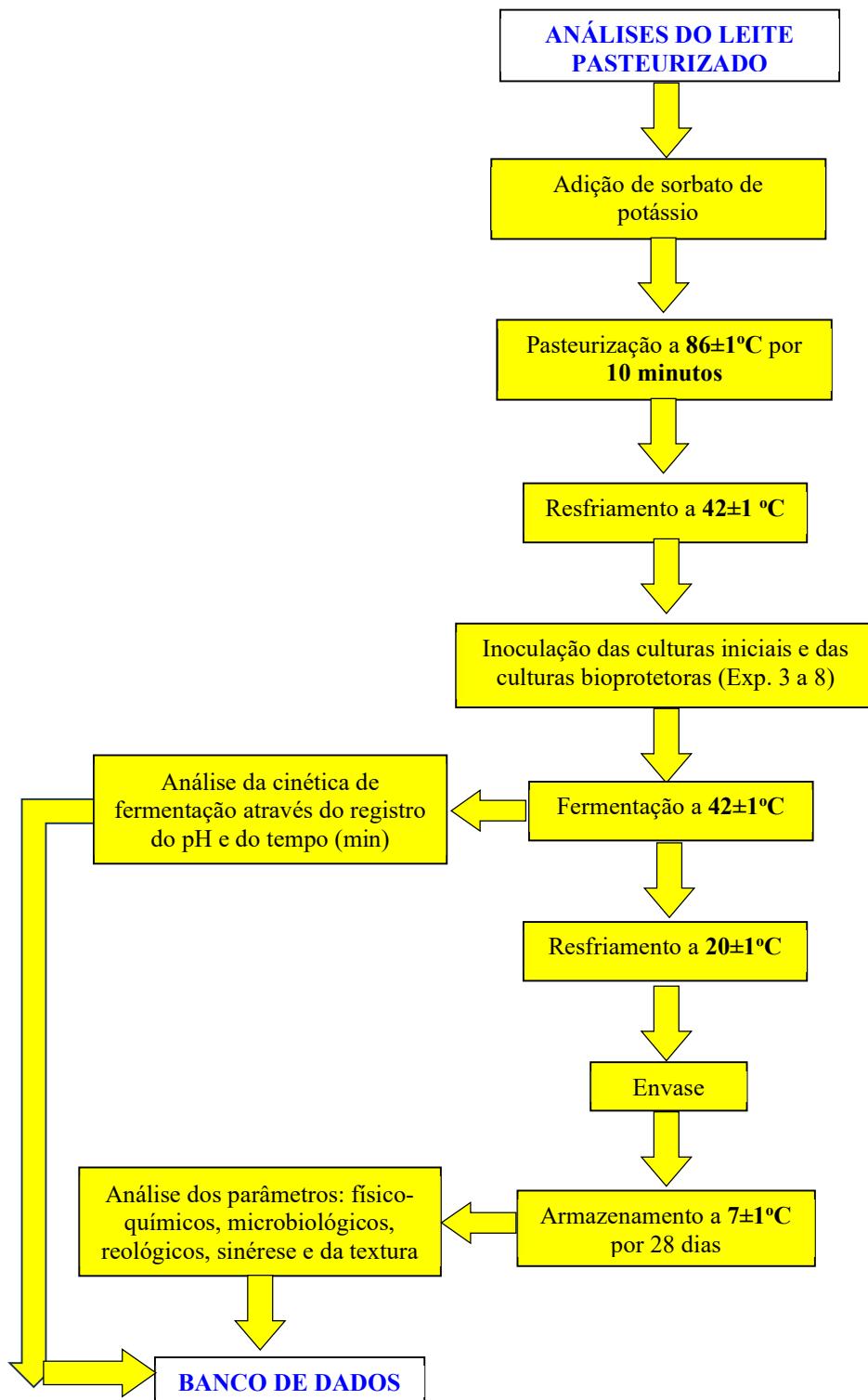
Na produção do iogurte em todos os experimentos foram utilizados procedimentos eficazes de controle sanitário, como BPF (Boas Práticas de Fabricação), PPHO (Procedimentos Padrões de Higiene Operacionais) e APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), tendo vários cuidados de higiene e esterilização dos utensílios usados e do ambiente (capela) tanto durante a preparação do iogurte como também durante a realização das análises microbiológicas.

#### **3.3.1. Preparação do iogurte - Fase I**

A primeira fase consistiu na elaboração do iogurte formulado com leite pasteurizado integral com ou sem adição de culturas bioprotetoras e com ou sem o conservante sorbato de potássio, tendo as suas dosagens variadas conforme a Tabela 01. Foram realizados experimentos em escala de

bancada com produções em bateladas de 2000mL de iogurte cujo processo seguiu o fluxograma ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Fluxograma da formulação do iogurte – Fase I.



Foi usado o leite pasteurizado integral fornecido por um laticínio localizado no município de Caturité-PB que foi analisado previamente no laboratório físico-químico da empresa, sendo realizadas as seguintes análises: acidez (g/100mL) no acidímetro Dornic e, no analisador ultrassônico Ekomilk, densidade a 15°C, lipídios (g/100g), proteínas (g/100g), lactose (g/100g), teor de sólidos

não gordurosos e, no equipamento crioscópio, foi realizada a análise do índice crioscópico ( $^{\circ}\text{H}$ ), atendendo aos padrões oficiais do Ministério da Agricultura para o leite pasteurizado integral (Brasil, 2018):

I - teor de gordura: mínimo de 3,0g/100g para o integral;

II - acidez de 0,14 a 0,18 em g de ácido láctico/100mL;

III - densidade relativa 15/15 $^{\circ}\text{C}$ : 1,028 a 1,034 para o integral;

IV - índice crioscópico entre -0,530 $^{\circ}\text{H}$  e -0,555 $^{\circ}\text{H}$ ;

V - teor de sólidos não gordurosos: mínimo 8,4 g/100g com base no leite integral;

VI - proteína total mínima de 2,9g/100g;

VII - lactose anidra mínima de 4,3g/100g

O índice crioscópico ou crioscopia é a medida do ponto de congelamento do leite ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. O ponto de congelamento máximo do leite aceito pela legislação brasileira é -0,530 $^{\circ}\text{H}$  (Brito *et al.*, 2021).

Após a análise do leite, este foi pasteurizado novamente a  $86 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (Figura 7). Nos experimentos 1, 3 e 4, foi adicionado o conservante químico sorbato de potássio antes da pasteurização do leite e nos demais experimentos não foi adicionado este conservante, inclusive no iogurte controle<sup>2</sup> que usou apenas as culturas iniciais e nenhum agente antifúngico. Após a pasteurização, o leite foi resfriado em banho indireto em água gelada sob agitação com bastão de vidro até atingir a temperatura de  $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Nesta mesma temperatura ( $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), em todos os experimentos, foi realizada a inoculação de 2,5mL da cultura láctea composta pelos microrganismos *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*.

Figura 7: Processo de pasteurização do leite para preparação do iogurte: (a) Aquecimento a  $86 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e (b) Tempo de 10 minutos.



(a)



(b)

Além dos 2,5mL das culturas iniciais, também se inoculou 2,0mL das culturas bioprotetoras (dosagem recomendada pelos fabricantes) nos experimentos 3 a 6, ou 4,0mL (dobro da dosagem recomendada pelos fabricantes) nos experimentos 7 e 8, em 2000 mL de leite seguida da agitação do produto por 5 minutos para que a mistura se tornasse homogênea.

Depois da inoculação das culturas, foi transferido 250 mL de leite para um segundo bécker de 250mL esterilizado para o acompanhamento do pH e da temperatura durante a fermentação (Figura 8). O restante do leite (1750mL) permaneceu no bécker de 2000mL durante toda a fermentação em repouso sem nenhum tipo de manipulação. Esse procedimento foi adotado para evitar contaminações cruzadas do iogurte nas verificações do pH usando apenas a amostra de 250mL durante a fermentação.

Figura 8: Incubação do iogurte em estufa na temperatura de  $42\pm 1$  °C

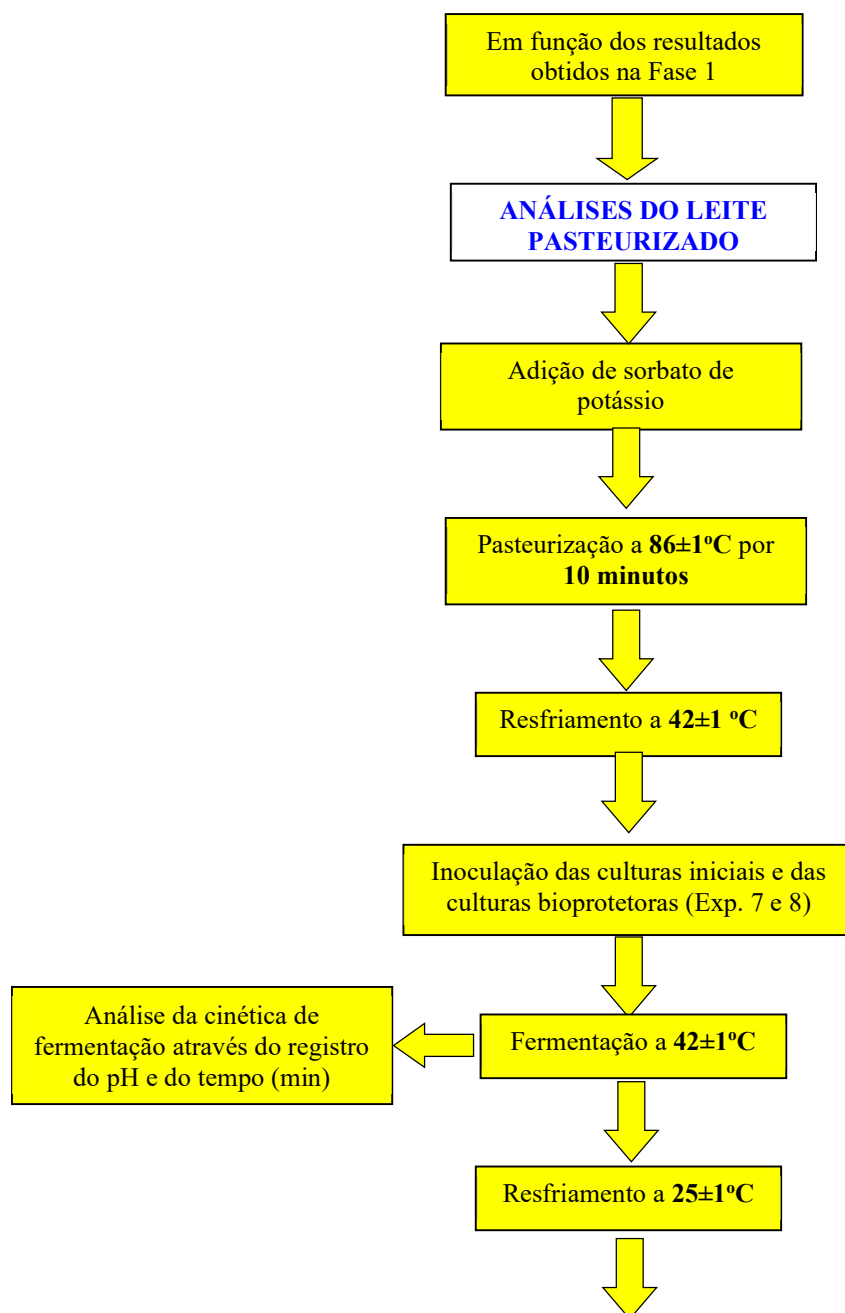


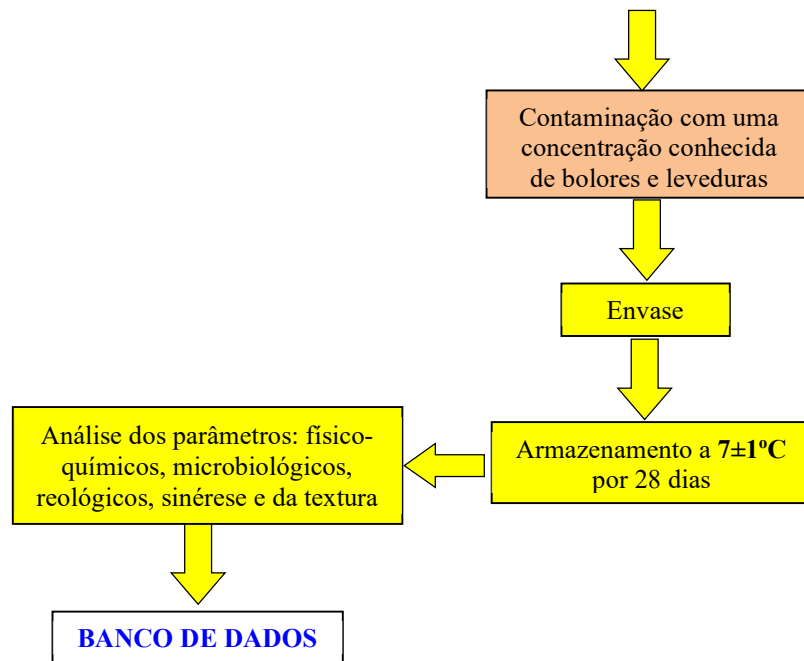
A mistura foi mantida isotermicamente a temperatura de  $42\pm 1$ °C por um período de 4 a 5 horas até que o pH atingisse 4,70. O tempo dependeu das culturas utilizadas e da temperatura de fermentação. Quando o iogurte atingiu o pH 4,70, foi feito o resfriamento do iogurte até a temperatura de  $20\pm 1$ °C. Após a conclusão do processo de produção, o iogurte foi envasado em garrafas de 100mL para as análises físico-químicas (pH e acidez titulável) e microbiológicas (contagem de bolores e leveduras) e recipientes de 350mL para as análises de comportamento reológico (viscosidade), textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) e sinérese (separação de soro). Ambos os recipientes (100mL e 350mL) antes do envase foram higienizados com detergente neutro e esterilizados com água clorada e fechados/lacrados com tampas plásticas. Em seguida, foi conservado na câmara fria da empresa a uma temperatura de  $7\pm 1$ °C até o momento das análises.

### 3.3.2. Preparação do iogurte - Fase II

A partir dos resultados obtidos na fase I, duas culturas bioprotetoras comerciais nas dosagens mais eficazes com relação a inibição fúngica foram submetidas a um teste de desafio na fase II (Figura 9) em que os iogurtes foram contaminados intencionalmente com uma concentração conhecida de bolores e leveduras para estudar o efeito dessas culturas bioprotetoras na dosagem mais eficiente sobre os mesmos parâmetros analisados anteriormente na fase I fazendo um estudo comparativo em relação ao iogurte formulado apenas com o conservante químico sorbato de potássio na concentração

Figura 9: Fluxograma da formulação do iogurte – Fase II.





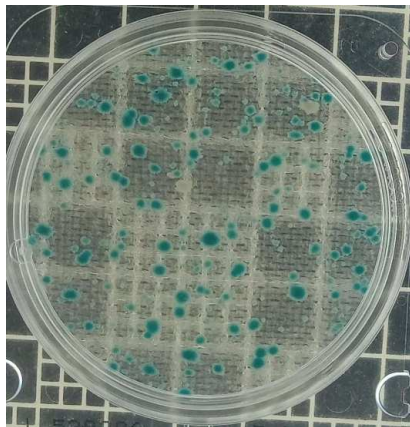
máxima permitida de 0,03g/100g (controle1) e também o iogurte contaminado sem conservante químico e sem bioconservantes (controle2).

Nesse caso, os iogurtes controle1 e controle2 da Tabela 01 foram produzidos novamente seguindo o mesmo procedimento da fase I e, após o resfriamento a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , foram contaminados intencionalmente. Também foram produzidos novamente os iogurtes dos experimentos 7 e 8 da Tabela 01 que apresentaram a dosagem de melhor desempenho com relação a inibição fúngica na fase I para cada tipo de cultura bioprotetora comercial e depois foram também contaminados intencionalmente com a mesma concentração inicial de bolores e leveduras de modo que a concentração em UFC/g de iogurte seja conhecida.

Para a contaminação do iogurte na fase II, foi usado uma amostra de 100 mL do iogurte natural controle2 com 21 dias de armazenamento a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  formulado na fase I. Essa amostra corresponde a que foi usada para realizar as análises reológicas, sinérese e textura, sendo, portanto, intencionalmente bastante manipulada por utensílios não esterilizados. Depois dessas análises da amostra de iogurte controle2 com 21 dias, foi realizada a análise microbiológica. Para se determinar o número de UFC/mL, foi realizada duas diluições ( $10^{-2}$ ) em água peptonada esterilizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e depois foi inoculado 1,0mL da amostra diluída nas placas CompactDry YM (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Tóquio, Japão) e em seguida foram incubadas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias conforme procedimento descrito no item 3.4.5. Após esse período, realizou-se a contagem no contador de

colônias Phoenix CP602 (Phoenix Luferto LTDA, Araraquara, São Paulo, Brasil) cujo resultado de bolores e leveduras deu  $2,1 \times 10^4$  UFC/mL na diluição  $10^{-2}$  (Figura 10).

Figura 10: Placa do iogurte controle2 contaminado com 21 dias de armazenamento (diluição  $10^{-2}$ ).



Em seguida, logo após a análise microbiológica da amostra contaminada, a mesma foi congelada a  $-10^{\circ}\text{C}$  até ser usada para inocular todos os iogurtes na fase II. Antes do uso, o iogurte contaminado foi descongelado em banho maria a  $45^{\circ}\text{C}$  até ficar na temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, com o auxílio de uma pipeta esterilizada, foi colocado 1,0mL da amostra de iogurte contaminado com os esporos de bolores e leveduras na concentração  $2,1 \times 10^4$  UFC/mL em 1750g de iogurte sendo agitando-se em seguida por 5 minutos para uma melhor distribuição desses bolores e leveduras, obtendo-se uma concentração inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC de bolores e leveduras/g de iogurte. Os iogurtes inoculados /contaminados foram então envasados em garrafas esterilizadas de 100mL e recipientes esterilizados de 350mL, identificados e armazenados a  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$  até o dia das análises. Os iogurtes de cada variável de formulação foram enumerados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

### 3.4. Avaliação do Iogurte

Para avaliar o iogurte produzido em todos os experimentos em ambas as fases foram realizadas análises físico-químicas (pH e acidez titulável), microbiológicas (bolores e leveduras), comportamento reológico (viscosidade aparente), textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) e separação de soro (sinérese) com um dia de fabricação e foram repetidas a cada 7 dias até completar 28 dias em que as amostras foram mantidas refrigeradas a temperatura de  $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Nesse caso, foram realizadas análises com 1, 7, 14, 21 e 28 dias após a produção, totalizando 5 amostras para cada experimento. Esse tempo de avaliação foi escolhido baseado nos períodos usados nos estudos de Yerlikaya *et al.* (2020) e Farhadi *et al.* (2013).

#### 3.4.1. Análises Físico-Químicas

##### 3.4.1.1. pH e Tempo de Fermentação



Durante a fermentação foi realizada a determinação e registro do valor de pH dos iogurtes usando um pHmetro (modelo MW150 MAX, marca Milwaukee Instrumentos, Rocky Mount, NC, EUA) até atingir o pH 4,70, quando também foi registrado o tempo de fermentação. No dia seguinte após o envase do produto também foi feita a determinação e registro do pH no laticínio e foram repetidas a cada 7 dias até completar 28 dias. Antes de realizar os experimentos e as análises, o pHmetro foi devidamente calibrado usando as soluções tampão / padrão pH 7,00, pH 4,00 e pH 10,00. Apesar da legislação brasileira não especificar, o valor do pH é considerado normal e dentro do padrão na faixa de 4,00 a 4,70.

#### 3.4.1.2. Acidez Titulável

As determinações dos teores de acidez titulável expressas em % de ácido láctico foram realizadas em duplicata no laticínio usando o método potenciométrico por meio da titulação ácido-alcalimétrica, usando-se fenolftaleína como indicador (Brasil, 2006).

Para se determinar a acidez titulável, pesou-se exatamente 10g da amostra em um béquer de 50mL, adicionou-se 10mL de água isenta de gás carbônico e misturou-se bem. Adicionou-se 4 a 5 gotas do indicador fenolftaleína. Usando o acidímetro Dornic da empresa, titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N sob agitação, até o ponto final detectável pelo aparecimento de coloração rósea (fenolftaleína) persistente por aproximadamente 30 segundos. A acidez titulável expressa em % de ácido láctico foi determinada conforme a Equação 1:

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad (1)$$

Em que:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1N;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = massa da amostra, em gramas.

A legislação brasileira estabelece como padrão uma acidez titulável entre 0,6 a 2,0g de ácido láctico/100g de iogurte (IN 46 de 23 de outubro de 2007).

#### 3.4.2. Comportamento Reológico (Viscosidade)

Para determinação das propriedades reológicas das formulações de iogurte, foi utilizado um viscosímetro Brookfield (modelo RV+, Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleborough, MA, EUA) com o auxílio do Spindle n° 63 do Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) da Universidade Federal de Campina Grande. Para efetuar as leituras dos valores de viscosidade aparente de cada amostra na temperatura de 6 a 6,5°C e em velocidades de rotação de 50

rpm e 12 rpm foi usado o software aplicativo RHEOCALC 32 (Brookfield Engineering Laboratories Inc.) e todas as medições de viscosidade foram expressas em centipoise (cp). A temperatura foi mantida em banho-maria controlado termostaticamente. Todos os dados foram coletados após 30s para cada amostra. Foram utilizados fusos apropriados, garantindo torque entre 25 a 75%. Um béquer de 150mL foi usado para todas as medições com a perna de proteção colocada e a amostra foi adicionada o suficiente para cobrir as ranhuras de imersão nas hastes do fuso. As análises reológicas também foram realizadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 em quadruplicata.

### 3.4.3. Sinérese (Separação de soro)

A análise de sinérese das diferentes amostras de iogurte foi realizada nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 em quadruplicata durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  por centrifugação segundo metodologia proposta por Jauregui *et al.* (1981) com modificações de Beuschel *et al.* (1992). Para tanto, pesou-se 5,0g das amostras que foram centrifugadas a 2.500 rpm por 20 minutos na centrífuga refrigerada NT 815 (Nova técnica, São Paulo, Brasil) do Laboratório de Análises Físicas do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFCG. Coletou-se o sobrenadante, pesou-o e o índice de sinérese foi determinado de acordo com a equação 2:

$$\text{Sinérese}(\%) = \frac{\text{Massa do Sobrenadante}(g)}{\text{Massa do iogurte}(g)} \times 100\% \quad (2)$$

### 3.4.4. Análise de textura

A textura instrumental dos iogurtes foi determinada usando um texturômetro TA.XTPlus (Stable Micro Systems®, Godalming, Reino Unido), do Laboratório de Análises Físicas do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFCG. Os parâmetros de firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade foram avaliados por meio do teste de compressão, utilizando o probe A/BE com 40mm de diâmetro. As amostras foram homogeneizadas e inseridas no copo teste de acrílico até o preenchimento do volume de 150 mL (altura de 50 mm). A velocidade de teste foi de 1 mm/s e distância de 30mm. A avaliação das amostras foi realizada em quadruplicata nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 na temperatura de 6,0 a 6,5°C.

### 3.4.5. Análises Microbiológicas (Contagem de Bolores e Leveduras)

Para se realizar as análises de bolores e leveduras nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 foram utilizadas as placas compactDry YM (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd, Tóquio, Japão) que já vem prontas com o meio de cultura, isso diminuiu os riscos de contaminação durante as análises. O CompactDry YM contém meio de cultura seco coberto por uma camada de tecido absorvente cromogênico, que permite

o máximo de produtividade e o aumento da eficiência. Essas placas são certificadas pela **AOAC International, ISO 9001 e ISO 13485**.

Nesse caso, as amostras foram diluídas a  $10^{-1}$  em água peptonada esterilizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e depois foi inoculado 1,0mL de cada amostra diluída nas placas CompactDry YM e incubadas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. Após esse período, realizou-se a contagem no contador de colônias Phoenix CP602 (Phoenix Lufarco LTDA, Araraquara, São Paulo, Brasil).

A legislação brasileira especifica como padrão para o iogurte uma contagem total de bolores/leveduras/g máxima  $M= 2,0 \times 10^2$  UFC/g (IN 46 de 23 de outubro de 2007).

### **3.5. Tratamento Estatístico dos Dados**

O tratamento estatístico dos dados experimentais foi realizado utilizando a análise de variância (ANOVA) com experimento fatorial para determinar diferenças significativas entre os tratamentos com nível de significância  $p < 0,05$  e cálculo de comparação entre médias pelo teste de Tukey por meio do programa computacional ASSISTAT versão 7.7 beta (Silva; Azevedo, 2016). No caso, foram analisados estatisticamente os dados do parâmetro acidez titulável (%), realizado em duplicata, e dos parâmetros viscosidade, sinérese, firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos iogurtes, realizados em quadruplicata, durante os 28 dias de armazenamento. O número total de análises foi 160 (5 tempos de amostragem x 8 tipos de iogurte x 4 medições repetidas) para cada parâmetro, com a exceção da acidez titulável que foi 80 (5 tempos de amostragem x 8 tipos de iogurte x 2 medições repetidas).



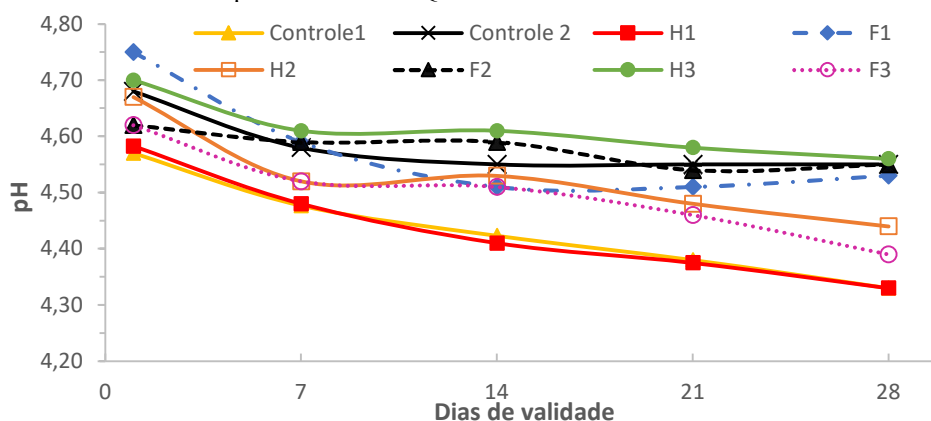
Se compararmos os iogurtes contendo a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC YM-B (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*), observa-se que a fermentação do iogurte H1 foi 30 minutos mais rápida do que o H2 e o H3. Vale salientar que tanto o H1 como o H2 utilizaram a cultura bioprotetora HOLDBAC YM-B na dosagem recomendada pelo fabricante (0,1%v/v) e no H3 a dosagem foi 0,2%v/v. No entanto, no experimento H1, tem também a adição de 0,015g/100g do conservante sorbato de potássio, enquanto no H2 e H3 não teve adição desse conservante químico.

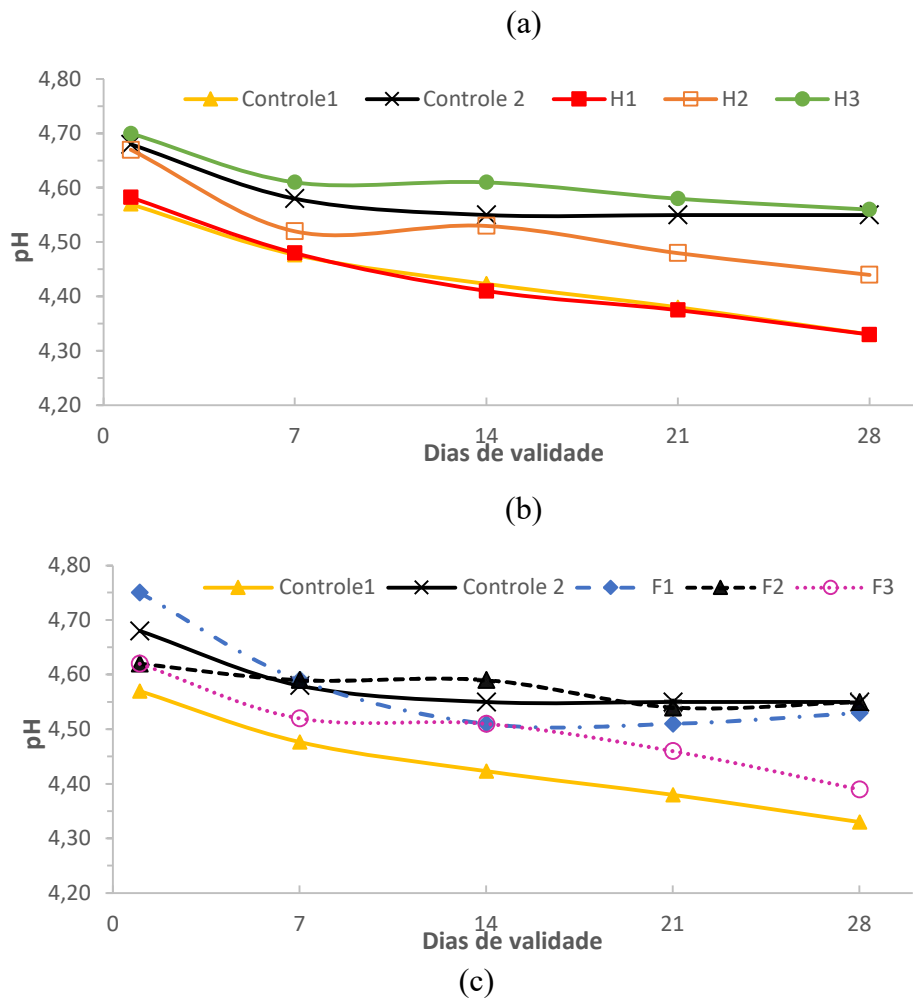
Este resultado não ocorreu quando se usou a cultura bioprotetora FreshQ-11 (*L. rhamnosus*), pois o iogurte F1 teve o mesmo tempo de fermentação do F2 que usaram a mesma dosagem de 0,1%v/v. Mas quando a dosagem dessa cultura foi dobrada para 0,2%v/v (F3), o tempo de fermentação aumentou aproximadamente 60 minutos. Dessa forma, o aumento da dosagem das culturas bioprotetoras para o dobro recomendado pelos fabricantes (0,2%v/v) não teve efeito na cinética de fermentação da cultura bioprotetora HOLDBAC YM-B e retardou a fermentação quando se usou a cultura bioprotetora FreshQ-11.

No estudo de Kariyawasam *et al.* (2023), a fermentação do iogurte foi acelerada pela cocultura com probióticos (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* KCTC 3108 e *L. plantarum* 200655) em relação a amostra controle sem probióticos (C), o equivalente ao iogurte controle2 da presente pesquisa. O tempo total de fermentação para todas as amostras de iogurte suplementadas com probióticos no estudo de Kariyawasam *et al.* (2023) foi de aproximadamente 340 min, em comparação com a amostra de controle (400min). Esses resultados também foram observados por Akan (2022) em um iogurte com combinação de “starter” comercial e os probióticos *L. casei*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*.

No que se refere a variação do pH com o tempo de armazenamento (em dias), observa-se na Figura 12a que os valores de pH do iogurte diminuíram gradualmente durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  devido à produção de ácidos orgânicos pelas culturas iniciadoras.

Figura 12: Variação do pH em função dos dias de armazenamento. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.





Além disso, com a exceção apenas do iogurte H1, o pH do iogurte controle1 foi mais baixo do que os experimentos com as culturas bioprotetoras comerciais e do que o iogurte controle2 durante os 28 dias de armazenamento.

Dentre os experimentos com as culturas bioprotetoras, o H1 e o F3 foram os que tiveram um comportamento mais próximo do iogurte controle1 apresentando valores mais baixos de pH do que os demais experimentos com culturas bioprotetoras, enquanto que os experimentos F2 e H3 apresentaram pH mais altos no final do período estudado próximos ao iogurte controle2. Além disso, o experimento H1 teve a maior variação de pH (-5,5%) e o F2 foi o que variou menos (-1,5%). Nesse caso, o iogurte H3 teve um resultado melhor pois apresentou uma menor pós-acidificação no período estudado devido à presença da cultura propiônica.

No que se refere ao iogurte controle2 que contém apenas as culturas iniciais *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, observa-se que o mesmo apresentou valores mais altos de pH do que os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras, com a exceção dos experimentos F2 e H3 que apresentaram, respectivamente, pH igual e mais alto do que o iogurte controle2 no final do período estudado.

Observa-se ainda nas Figuras 12b e 12c um efeito inverso no comportamento do pH em função do tempo de validade (dias) quando se dobrou a dosagem das culturas bioprotetoras comerciais para 0,2%v/v. No caso da cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB, quando se dobrou a dosagem, o pH foi maior ao longo dos 28 dias (iogurte H3) do que os iogurtes que usaram a dosagem de 0,1%v/v dessa mesma cultura (iogurtes H1 e H2). No entanto, no caso da cultura bioprotetora FRESHQ-11, quando se dobrou a dosagem, o pH foi menor ao longo dos 28 dias (iogurte F3) do que os iogurtes que usaram a dosagem de 0,1%v/v dessa mesma cultura (iogurtes F1 e F2).

Com relação a acidez titulável (%), observa-se na Tabela 02 (Figuras correspondentes no Apêndice A) uma tendência inversa à verificada no pH, ou seja, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no decorrer do tempo de armazenamento para todos os iogurtes. Além disso, a partir dos 21 dias, o iogurte controle1 apresentou uma acidez titulável significativamente maior do que os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras ( $p < 0,05$ ). No tratamento estatístico desse parâmetro na Tabela 02 e detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c, d representam as diferenças significativas entre as médias da acidez titulável em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D, E representam as diferenças significativas entre as médias da acidez titulável de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência na acidez titulável. No entanto, a variação foi maior em função dos dias de armazenamento tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para essa variável.

Tabela 02: Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de validade – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	0,653 <sup>eB</sup>	0,626 <sup>cDE</sup>	0,635 <sup>dCD</sup>	0,614 <sup>cE</sup>	0,689 <sup>dA</sup>	0,682 <sup>bA</sup>	0,648 <sup>cBC</sup>	0,664 <sup>dB</sup>
7	0,695 <sup>dCD</sup>	0,648 <sup>bE</sup>	0,691 <sup>cD</sup>	0,720 <sup>bAB</sup>	0,734 <sup>abA</sup>	0,709 <sup>aBC</sup>	0,662 <sup>cE</sup>	0,698 <sup>cCD</sup>
14	0,726 <sup>cBC</sup>	0,666 <sup>aE</sup>	0,744 <sup>bA</sup>	0,736 <sup>aABC</sup>	0,743 <sup>aAB</sup>	0,680 <sup>bDE</sup>	0,684 <sup>bD</sup>	0,722 <sup>bC</sup>
21	0,773 <sup>bA</sup>	0,666 <sup>aE</sup>	0,766 <sup>aA</sup>	0,747 <sup>aB</sup>	0,713 <sup>cCD</sup>	0,707 <sup>aD</sup>	0,680 <sup>bE</sup>	0,729 <sup>bC</sup>
28	0,797 <sup>aA</sup>	0,680 <sup>aD</sup>	0,771 <sup>aB</sup>	0,713 <sup>bC</sup>	0,725 <sup>bcC</sup>	0,720 <sup>aC</sup>	0,716 <sup>aC</sup>	0,765 <sup>aB</sup>
<b>Var (%)</b>	<b>22,2</b>	<b>8,6</b>	<b>21,5</b>	<b>16,1</b>	<b>5,2</b>	<b>5,6</b>	<b>10,4</b>	<b>15,3</b>

Nota: a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D, E - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ). VAR (%) - Variação (%).

Dentre os iogurtes com culturas bioprotetoras, o H3 (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) na dosagem de 0,2%v/v foi o que apresentou a acidez titulável menor durante o período estudado e, por isso, um melhor resultado entre os iogurtes com culturas bioprotetoras. Como ocorreu com o pH, observa-se na Tabela 02 um efeito inverso no comportamento da acidez titulável (%) em função do tempo de validade (dias) quando se dobrou a dosagem das culturas bioprotetoras comerciais para 0,2%v/v. No caso da cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB, quando se dobrou a dosagem (iogurte H3), a acidez titulável(%) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a partir dos 7 dias do que os iogurtes que usaram a dosagem de 0,1%v/v dessa mesma cultura (iogurtes H1 e H2). No entanto, no caso da cultura bioprotetora FRESHQ-11, quando se dobrou a dosagem (iogurte F3),

a acidez titulável (%) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no final dos 28 dias do que os iogurtes que usaram a dosagem de 0,1%v/v dessa mesma cultura (iogurtes F1 e F2).

No que se refere ao iogurte controle2 que contém apenas as culturas iniciais *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, sem conservante químico e bioconservantes, observa-se que o mesmo apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) de acidez titulável (%) do que os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras no período estudado de 28 dias. Enfim, observa-se na Tabela 02 que o iogurte controle1 apresentou a maior variação na acidez titulável (%), onde houve um aumento de 22,2% no decorrer dos 28 dias, enquanto que o experimento H2 foi o que variou menos (5,2%).

Ao comparar o iogurte controle1 com o iogurte controle2, observou-se que o iogurte controle1, que contém o conservante químico sorbato de potássio, apresentou pH mais baixo e acidez titulável significativamente maior ( $p < 0,05$ ) durante o período de armazenamento de 28 dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . Além das culturas utilizadas, a pós-acidificação do iogurte depende de outros fatores, como a composição da matéria-prima, o processo de fabricação e o tempo de fermentação, que foi 30 minutos a mais para o iogurte controle2 do que para o iogurte controle1.

Numerosos estudos observaram que a composição de bebidas fermentadas desempenha um papel crucial na determinação do valor final do pH e suas alterações durante o armazenamento refrigerado, que são influenciadas pela capacidade de tamponamento da bebida, os níveis de nitrogênio não proteico e vitaminas e a disponibilidade de carboidratos fermentáveis necessários para o crescimento de microrganismos (Ashna *et al.*, 2022). Além disso, certas espécies de fungos e leveduras podem elevar o pH do meio, o que pode explicar o pH mais alto e a acidez mais baixa do iogurte controle2, que apresentou alto nível de contaminação por leveduras. As bactérias lácticas produzem ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, enquanto as leveduras assimilam esses ácidos, formando álcool e  $\text{CO}_2$ , aumentando assim o pH. Além disso, durante o metabolismo do ácido láctico, as leveduras liberam vitaminas como vitamina B, ácido pantotênico, niacina, riboflavina e biotina, que são importantes para o desenvolvimento das bactérias lácticas (Viljoen, 2001).

A cultura HOLDBAC-YMB na dosagem dobrada de 0,2%v/v (iogurte H3) apresentou a acidez titulável (%) mais baixa do que as demais culturas bioprotetoras. Isto é um resultado positivo e demonstra que essa cultura apresentou uma menor pós-acidificação durante o período de armazenamento de 28 dias e, por isso, tende a ter uma maior aceitabilidade. Farhadi *et al.* (2013) concluíram em seus estudos que esse comportamento da acidez titulável está associado à capacidade das bactérias do ácido propiônico, como *P. freudenreichii*, de formar diferentes ácidos orgânicos, como o ácido propiônico e o ácido acético, usando ácido láctico. No estudo de Farhadi *et al.* (2013), os autores também concluíram que “a quantidade de ácido acético é maior que a de ácido láctico em



todas as amostras, provavelmente devido ao consumo de ácido láctico e produção de ácido acético por *P. freudenreichii ssp*”. Dessa forma, como HODBAC-YMB corresponde as culturas *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii ssp Shermanni* combinadas, ocorreu essa transformação de ácido láctico em ácidos propiônico e acético e, por isso, a acidez titulável (%) foi menor durante o período de armazenamento, principalmente quando se dobrou a dosagem, pois o ácido láctico, cuja constante de dissociação ácida em água, a 25°C, é  $K_a=1,4 \times 10^{-4}$  e  $pK_a=3,86$ , é mais forte do que os ácidos acético ( $K_a=1,8 \times 10^{-5}$  e  $pK_a=4,75$ ) e propiônico ( $K_a=1,3 \times 10^{-5}$  e  $pK_a=4,85$ ). Segundo Yerlikaya *et al.* (2020, tradução própria), “esta propriedade teve um efeito positivo no período de armazenamento, uma vez que não afetou o sabor e o aroma das bebidas lácteas probióticas e resultou em baixa acidez titulável ao final do período de armazenamento”.

O iogurte fermentado com as culturas iniciais apenas ou uma mistura de culturas iniciais e bactérias propiônicas foram mais acidificadas, em comparação com os iogurtes fermentados apenas com bactérias propiônicas (Ziarno *et al.*, 2022). Resultados consistentes com este estudo de Ziarno *et al.* (2022) foram obtidos por Yerlikaya *et al.* (2019), que estudou *Propionibacterium shermanii* subesp. *freudenreichii* na produção de bebidas lácteas. Os pesquisadores citados relataram uma redução de pH significativamente mais eficaz quando as bactérias *Propionibacterium* foram usadas em conjunto com bactérias do ácido láctico do que quando usadas isoladamente. Eles também mostraram que as bactérias do ácido propiônico foram significativamente mais eficazes na redução do pH dos iogurtes testados quando combinadas com *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. Isto indica que as bactérias *Propionibacterium* acidificam menos o iogurte durante o armazenamento do que quando combinadas com culturas ácido lácticas e, principalmente, do que os iogurtes contendo apenas bactérias ácido lácticas.

O comportamento dos iogurtes com culturas bioprotetoras de apresentarem um pH menor e uma acidez titulável (%) significativamente maior do que o iogurte controle2 durante os 28 dias está de acordo com um estudo realizado por Khan-Mohammadi *et al.* (2023, tradução própria) que afirmaram que “os menores valores de pH foram observados em T1 (iogurte formulado com culturas iniciais contendo  $10^6$  UFC/mL de *L. rhamnosus*) e T3 (iogurte formulado com culturas iniciais contendo  $10^6$  UFC/mL de *L. rhamnosus* e  $10^5$  UFC/mL de *Penicillium expansum*) durante todo o período do estudo”. Os pesquisadores sugeriram que isso poderia ser atribuído à presença da bactéria probiótica *L. rhamnosus* em combinação com as culturas iniciais do iogurte. Em seu estudo, o iogurte T0, que é comparável ao iogurte controle2 na presente pesquisa, continha apenas as culturas iniciais e, de forma semelhante, exibiu um pH mais alto do que os iogurtes com culturas bioprotetoras.

Zhao e Liang (2022), concluíram que não houve diferença significativa no pH e na acidez titulável (AT) entre o iogurte controle contendo apenas as culturas iniciais e as três amostras de

iogurte contendo *L. Plantarum MC5* no primeiro dia de armazenamento ( $p > 0,05$ ); no entanto, AT mostrou uma tendência significativamente crescente à medida que o tempo de armazenamento progrediu ( $p < 0,05$ ). Porém, no estudo destes autores, após 14 e 21 dias de armazenamento, os valores de pH das amostras de iogurte contendo *L. Plantarum MC5* nas proporções 1:1 e 2:1 foram significativamente maiores do que o iogurte controle ( $p < 0,05$ ) adicionado apenas por culturas iniciais como é o caso do iogurte controle<sup>2</sup> do presente estudo. Segundo Zhao e Liang (2022, tradução própria), “isso indicou que o grau de pós-acidificação nos grupos 1:1 e 2:1 foi muito baixo e a adição de *L. plantarum MC5* melhorou o problema de pós-acidificação das amostras de iogurte”. É importante observar que Zhao e Liang (2022) usaram em seu estudo uma cultura bioprotetora diferente (*L. Plantarum MC5*) das que foram usadas na presente pesquisa, isso reforça a importância do tipo de cultura sobre os parâmetros do iogurte.

Os valores de acidez titulável (AT) das amostras de iogurte 1:1 e 2:1 no estudo de Zhao e Liang (2022) foram significativamente menores do que os do iogurte controle ( $p < 0,05$ ). Eles explicaram que isso pode ser devido a *L. Plantarum MC5* ter usado os nutrientes do iogurte para produzir grandes quantidades de exopolissacarídeo (EPS) e uma pequena quantidade de ácido lático durante o armazenamento. Ao contrário, as culturas iniciais comerciais utilizaram nutrientes para metabolizar e sintetizar menos EPS e mais ácido lático e ácido acético (Zhao e Liang, 2022). Isso também pode ser devido à alta capacidade de tamponamento do pó de EPS bruto e da cultura iniciadora inibindo os níveis de ácido lático no iogurte (Doleyres, Schaub e Lacroix, 2005).

Da mesma forma, num estudo realizado por Lačanin *et al.* (2017), não observaram durante o armazenamento nenhum impacto das culturas antifúngicas nas taxas de acidificação das culturas iniciadoras ou mudanças significativas de pH em comparação com o iogurte controle sem nenhuma cultura bioprotetora. Segundo esses autores, tal característica é interessante, pois não é desejável o uso de culturas antifúngicas que impactem a atividade dos “starters” ou provoquem pós-acidificação durante o armazenamento. No entanto, mesmo não tendo sido observadas alterações significativas no pH, seria necessário verificar se essas culturas antifúngicas não modificam as propriedades organolépticas do iogurte durante o armazenamento (Lačanin *et al.*, 2017).

Por outro lado, vários outros estudos mostraram que as bactérias ácido lácticas (LAB) como a FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) produzem ácido lático e vários tipos de ácidos orgânicos durante e após a fermentação e, por isso, aumenta a acidez titulável do iogurte reduzindo assim o pH do produto alimentar tornando-o desfavorável ao crescimento de microorganismos indesejados como bactérias patogênicas, leveduras e bolores. Por exemplo, Arena *et al.* (2016) concluíram que dentre os ácidos orgânicos produzidos pelas LAB, os metabólitos mais bem caracterizados e mais eficazes produzidos são o ácido lático e o ácido acético, que são bioativos em sua forma protonada em pH baixo. Garnier

*et al.* (2020) também relataram que os ácidos propiônico, láctico, acético e butírico foram os produtos de fermentação mais abundantes gerados em fermentados de leite produzidos com *L. rhamnosus* e *Acidipropionibacterium jensenii*. Entre os microrganismos que possuem propriedades antimicrobianas, as bactérias ácido lácticas (LAB) produzem uma grande variedade de substâncias antimicrobianas, incluindo além dos ácidos orgânicos, ácidos graxos, reuterina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (Lassois *et al.*, 2008).

No estudo de Kariyawasam *et al.* (2023), a acidez titulável das amostras de iogurte também mostrou um aumento contínuo durante o armazenamento. A acidez titulável das amostras do iogurte controle C, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* KCTC 3108 e *L. plantarum* 200655 no final do período de armazenamento foi de  $0,78 \pm 0,02\%$ ,  $0,82 \pm 0,04\%$ ,  $0,81 \pm 0,06\%$  e  $0,82 \pm 0,04\%$ , respectivamente. Observa-se que a acidez titulável nesse estudo foi maior nos iogurtes contendo culturas bioprotetoras ou probióticas do que no iogurte controle contendo apenas as culturas iniciais. Estes valores estão bem próximos dos observados no presente estudo com 28 dias. O aumento da acidez titulável ocorre pela produção contínua de ácidos orgânicos e atividade residual da LAB (Habibi Najaf *et al.*, 2019). Da mesma forma, uma diminuição consistente no pH foi observada durante o armazenamento no estudo de Kariyawasam *et al.* (2023).

No trabalho de Fayyaz *et al.* (2020), que analisou a atividade antifúngica de combinações binárias e ternárias de três bactérias lácticas (*Lactobacillus reuteri* (IBRC-M10755), *L. helveticus* (IBRC-M No 10874) e *L. acidophilus* (IBRC-M)) contra cinco leveduras deteriorantes em iogurte, os resultados mostraram que a inoculação da LAB no iogurte provocou redução significativa do pH ao longo do armazenamento refrigerado, enquanto a acidez titulável aumentou até 20 dias e, partir desse período, diminuiu ( $p < 0,05$ ). Segundo esses autores, a capacidade de *S. thermophilus* de produzir alguns metabólitos básicos após os 20 dias de armazenamento poderia ser uma possível razão para o aumento do pH observado.

Finalmente, muitos autores notaram que a composição das bebidas fermentáveis é importante para o valor final do pH e suas mudanças durante o armazenamento refrigerado, que são determinadas pela capacidade tampão da bebida, os diferentes teores de nitrogênio não protéico e vitaminas e a disponibilidade de carboidratos fermentáveis que são necessários para o crescimento de microrganismos (Ashna *et al.*, 2022). Além disso, o tipo de cultura iniciadora influencia o pH das amostras de iogurte (Tarnaud, 2020).

Muitos autores também observaram mudanças no pH de produtos à base de iogurte durante o armazenamento refrigerado; isso é explicado pela atividade metabólica das bactérias da cultura inicial, que continuam a quebrar os carboidratos disponíveis, embora a uma taxa muito mais lenta do

que em sua temperatura ideal (Ashna *et al.*, 2022; Mituniewicz-Matek *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013; Vanegas–Azuero, 2018).

#### 4.2. Efeito das culturas bioprotetoras no comportamento reológico – Fase I

Como se pode observar na Tabela 03 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a viscosidade aparente de todas as amostras de iogurte exibiu flutuações notáveis ao longo do período de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ , indicando interações bioquímicas e microbianas complexas dentro da matriz do iogurte. Porém, de uma forma geral, nos iogurtes contendo culturas bioprotetoras, a viscosidade foi significativamente maior do que a dos iogurtes controle1 e controle2 ( $p < 0,05$ ) contendo apenas as culturas iniciais. Vale salientar que no tratamento estatístico desse parâmetro na Tabela 03 e detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c, d representam as diferenças significativas entre as médias da viscosidade aparente em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D representam as diferenças significativas entre as médias da viscosidade aparente de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesse parâmetro. No entanto, a variação foi maior em função do tipo de iogurte tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator, onde os iogurtes contendo culturas bioprotetoras a viscosidade foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ).

Tabela 03: Variação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm em função dos dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H2	F2	H3	F3
1	795,9 $\pm$ 8,7 <sup>aC</sup>	733,0 $\pm$ 18,6 <sup>bC</sup>	1116,5 $\pm$ 9,9 <sup>aA</sup>	597,9 $\pm$ 7,7 <sup>dD</sup>	981,4 $\pm$ 28,7 <sup>bB</sup>	1011,3 $\pm$ 39,6 <sup>bB</sup>
7	694,1 $\pm$ 5,7 <sup>bD</sup>	766,7 $\pm$ 26,3 <sup>abC</sup>	1010,0 $\pm$ 4,5 <sup>bB</sup>	798,4 $\pm$ 18,5 <sup>cC</sup>	1152,5 $\pm$ 38,6 <sup>aA</sup>	1188,8 $\pm$ 59,1 <sup>aA</sup>
14	760,2 $\pm$ 12,4 <sup>abCD</sup>	819,0 $\pm$ 34,8 <sup>aC</sup>	1082,0 $\pm$ 24,7 <sup>aA</sup>	911,4 $\pm$ 36,9 <sup>bB</sup>	982,7 $\pm$ 18,8 <sup>bB</sup>	745,4 $\pm$ 24,6 <sup>dD</sup>
21	716,8 $\pm$ 14,5 <sup>bC</sup>	760,6 $\pm$ 32,3 <sup>abC</sup>	1097,8 $\pm$ 43,5 <sup>aA</sup>	1083,5 $\pm$ 43,8 <sup>aA</sup>	837,5 $\pm$ 23,3 <sup>cB</sup>	866,8 $\pm$ 41,1 <sup>cB</sup>
28	747,9 $\pm$ 13,9 <sup>abCD</sup>	803,1 $\pm$ 41,8 <sup>aBC</sup>	987,5 $\pm$ 51,0 <sup>bA</sup>	856,7 $\pm$ 22,2 <sup>bcB</sup>	713,2 $\pm$ 10,6 <sup>dD</sup>	824,8 $\pm$ 37,8 <sup>cB</sup>
<b>Var(%)</b>	<b>-6,0</b>	<b>9,6</b>	<b>-11,6</b>	<b>43,3</b>	<b>-27,3</b>	<b>-18,4</b>

**Nota:** a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Considerando os 28 dias de armazenamento, quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora para 0,2%v/v, se observou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da viscosidade quando se usou a cultura HOLDBAC-YMB (iogurte H3) em relação ao iogurte que usou essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte H2). Esse comportamento da viscosidade está relacionado a menor acidez titulável do iogurte quando se usou essa cultura bioprotetora na dosagem 0,2%v/v. No entanto, com 28 dias de armazenamento, não foi observado diferença significativa da viscosidade ( $p > 0,05$ ) quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora comercial FRESHQ-11 para 0,2%v/v.

Inicialmente, as amostras controle1 apresentaram valores de viscosidade mais elevados que o controle2, sugerindo uma variação na estabilidade da matriz ou na resposta às condições de

armazenamento. Curiosamente, no dia 7, as amostras do controle<sup>2</sup> ultrapassaram o controle<sup>1</sup> em viscosidade, destacando uma diferença potencial nos processos de estabilização ou degradação que ocorrem nessas amostras.

É amplamente reconhecido que *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* são espécies conhecidas por sua capacidade de produzir exopolissacarídeo (EPS), que contribuem para as propriedades texturais e reológicas de produtos lácteos fermentados, como iogurte. Embora a produção de EPS possa variar entre diferentes cepas, a literatura fornece evidências substanciais de que cepas de *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* são capazes de produzir quantidades significativas de EPS (Deutsch *et al.*, 2008; Guyomarc'h *et al.*, 2020; Oleksy-Sobczak *et al.*, 2020; Bibi *et al.*, 2021; Badel *et al.*, 2011).

Neste estudo, utilizamos as culturas bioprotetoras comerciais HOLDBAC YM-B (uma combinação de *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) e FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) para avaliar seu impacto na qualidade do iogurte. Embora as capacidades específicas de produção de EPS dessas cepas comerciais não tenham sido caracterizadas pelos fabricantes, suas propriedades antifúngicas foram bem documentadas, pois esse é seu uso principal pretendido. Essas culturas bioprotetoras são normalmente empregadas junto com culturas iniciais, como *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, uma espécie bem conhecida por sua produção robusta de EPS e seu papel no aumento da viscosidade do iogurte.

Dadas as capacidades estabelecidas de produção de EPS das espécies envolvidas, é razoável levantar a hipótese de que as melhorias observadas na viscosidade do iogurte podem ser parcialmente atribuídas à produção de EPS por essas culturas bioprotetoras, seja diretamente ou por meio de efeitos sinérgicos com as culturas iniciais. Embora a quantificação direta de EPS não tenha sido conduzida neste estudo, o corpo de literatura existente apoia a probabilidade de produção de EPS pelas cepas usadas, e nenhum estudo foi encontrado para sugerir o contrário. Pesquisas futuras podem envolver análise direcionada da produção de EPS para confirmar esses efeitos nas cepas específicas usadas neste estudo.

A acentuada variação na viscosidade entre amostras tratadas com culturas bioprotetoras pode ser substancialmente explicada pela produção de EPS. Esses polissacarídeos de alto peso molecular, secretados por cepas específicas de bactérias do ácido láctico durante a fermentação, são conhecidos por aumentar a viscosidade do iogurte, aumentando a retenção de água e contribuindo para uma estrutura mais semelhante a um gel (Li *et al.*, 2014). A série H, particularmente H2, exibiu um aumento pronunciado na viscosidade até os 21 dias de armazenamento, o que atribuímos à produção de EPS. Isto sugere que os efeitos sinérgicos de *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* conduzem a um aumento robusto mediado por EPS na resistência da matriz ao fluxo (Deutsch *et al.*, 2008).

O EPS não apenas retém água, mas também interage com as proteínas do leite para fortalecer e estabilizar a rede de gel, aumentando assim a viscosidade geral do iogurte (Ripari, 2019). A interação entre o EPS e a rede proteica do leite explica potencialmente o comportamento reológico observado das amostras da série H, que apresentaram uma viscosidade consistentemente mais alta, sugerindo uma formação de gel mais coesa e estável dentro da matriz do iogurte.

Além do EPS, outros metabólitos produzidos pelo LAB, como ácidos orgânicos e enzimas proteolíticas, desempenham papéis cruciais na modulação da textura do iogurte (Sharma *et al.*, 2023). Os ácidos orgânicos contribuem para a agregação das micelas de caseína e a formação de gel, diminuindo o pH do leite, enquanto as enzimas proteolíticas alteram a rede proteica ao hidrolisar as proteínas do leite. Esses processos bioquímicos são fundamentais na definição dos atributos texturais e sensoriais finais do iogurte.

Kariyawasam *et al.* (2023), observaram um aumento da viscosidade e diminuição dos valores de sinérese ( $p < 0,05$ ) nas amostras de iogurte contendo *L. rhamnosus GG* (denominada amostra GG) e *L. plantarum 200655* (denominada amostra S). Nesse estudo, os valores da viscosidade e retenção de água (CRA) da amostra S aumentaram 16,34% e 5,79%, respectivamente, enquanto o valor de sinérese diminuiu 5,43% em relação à amostra controle C. Segundo Kariyawasam *et al.* (2023), estes resultados indicam que a suplementação com probiótico aumentou a viscosidade. Este resultado é similar ao encontrado na presente pesquisa. O EPS produzido pelos probióticos pode ser responsável pela melhoria das propriedades texturais (Lee *et al.*, 2021). Alguns estudos relataram interações relacionadas às proteínas do leite e sua capacidade de aumentar a firmeza e a viscosidade do leite fermentado, ao mesmo tempo em que diminuem a sinérese e a granulação (Buldo *et al.*, 2016).

No estudo de Fayyaz *et al.* (2020), os resultados mostraram que a viscosidade aparente de todas as amostras teve um aumento até o 10º dia de armazenamento, seguido por uma tendência de redução para o restante do período de armazenamento. Vários pesquisadores atribuíram essas mudanças à acidez titulável do meio, no qual uma rede mais firme apareceu como resultado da coagulação ácida em baixo pH (Beal *et al.*, 1999). É relatado que os fatores que afetam a via e a duração da fermentação podem influenciar a viscosidade do produto final (Penna *et al.*, 2006). No estudo de Fayyaz *et al.* (2020), a inoculação de LABs (*L. reuteri* (IBRC-M10755), *L. helveticus* (IBRC-M No 10874) e *L. acidophilus* (IBRC-M)) em diferentes proporções resultou na produção de diferentes ácidos com diferentes taxas e concentrações, fazendo com que a viscosidade aparente seja uma característica dependente da cultura. A viscosidade do iogurte é uma função da associação da cepa, temperatura e pH final.

### 4.3. Efeito das culturas bioprotetoras na capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte – Fase I

De acordo com a Tabela 04 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a separação de soro (sinérese) de todos os experimentos diminuiu significativamente com o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ) durante os 28 dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ , sendo que o iogurte F1 foi o que mais diminuiu (-17,2%). Isso indica que a capacidade de retenção de água (CRA) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em função do tempo de armazenamento ou validade. O iogurte H1 contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC YM-B (culturas *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) na dosagem recomendada pelo fabricante (0,1%v/v) apresentou uma maior sinérese a partir dos 7 dias, no entanto, todos os experimentos contendo culturas bioprotetoras apresentaram sinérese muito próximas com 28 dias de armazenamento, variando entre  $57,3 \pm 0,6\%$  para o iogurte H2 e  $61,9 \pm 0,5\%$  para o iogurte F3. No tratamento estatístico desse parâmetro na Tabela 04 e detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c representam as diferenças significativas entre as médias da sinérese em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D representam as diferenças significativas entre as médias da sinérese de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesse parâmetro. No entanto, a variação foi maior em função do tempo de armazenamento tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator.

Tabela 04: Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1
1	$63,5 \pm 1,0^{\text{aD}}$	$75,3 \pm 1,0^{\text{aA}}$	$64,6 \pm 2,4^{\text{bCD}}$	$72,2 \pm 2,6^{\text{aAB}}$
7	$62,0 \pm 1,6^{\text{abD}}$	$72,1 \pm 1,6^{\text{abB}}$	$69,9 \pm 1,3^{\text{aB}}$	$68,8 \pm 4,5^{\text{abBC}}$
14	$61,5 \pm 0,5^{\text{abcBC}}$	$68,6 \pm 1,3^{\text{bcA}}$	$69,0 \pm 1,1^{\text{aA}}$	$65,3 \pm 1,6^{\text{bAB}}$
21	$58,0 \pm 0,5^{\text{cD}}$	$66,6 \pm 1,4^{\text{cA}}$	$64,4 \pm 1,1^{\text{bAB}}$	$59,3 \pm 0,8^{\text{cCD}}$
28	$58,9 \pm 0,9^{\text{bcBC}}$	$68,2 \pm 0,8^{\text{bcA}}$	$59,9 \pm 1,1^{\text{cBC}}$	$59,8 \pm 0,6^{\text{cBC}}$
<b>Var (%)</b>	<b>-7,3</b>	<b>-9,4</b>	<b>-7,3</b>	<b>-17,2</b>
Continuação.				
DIAS	H2	F2	H3	F3
1	$63,8 \pm 2,0^{\text{bD}}$	$68,8 \pm 0,6^{\text{aBC}}$	$64,0 \pm 0,3^{\text{aD}}$	$66,2 \pm 2,7^{\text{bCD}}$
7	$62,0 \pm 1,4^{\text{aB}}$	$65,3 \pm 0,9^{\text{abCD}}$	$62,0 \pm 0,4^{\text{abD}}$	$76,6 \pm 0,9^{\text{aA}}$
14	$60,3 \pm 0,8^{\text{bcC}}$	$63,9 \pm 0,8^{\text{bcBC}}$	$60,4 \pm 0,5^{\text{abcC}}$	$65,7 \pm 1,5^{\text{bcAB}}$
21	$59,5 \pm 1,1^{\text{cCD}}$	$62,0 \pm 0,3^{\text{bcBCD}}$	$57,7 \pm 1,1^{\text{cD}}$	$63,5 \pm 1,3^{\text{bABC}}$
28	$57,3 \pm 0,6^{\text{cC}}$	$61,3 \pm 0,6^{\text{cBC}}$	$58,8 \pm 0,6^{\text{bcBC}}$	$61,9 \pm 0,5^{\text{cB}}$
<b>Var (%)</b>	<b>-10,3</b>	<b>-10,8</b>	<b>-8,2</b>	<b>-6,6</b>

**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Também se verificou que a sinérese dos iogurtes contendo culturas bioprotetoras foi significativamente menor do que a do iogurte controle2 ( $p < 0,05$ ) e não teve variação significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte controle1 principalmente no final do período de armazenamento (28 dias). Dessa forma, a CRA foi em geral significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando se adicionou as culturas bioprotetoras do que quando se usou apenas as culturas iniciais (controle2). No final dos 28 dias de armazenamento, os iogurtes contendo cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB (H2 e H3) apresentaram sinérese significativamente menores do que os contendo a cultura comercial FRESHQ-11 (F2 e F3).

Na Tabela 04 pode-se observar que quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FRESHQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo da sinérese ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte F1 e F2). Um comportamento inverso foi observado quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3), ou seja, houve uma diminuição da sinérese durante a maior parte do tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte H1 e H2). No entanto, essas diferenças não foram significativas com 28 dias de armazenamento ( $p > 0,05$ ).

A capacidade de retenção de água (CRA) tem um comportamento inverso da sinérese. Zhao e Liang (2022) observaram que a CRA das amostras de iogurte controle S (sem cultura bioprotetora) e na proporção 1:2 (*L. plantarum* MC5 e culturas iniciais *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaric*) diminuiu significativamente com o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ), ou seja, a sinérese aumentou, enquanto as de 1:1 e 2:1 permaneceram constantes.

No entanto, o estudo de Zhao e Liang (2022) está em acordo com esta pesquisa quando concluiu que os valores de CRA das amostras de iogurte contendo a cultura bioprotetora *L. plantarum* MC5 nas proporções 1:1 e 2:1 foram significativamente maiores que o do controle S ( $p < 0,05$ ) durante o armazenamento. Segundo esses autores, após 21 dias de armazenamento, os níveis de CRA dos grupos 1:1 e 2:1 (68,33% e 60,59%) ainda eram significativamente maiores que os dos grupos controle S e 1:2 ( $p < 0,05$ ). Segundo Zhao e Liang (2022, tradução própria), “esses resultados indicaram que a adição de *L. Plantarum* MC5 provavelmente melhorou o fenômeno de sinérese das amostras de iogurte durante o armazenamento, tornando assim a estabilidade do soro de leite na estrutura da rede de proteínas maior nos grupos 1:1 e 2:1”. Foi relatado em outro estudo que o leite fermentado pela cepa *Ldb 2214* produtora de EPS apresenta um bom valor da capacidade de retenção de água (Zhang *et al.*, 2016). Os resultados de Wang *et al.* (2020) relataram que a maior CRA de *AE5* foi de 66,23%. Isso implica que o iogurte que adiciona *L. Plantarum* MC5 tem uma capacidade mais forte de absorver água, o que pode prolongar a vida útil do produto (Zhao e Liang, 2022).



Outro estudo observou que o EPS pode ligar a água (Anna, 2018). Essa capacidade de ligação à água do EPS limitou a precipitação do soro do iogurte e o afrouxamento da estrutura do gel de proteína, resultando na alta coesão das amostras de iogurte. Além disso, a capacidade de ligação à água do EPS-LAB foi influenciada pelo seu tipo, quantidade, distribuição e interação das redes de proteínas com o EPS, bem como pelo tempo de fermentação do iogurte. O maior tempo de fermentação permitiu mais rearranjos estruturais, o que levou à formação de estruturas fracas e aumentou as precipitações espontâneas do soro (Han *et al.*, 2016). Isso foi observado com os iogurtes controle2 e o F3 que apresentaram maior tempo de fermentação e maior sinérese.

Porém, no estudo de Khan-Mohammadi *et al.* (2023), eles observaram que durante o período de armazenamento, não foi observada diferença estatisticamente significativa na sinérese dos tratamentos ( $p > 0,05$ ). A sinérese de todas as amostras durante 42 dias apresentou uma tendência crescente de forma que a maior taxa de sinérese foi observada nos dias 35 e 42. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na sinérese de T1 (bactéria iniciadora de iogurte contendo  $10^6$  UFC/mL de *L. rhamnosus*),  $p > 0,05$ . Em T3 (bactérias iniciadoras de iogurte contendo  $10^6$  UFC/mL de *L. rhamnosus* e  $10^5$  de UFC/ mL *P. expansum*), a quantidade de sinérese nos dias 0 e 7 foi significativamente menor do que nos outros dias ( $p < 0,05$ ), e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos demais dias até o final do armazenamento ( $p > 0,05$ ).

Em alguns estudos na literatura como o de Tamime e Robinson (2007) observaram que o aumento da sinérese das amostras de iogurte ao longo do tempo pode ser atribuído ao aumento da acidez titulável e diminuição do pH do produto, bem como à contração da rede de gel devido ao resfriamento. Por outro lado, devido à hidrólise e digestão das proteínas do produto, a quantidade de hidratação aumenta com o aumento do tempo de armazenamento; porque as proteínas que dão a textura desejada perdem suas propriedades e quebram sua ligação com a água; mudanças de pH também estão envolvidas; porque desnaturam a estrutura da proteína. Devido à desnaturação da proteína, a água aderida foi liberada e, conseqüentemente, a sinérese aumentou (Jozve-Zargharabadi *et al.*, 2020). No estudo de Khan-Mohammadi *et al.* (2023), a taxa de sinérese nas amostras de iogurte probiótico foi maior do que na amostra controle, o que pode ser atribuído à maior acidez titulável (menor pH) dessas amostras segundo os autores. Alguns estudos também relataram um aumento na sinérese do iogurte durante o armazenamento (Supavititpatana *et al.*, 2010; Jozve-Zargharabadi *et al.*, 2020).

De acordo com Ziarno *et al.* (2022), o valor da capacidade de retenção de água (CRA) foi influenciado pela composição microbiana da cultura iniciadora utilizada, o que provavelmente é explicado pelas propriedades acidificantes das bactérias usadas. Nesse estudo, os valores mais baixos da CRA foram registrados para amostras fermentadas apenas com cultura de bactérias propiônicas,

enquanto uma mistura das bactérias iniciais de iogurte e culturas propiônicas produziu valores de CRA comparáveis aos encontrados para amostras fermentadas apenas com culturas iniciais de iogurte. No estudo de Ziarno *et al.* (2022), os valores da CRA variaram ao longo do tempo de armazenamento dos iogurtes. No caso do iogurte preparado apenas com as culturas iniciais, começou com 40% no dia 0 e após 21 dias caiu para em torno de 37,5%, valores próximos ao encontrado na presente pesquisa.

Gumus e Gharibzahedi (2021) indicaram que a sinérese e a capacidade de retenção de água são determinados pelo encolhimento do gel causado pela diminuição do valor do pH. A esse respeito, os dados da literatura são altamente contraditórios. Ashna *et al.* (2022) mostraram que a secreção da fase aquosa diminui (e assim, o valor de CRA aumenta) durante o armazenamento refrigerado das amostras. Szajnar *et al.* (2014) também mostraram uma tendência de diminuição da sinérese com o aumento do tempo de armazenamento de iogurtes lácteos.

No entanto, deve-se notar que a estrutura do gel de proteína e, portanto, sua dureza também pode determinar o valor da CRA. Ashna *et al.* (2022) sugeriram que a sinérese e o valor de CRA podem ser devidos aos sólidos totais do iogurte que está sendo fermentado. Além disso, Malaki *et al.* (2008) indicaram que o efeito desnaturante das proteínas do leite e da soja e a formação de seus complexos articulares durante o tratamento térmico são decisivos para a sinérese e valor de CRA. Nesses experimentos, o leite de vaca e a bebida de soja foram submetidos separadamente ao tratamento UHT, o que pode ter determinado os valores de CRA obtidos e influenciado as mudanças observadas nesses valores durante o armazenamento refrigerado. Além disso, Domagała e Wszolek (2008) mostraram um efeito estatisticamente significativo do tipo de fermento utilizado na sinérese de diferentes variantes de iogurte de leite.

Enfim, no estudo de Fayyaz *et al.* (2020), que analisou a atividade antifúngica de combinações binárias e ternárias de três bactérias lácticas (*L. reuteri* (IBRC-M10755), *L. helveticus* (IBRC-M No 10874) e *L. acidophilus* (IBRC-M)) contra cinco leveduras deteriorantes em iogurte, para todos os iogurtes adicionados de LAB, a CRA aumentou significativamente com o tempo ( $p < 0,05$ ), enquanto para a amostra de iogurte controle, a mudança não foi significativa ( $p > 0,05$ ). Estes resultados estão semelhantes ao encontrado na presente pesquisa e, segundo os autores, as interações ocorrem durante os períodos de armazenamento em termos de produção de ácido devido ao crescimento das culturas fazendo com que as partículas de caseína retenham as moléculas de água de forma mais eficiente, resultando na diminuição da sinérese (Öztürk & Öner, 1999). O aumento da CRA de proteínas devido à diminuição do pH em paralelo ao crescimento de LAB dá origem a um aumento da estabilidade da coalhada do iogurte (Öztürk & Öner, 1999). Os valores da CRA nesse estudo foram bem menores do que os encontrados na presente pesquisa.

#### 4.4. Efeito das culturas bioprotetoras na textura do iogurte – Fase I

O iogurte constitui uma mistura de biopolímeros como proteínas, polissacarídeos e gorduras. A textura, propriedades sensoriais, glóbulos de gordura e estabilidade de armazenamento podem ser afetados pela microestrutura dos géis de proteína do leite e suas propriedades reológicas (Wang *et al.*, 2023). A microestrutura do iogurte é formada por uma rede tridimensional de agregados de micelas de caseína, onde a forma globular é observável e intercalada por zonas vazias (Gilbert e Turgeon, 2021; Gyawali e Ibrahim, 2016).

De acordo com a Tabela 05 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a firmeza (g-força) do iogurte na maioria dos experimentos aumentou significativamente durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) com a exceção dos iogurtes controle2, H3 e F3 que não apresentaram variação significativa da firmeza ( $p > 0,05$ ) com 28 dias. Observou-se que a firmeza do iogurte H1 teve um aumento de 10,6% com 28 dias de armazenamento, sendo o que mais aumentou de todos os experimentos que utilizaram culturas bioprotetoras.

Tabela 05: Variação da firmeza (g-força) em função dos dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1
1	22,8±0,6 <sup>bBC</sup>	24,0±0,2 <sup>aAB</sup>	22,8±0,2 <sup>cBC</sup>	21,9±0,4 <sup>cCD</sup>
7	25,1±0,7 <sup>aB</sup>	24,5±0,6 <sup>aB</sup>	24,4±0,7 <sup>bB</sup>	23,0±0,6 <sup>bcCD</sup>
14	25,2±0,3 <sup>aAB</sup>	24,8±0,5 <sup>aAB</sup>	26,1±0,5 <sup>aA</sup>	24,7±0,7 <sup>aAB</sup>
21	25,3±0,4 <sup>aAB</sup>	24,7±0,4 <sup>aABC</sup>	26,0±0,5 <sup>aA</sup>	23,9±0,3 <sup>abC</sup>
28	25,7±0,4 <sup>aA</sup>	24,7±0,5 <sup>aAB</sup>	25,2±0,5 <sup>abAB</sup>	24,0±0,7 <sup>abBC</sup>
<b>Var (%)</b>	<b>12,8</b>	<b>3,1</b>	<b>10,6</b>	<b>10,0</b>

DIAS	H2	F2	H3	F3
1	22,9±0,7 <sup>bBC</sup>	21,2±0,2 <sup>cD</sup>	22,6±0,4 <sup>bCD</sup>	24,7±0,4 <sup>bA</sup>
7	23,9±0,6 <sup>abBC</sup>	22,2±0,5 <sup>bcD</sup>	22,1±0,1 <sup>bD</sup>	26,9±0,5 <sup>aA</sup>
14	24,2±0,3 <sup>aBC</sup>	23,2±0,4 <sup>bC</sup>	23,3±0,3 <sup>abC</sup>	25,1±0,4 <sup>bAB</sup>
21	24,3±0,3 <sup>aBC</sup>	24,7±1,7 <sup>aABC</sup>	24,2±0,3 <sup>aBC</sup>	25,2±0,5 <sup>bABC</sup>
28	23,9±1,2 <sup>abBC</sup>	22,6 ±0,4 <sup>bC</sup>	22,7 ±0,2 <sup>bC</sup>	25,1±0,4 <sup>bAB</sup>
<b>Var (%)</b>	<b>4,3</b>	<b>6,6</b>	<b>0,4</b>	<b>1,6</b>

**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Nos experimentos contendo culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB (H2 e H3) e FRESHQ-11 (F1 e F2), a firmeza se apresentou significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que a dos iogurtes controle1 e controle2 durante o período de armazenamento, com a exceção dos iogurtes F3 (cultura FRESHQ-11 na dosagem 0,2%v/v) e H1 (cultura HOLDBAC-YMB na dosagem 0,1%v/v). No tratamento estatístico dos parâmetros de textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) nas Tabelas 05 a 08, detalhados no Apêndice D, as letras a, b, c representam as diferenças

significativas entre as médias desses parâmetros em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D representam as diferenças significativas entre as médias desses parâmetros de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesses parâmetros. No entanto, em todos os parâmetros de textura, a variação foi maior em função do tipo de iogurte tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator.

Também pode-se observar na Tabela 05 que quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FRESHQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo da firmeza ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurtes F1 e F2). Um comportamento inverso foi observado (Tabela 05) quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3), ou seja, houve uma diminuição significativa da firmeza ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurtes H1 e H2).

Os iogurtes com culturas iniciais e bioprotetoras tem uma produção maior de EPS do que os iogurtes que usam apenas as culturas iniciais (controle1 e controle2). Na literatura há vários estudos que mostram que o EPS diminui os parâmetros de textura (firmeza, consistência, índice de viscosidade e a coesividade). Além disso, a acidez titulável contribuiu para aumentar a firmeza e a consistência do iogurte e, por isso, que estes parâmetros aumentaram em função dos dias de armazenamento, pois a acidez titulável aumentou. Por esse mesmo motivo, os iogurtes H1 e F3 que apresentaram uma acidez titulável maior, também apresentaram os parâmetros de textura significativamente maiores do que os demais iogurtes; e o iogurte H3 que apresentaram uma acidez titulável menor, também apresentaram os parâmetros de textura significativamente menores do que os demais iogurtes.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Zhao e Liang (2022), que observaram que a firmeza dos iogurtes contendo a cultura bioprotetora *L. Plantarum MC5* foi menor que a do iogurte controle S. Portanto, a adição de *L. Plantarum MC5* reduziu significativamente a firmeza das amostras de iogurte. Segundo esses autores, resultados semelhantes foram relatados por Bancalari *et al.* (2020), onde foi observado que a firmeza dos iogurtes feitos com culturas produtoras de EPS geralmente era menor do que a do iogurte de controle feito sem culturas iniciais produtoras de EPS. Zhao *et al.* (2021) relatou que o EPS pode afetar as propriedades de textura de um coágulo de iogurte diminuindo sua firmeza.

No estudo de Zhao e Liang (2022), a firmeza das amostras do iogurte controle S também aumentou gradualmente durante o tempo de armazenamento, enquanto as das amostras com *L. plantarum MC5* permaneceram razoavelmente constantes, o que não ocorreu no presente estudo com

outras culturas bioprotetoras (*L. rhamnosus* e *L. rhamnosus* + *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) com a exceção dos iogurtes H3 e F3. Segundo os autores, essa observação pode ser devido à diferença na produção de EPS e a pós-acidificação do iogurte durante o armazenamento. Yildiz e Ozcan (2019) também relatou que a firmeza e a consistência foram afetadas pela sinérese, diminuição do pH e aumento da hidratação da caseína em iogurtes com longo tempo de armazenamento. O estudo de Zhao e Liang (2022) também descobriu que a interação entre a proporção de adição de *L. plantarum* MC5 e o tempo de armazenamento das amostras de iogurte teve um efeito significativo na firmeza, consistência e coesão do iogurte ( $p < 0,01$ ).

No estudo de Ziarno *et al.* (2022), um aumento na dureza ou firmeza do iogurte durante a refrigeração também foi encontrado em quase todas as amostras armazenadas; essas mudanças já eram estatisticamente significativas após 7 ou 14 dias de armazenamento refrigerado. A magnitude das mudanças dependia da cultura bacteriana usada para fermentar o iogurte. Nesse estudo, as maiores mudanças foram observadas quando um iniciador de bactéria propiônica foi usado onde se observou uma diminuição na dureza ou firmeza em relação ao iogurte controle apenas com as culturas iniciais. Este resultado está de acordo com o encontrado na presente pesquisa, onde se observou que o aumento na dosagem da cultura HOLDBAC YMB que contém a bactéria propiônica para 0,2%v/v diminuiu a firmeza do iogurte mais ainda em relação aos iogurtes controles.

A firmeza do iogurte é um dos critérios de qualidade mais importantes. A produção de iogurtes e produtos semelhantes a iogurtes livres de defeitos de textura continua a ser um problema na indústria de laticínios (El-Sayed *et al.*, 2002). A textura (ou seja, tanto a dureza quanto a adesividade) dos produtos de iogurte depende da composição da matéria-prima, do tipo de cultura bacteriana utilizada, do método de fermentação e dos aditivos de texturização, entre outras coisas (Mituniewicz-Małek *et al.*, 2015; Miocinovic *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2020). Em contraste, Vinderola *et al.* (2009) determinaram que as propriedades reológicas dos produtos lácteos fermentados dependem da acidez titulável (quanto maior a acidez titulável, maior a dureza). Também existem estudos disponíveis sugerindo que o tipo de leite usado e a cultura não têm efeito sobre a dureza dos iogurtes analisados (Znamirowska *et al.*, 2018; Domagała, 2005; Domagała e Wszolek, 2008).

A composição das proteínas presentes no iogurte é extremamente importante (Ashna *et al.*, 2022). As propriedades acidificantes das bactérias propiônicas, que são mais fracas do que as da cultura iniciadora de iogurte, não melhoraram as características de textura dessas amostras de iogurte.

No estudo de Fayyaz *et al.* (2020), os resultados mostraram que a inoculação de culturas bioprotetoras compostas por bactérias ácido lácticas (LAB) resultou em aumento significativo na dureza e adesividade, enquanto a elasticidade permaneceu constante e a capacidade de retenção de água (CRA) diminuiu ( $p < 0,05$ ). O aumento da dureza do iogurte durante o armazenamento pode

estar relacionado à redução do pH causada pela atividade das LAB, ocasionando alteração na carga elétrica da caseína (Harwalkar & Kalab, 1986). Segundo esses autores, durante o período de armazenamento, como resultado da produção de ácidos seguida de redução do pH, o aumento da carga superficial de caseína faz com que o gel de iogurte fique mais rígido. A elasticidade, definida como a capacidade da rede de gel de iogurte de se recuperar após a primeira deformação, está relacionada à ligação proteína-proteína, que por sua vez é afetada pela taxa em que os fosfatos coloidais são liberados das micelas de caseína. Essas reações são regidas pela taxa de produção de ácido pela cultura iniciadora (Sah *et al.*, 2016).

Como se pode observar na Tabela 06 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a consistência (g-seg) do iogurte tem um comportamento semelhante ao apresentado pela firmeza, ou seja, em todos os experimentos aumentou significativamente durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). No entanto, a partir dos 21 dias ocorreu uma queda na maioria dos experimentos. As exceções foram o iogurte H1 e o iogurte controle2 que ocorreu um aumento na consistência com 28 dias.

Observou-se também que a consistência do iogurte controle1 e controle2 teve aumento final de 15,6% e 5,6%, respectivamente, e o iogurte H1 teve um aumento de 17,9% com 28 dias de armazenamento, sendo o maior de todos os experimentos. Nos demais experimentos contendo culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB (H2 e H3) e FRESHQ-11 (F1 e F2), a consistência se apresentou significativamente menor do que a dos iogurtes controle1 e controle2 ( $p < 0,05$ ) durante o período de armazenamento (Tabela 06), com a exceção dos iogurtes F3 (cultura FRESHQ-11 na dosagem 0,2%v/v) e H1 (cultura HOLDBAC-YMB na dosagem 0,1%v/v) que apresentaram uma consistência maior significativamente do que o iogurte controle2 ( $p < 0,05$ ).

Tabela 06: Variação da consistência (g-seg) em função dos dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1
1	475,1 $\pm$ 7,2 <sup>cCD</sup>	499,4 $\pm$ 7,0 <sup>bAB</sup>	474,5 $\pm$ 10,3 <sup>cCD</sup>	460,5 $\pm$ 3,8 <sup>cDE</sup>
7	526,9 $\pm$ 11,6 <sup>bB</sup>	516,8 $\pm$ 5,0 <sup>abB</sup>	522,0 $\pm$ 7,3 <sup>bB</sup>	492,7 $\pm$ 6,3 <sup>bCD</sup>
14	541,5 $\pm$ 10,2 <sup>abAB</sup>	531,3 $\pm$ 3,8 <sup>aBC</sup>	560,8 $\pm$ 13,4 <sup>aA</sup>	524,4 $\pm$ 6,7 <sup>aBC</sup>
21	553,0 $\pm$ 9,3 <sup>aA</sup>	523,4 $\pm$ 9,1 <sup>aB</sup>	559,1 $\pm$ 8,5 <sup>aA</sup>	520,2 $\pm$ 10,9 <sup>aB</sup>
28	549,2 $\pm$ 9,9 <sup>aA</sup>	527,4 $\pm$ 6,4 <sup>aBC</sup>	559,6 $\pm$ 2,6 <sup>aA</sup>	511,6 $\pm$ 3,2 <sup>abCD</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>15,6</b>	<b>5,6</b>	<b>17,9</b>	<b>11,1</b>

DIAS	H2	F2	H3	F3
1	485,6 $\pm$ 11,7 <sup>cBC</sup>	449,3 $\pm$ 3,8 <sup>cE</sup>	461,3 $\pm$ 10,9 <sup>dDE</sup>	518,0 $\pm$ 11,5 <sup>cA</sup>
7	505,7 $\pm$ 4,7 <sup>abBC</sup>	475,1 $\pm$ 7,4 <sup>abDE</sup>	463,8 $\pm$ 5,4 <sup>cdE</sup>	575,6 $\pm$ 14,0 <sup>aA</sup>
14	512,4 $\pm$ 5,5 <sup>aC</sup>	486,6 $\pm$ 4,8 <sup>abD</sup>	488,3 $\pm$ 7,3 <sup>bD</sup>	537,6 $\pm$ 5,8 <sup>bB</sup>
21	511,3 $\pm$ 8,5 <sup>abBC</sup>	491,3 $\pm$ 14,5 <sup>aC</sup>	510,9 $\pm$ 8,4 <sup>aBC</sup>	545,2 $\pm$ 11,0 <sup>bA</sup>
28	492,9 $\pm$ 12,1 <sup>bcDE</sup>	470,3 $\pm$ 8,9 <sup>bF</sup>	480,8 $\pm$ 4,2 <sup>bcEF</sup>	541,3 $\pm$ 7,9 <sup>bAB</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>1,5</b>	<b>4,7</b>	<b>4,2</b>	<b>4,5</b>

**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D, E, F - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Também pode-se observar na Tabela 06 que quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FRESHQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo da consistência ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurtes F1 e F2). Da mesma forma que ocorreu com a firmeza, um comportamento inverso foi observado (Tabela 06) quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3), ou seja, houve uma diminuição significativa da consistência ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurtes H1 e H2).

A coesão, um forte indicador de ligação, afeta a integridade estrutural do iogurte (Titapiccolo, 2011). Como se pode observar na Tabela 07 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a coesividade dos iogurtes também aumentou significativamente em função dos dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ), com as exceções dos iogurtes controle2 e H3 cujos aumentos não foram significativos ( $p > 0,05$ ) com 28 dias.

Os iogurtes controle1 e controle2 apresentaram uma coesividade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB (iogurte H2 e H3) e FRESHQ-11 (iogurtes F1 e F2) no final do período de armazenamento. No entanto, não houve diferenças significativas da coesividade ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte F3. O iogurte H1 apresentou um valor de coesividade maior do que os iogurtes controle1 e controle2 com 28 dias de armazenamento (18,8g-força).

Tabela 07: Variação da coesividade (g-força) em função dos dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1
1	16,8±0,4 <sup>cAB</sup>	17,5±0,7 <sup>abA</sup>	16,9±0,3 <sup>cAB</sup>	16,1±0,1 <sup>cBC</sup>
7	17,5±0,7 <sup>bcBC</sup>	17,4±0,2 <sup>bBCD</sup>	17,9±0,8 <sup>bcAB</sup>	16,3±0,2 <sup>bcD</sup>
14	18,1±0,5 <sup>abAB</sup>	17,7±0,7 <sup>abB</sup>	19,0±0,2 <sup>aA</sup>	17,5±0,5 <sup>aBC</sup>
21	19,0±0,5 <sup>aA</sup>	18,5±0,7 <sup>aAB</sup>	18,5±0,4 <sup>abAB</sup>	16,8±0,5 <sup>abcC</sup>
28	18,3±0,3 <sup>abAB</sup>	18,1±0,7 <sup>abAB</sup>	18,8±0,4 <sup>abA</sup>	17,1±0,1 <sup>abBC</sup>
<b>Var (%)</b>	<b>8,6</b>	<b>3,3</b>	<b>11,3</b>	<b>6,7</b>

Continuação...

DIAS	H2	F2	H3	F3
1	16,6±0,6 <sup>bABC</sup>	15,5±0,7 <sup>bC</sup>	17,0±0,6 <sup>aAB</sup>	17,3±0,4 <sup>bA</sup>
7	17,2±0,3 <sup>abBCD</sup>	16,5±0,6 <sup>abCD</sup>	16,8±0,2 <sup>aBCD</sup>	19,0±0,5 <sup>aA</sup>
14	17,8±0,4 <sup>aAB</sup>	16,5±0,3 <sup>aC</sup>	17,2±0,7 <sup>aBC</sup>	18,2±0,3 <sup>abAB</sup>
21	17,4±0,3 <sup>abBC</sup>	16,7±0,4 <sup>aC</sup>	17,6±0,4 <sup>aBC</sup>	18,0±0,5 <sup>abAB</sup>
28	17,4±0,4 <sup>abBC</sup>	16,3±0,2 <sup>abC</sup>	17,6±0,7 <sup>aB</sup>	18,0±0,6 <sup>abAB</sup>
<b>Var (%)</b>	<b>4,7</b>	<b>5,6</b>	<b>3,5</b>	<b>4,0</b>

**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Também pode-se observar na Tabela 07 que quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FRESHQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo da coesividade ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte F1 e F2). Conforme se pode observar na Tabela 07, esse comportamento não foi observado quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3) pois não houve diferença significativa da coesividade ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte H2 que usou essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v. Porém, a coesividade do iogurte H1 foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a do iogurte H3.

Conforme explicado anteriormente, os iogurtes com culturas iniciais e bioprotetoras tem uma produção maior de EPS do que os iogurtes que usam apenas as culturas iniciais (controle1 e controle2). Na literatura há vários estudos que mostram que o EPS diminui os parâmetros de textura (firmeza, consistência, índice de viscosidade e a coesividade). Além disso, a acidez titulável contribuiu para aumentar a coesividade do iogurte e, por isso, que este parâmetro aumentou em função dos dias de armazenamento, pois a acidez titulável aumentou. Por esse mesmo motivo, os iogurtes H1 e F3 que apresentaram uma acidez titulável maior, também apresentaram os parâmetros de textura significativamente maiores do que os demais iogurtes.

Segundo Ziarno *et al.* (2022), durante o armazenamento das amostras de iogurte, observou-se um aumento estatisticamente significativo na adesividade, com a exceção dos iogurtes adicionados com a cultura propiônica cuja adesividade diminuiu com 21 dias. As propriedades acidificantes das bactérias propiônicas, que são mais fracas que as da cultura iniciadora de iogurte, não melhoraram os valores de adesão das amostras de iogurte. Os resultados desse estudo estão coerentes com a presente pesquisa, pois como foi relatado anteriormente, a coesividade dos iogurtes também apresentou uma tendência de aumentar em função dos dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .

No entanto, o estudo de Zhao e Liang (2022) que usou uma cultura bioprotetora diferente da usada na presente pesquisa, mostrou que a coesividade nas amostras de iogurte com a cultura bioprotetora *L. plantarum* MC5 foi significativamente maior do que a do iogurte controle S ( $p < 0,05$ ). Esses autores usaram a seguinte explicação de Abid *et al.* (2018, tradução própria) para justificar os seus resultados: “*esta observação foi provavelmente devido à rede semelhante a filamentos de miofibrilas formada entre os glóbulos de gordura embutidos na matriz protéica e o EPS produzido por L. plantarum MC5 que conectou as células microbianas e a matriz protéica do iogurte, formando um sistema de gel relativamente estável*”. Delikanli e Ozcan (2015) relataram que a coesão estava relacionada à força da composição do gel, que refletia as propriedades de retenção de água do iogurte. No entanto, Khanal e Lucey (2018) relataram que a razão para as diferentes texturas do iogurte não é apenas a concentração ou massa molar de EPS. mas depende de muitos fatores.



Com relação ao índice de viscosidade (Tabela 08, Figuras correspondentes no Apêndice A), também se observou um aumento significativo dos valores no final do tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ) para os iogurtes controle1, H1, F1 e F3 e nos demais não houve aumento significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 08: Variação do índice de viscosidade (g-seg) em função dos dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1
1	6,5±0,8 <sup>cAB</sup>	7,6±0,8 <sup>aA</sup>	5,7±0,6 <sup>cABC</sup>	3,8±0,5 <sup>bC</sup>
7	9,6±0,9 <sup>bb</sup>	7,6±0,8 <sup>aBCD</sup>	8,1±1,0 <sup>bBC</sup>	5,8±1,6 <sup>abDE</sup>
14	11,6±0,5 <sup>abA</sup>	8,0±1,6 <sup>aB</sup>	13,2±1,3 <sup>aA</sup>	7,3±0,2 <sup>aBC</sup>
21	12,5±1,3 <sup>aA</sup>	8,9±0,9 <sup>aB</sup>	12,9±1,3 <sup>aA</sup>	6,8±0,1 <sup>aBC</sup>
28	10,6±1,9 <sup>abB</sup>	8,4±1,3 <sup>aBCD</sup>	13,5±0,2 <sup>aA</sup>	7,7±1,5 <sup>aCDE</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>64,1</b>	<b>11,0</b>	<b>138,3</b>	<b>100,7</b>

DIAS	H2	F2	H3	F3
1	5,9±0,6 <sup>aABC</sup>	4,5±0,2 <sup>aBC</sup>	5,5±0,9 <sup>abABC</sup>	6,7±1,0 <sup>cAB</sup>
7	6,7±1,2 <sup>aCDE</sup>	4,5±0,5 <sup>aE</sup>	4,5±0,3 <sup>bE</sup>	12,4±1,1 <sup>aA</sup>
14	7,7±0,7 <sup>aB</sup>	5,0±0,8 <sup>aC</sup>	5,3±0,5 <sup>bC</sup>	9,1±0,6 <sup>bb</sup>
21	7,4±0,6 <sup>aBC</sup>	5,6±0,6 <sup>aC</sup>	7,5±0,7 <sup>aBC</sup>	7,6±1,4 <sup>b<sup>c</sup>BC</sup>
28	6,2±1,3 <sup>aDE</sup>	3,6±0,7 <sup>aF</sup>	6,0±0,6 <sup>abE</sup>	9,3±1,5 <sup>b<sup>c</sup>BC</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>5,1</b>	<b>-20,6</b>	<b>9,7</b>	<b>40,1</b>

**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D, E, F - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Também pode-se observar na Tabela 08 que quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FRESHQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo do índice de viscosidade ( $p < 0,05$ ) durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte F1 e F2). Um comportamento inverso foi observado quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3), ou seja, houve uma diminuição significativa desse parâmetro ( $p < 0,05$ ) em relação aos iogurtes que usaram a dosagem de 0,1%v/v (iogurte H1 e H2) conforme se pode observar na Tabela 08. Entretanto, com 21 dias, o iogurte H2 não apresentou diferença significativa no índice de viscosidade ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte H3.

Os iogurtes controle1 e controle2 apresentaram um índice de viscosidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB e FRESHQ-11 com a exceção dos iogurtes H1 e F3. O iogurte H1 apresentou um valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o iogurte controle2 a partir de 14 dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . O iogurte H1 apresentou também a maior variação do índice de viscosidade do que o iogurte controle1, pois aumentou 138,3% ao longo dos 28 dias de armazenamento, enquanto o iogurte controle1 aumentou 64,1%. O iogurte F3 também apresentou um valor do índice de viscosidade (g-seg) significativamente

maior ( $p < 0,05$ ) do que o iogurte controle2 durante o período de armazenamento com a exceção dos dias 1 e 21. Com relação ao iogurte controle1, o iogurte F3 apresentou um valor do índice de viscosidade (g-seg) significativamente menor ( $p < 0,05$ ) a partir do dia 14.

É importante ressaltar que o fato da maioria dos experimentos contendo as culturas bioprotetoras apresentarem valores dos parâmetros de textura significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os iogurtes controle1 e controle2 não é necessariamente um problema para o uso dessas culturas como agentes antifúngicos, tendo em vista que na presente pesquisa não se usou agentes espessantes e nem incremento de leite em pó para aumentar estes parâmetros, pois esses agentes deixam uma textura mais firme, diminuindo a sinérese e aumentando a aceitabilidade do iogurte. Diversos materiais poliméricos podem ser utilizados como espessantes e sua origem pode ser vegetal ou microbiana. Entre os polissacarídeos, estão o amido, a pectina, a carragenana, os alginatos, a goma xantana, a goma gelana e a goma arábica. Entre os materiais proteicos, estão os caseinatos e a gelatina (TONELI *et al.*, 2005). Segundo Walstra *et al.* (2006), três dos espessantes mais utilizados são o amido, a pectina e a gelatina.

#### 4.5. Efeito das culturas bioprotetoras na inibição de bolores e leveduras – Fase I.

Para avaliar o crescimento de bolores e leveduras em iogurtes formulados com e sem culturas bioprotetoras, foram realizadas análises desses microrganismos com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento em câmara fria a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . Todas as análises de bolores e leveduras demonstradas na Tabela 09 e nas placas do Apêndice B foram realizadas com uma diluição ( $10^{-1}$ ) das amostras de iogurte. Observa-se que praticamente não houve formação de colônias de bolores e leveduras em todos os experimentos até os 14 dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ .

Tabela 09: Concentração de bolores/leveduras (UFC/mL) em função dos dias de validade – Fase I.

DIAS	Controle1	Controle2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	ausente	10	10	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
7	ausente	ausente	30	ausente	10	10	ausente	ausente
14	ausente	40	10	ausente	20	20	ausente	ausente
21	ausente	5.440	10	ausente	2.300	4.470	340	ausente
28	ausente	21.000	ausente	ausente	2.770	18.000	ausente	ausente

No primeiro dia de armazenamento, apenas os iogurtes controle2 e H1 apresentaram 10 UFC/mL de bolores e os demais experimentos não apresentaram formação de colônias. Com 7 dias de armazenamento, apenas os iogurtes H1, H2 e F2 apresentaram 30 UFC/mL, 10 UFC/mL e 10 UFC/mL de bolores e leveduras, respectivamente. Já com 14 dias de armazenamento, os iogurtes controle2, H1, H2 e F2 apresentaram 40 UFC/mL, 10 UFC/mL, 20 UFC/mL e 20 UFC/mL de bolores

e leveduras, respectivamente, e os demais iogurtes não apresentaram formação de colônias mesmo depois de 7 dias de incubação a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ .

Com relação ao iogurte controle1 que contém apenas o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima de 0,03g/100g, observou-se que não houve formação de colônias de bolores e leveduras durante os 28 dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . No entanto, o iogurte controle2 que não contém conservante químico e nem culturas bioprotetoras apresentou uma elevada contagem de bolores e leveduras a partir dos 21 dias de armazenamento (5.440 UFC/mL para 21 dias e 21.000 UFC/mL para 28 dias).

Já os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras e a metade da dosagem máxima (0,015%) do conservante sorbato de potássio (experimentos H1 e F1), observou-se que apenas o iogurte H1 que usou a dosagem de 0,1%v/v da cultura comercial HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) não apresentou inibição fúngica completa, apresentando, porém, contagem de bolores/leveduras entre 10 UFC/mL e 30 UFC/mL, bem abaixo, portanto, do padrão máximo estabelecido pela legislação brasileira para o iogurte (200 UFC/mL), com a exceção dos 28 dias de armazenamento cuja inibição fúngica foi total. Já o iogurte F1, que usou a dosagem de 0,1%v/v da cultura comercial FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) associada a 0,015g/100g do conservante sorbato de potássio, apresentou inibição fúngica completa durante os 28 dias igual ao resultado apresentado pelo iogurte controle1 contendo apenas o conservante sorbato de potássio.

No entanto, quando se removeu completamente o conservante químico e manteve a mesma dosagem de culturas bioprotetoras de 0,1%v/v (experimentos H2 e F2), com 21 dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ , como se pode observar nas placas do Apêndice B, houve uma formação de bolores e leveduras visivelmente maior (2.300 UFC/mL e 4.470 UFC/mL, respectivamente) do que foi observado nos experimentos H1 e F1. E com 28 dias de armazenamento, houve uma formação de bolores e leveduras maior do que o observado com 21 dias (2.770 UFC/mL para o iogurte H2 e 18.000 UFC/mL para o iogurte F2) como se pode observar nas placas do Apêndice B. Observou-se, então, que na dosagem de 0,1%v/v, sem conservante químico, a cultura comercial FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) apresentou uma inibição fúngica menor do que a cultura comercial HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*).

Quando se dobrou a dosagem das culturas bioprotetoras para 0,2%v/v, sem conservante químico, observou-se no iogurte F3 que houve uma inibição total dos bolores e leveduras durante todo o período de 28 dias de armazenamento quando se usou a cultura comercial FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) como se pode observar nas placas do Apêndice B. Já o iogurte H3 em que se usou a dosagem dobrada de HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) também inibiu completamente bolores e leveduras entre os dias 1 e 14, mas no dia 21 obteve um resultado de

340 UFC/mL, acima do padrão estabelecido pela legislação brasileira para o iogurte que é de 200 UFC/mL. No entanto, com 28 dias também obteve um resultado de ausência de formação de colônias, ou seja, de inibição total de bolores e leveduras. Certamente ocorreu uma contaminação cruzada da placa CompactDry YM durante a realização da análise microbiológica do dia 21 do iogurte H3.

As contagens de bolores e leveduras deram muito elevadas a partir dos 21 dias nos experimentos que não utilizaram o conservante químico sorbato de potássio e usaram as culturas bioprotetoras comerciais nas dosagens recomendadas pelos fabricantes (0,1%v/v) e também no iogurte controle2 que usou apenas as culturas iniciais *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Todos os experimentos foram realizados com os mesmos cuidados de higiene e esterilização dos utensílios usados e do ambiente (capela) tanto durante a preparação do iogurte como também durante a realização das análises microbiológicas. Além disso, o leite pasteurizado integral utilizado foi pasteurizado novamente a  $86\pm 1^{\circ}\text{C}/10$  min durante o processo de preparação do iogurte. Um fato que deve ser levado em consideração é a alta contagem bacteriana total (CBT) do leite pasteurizado integral usado. Isto ocorre devido a elevada carga microbiana do leite cru refrigerado armazenado no silo de estocagem antes do beneficiamento. Isto tem uma influência direta na qualidade microbiológica do iogurte preparado com essa matéria-prima tendo em vista que de acordo com Viljoen (2001), diversos fatores tornam o ambiente de produção propício para o desenvolvimento de leveduras nos produtos lácteos, dentre eles, destacam-se: qualidade da matéria-prima, condições de processamento, má higienização dos equipamentos, do ambiente, dos manipuladores, a eficiência da pasteurização, além de ingredientes, como polpas de frutas, mel, açúcar e castanhas.

No entanto, pode-se afirmar nos resultados obtidos na Tabela 09 e nas placas do Apêndice B que no período estudado de 1 a 28 dias, de uma forma geral, os experimentos de iogurtes contendo as culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii subsp. shermanii*) e FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) combinadas ou não com a metade da dosagem do conservante químico sorbato de potássio (0,015%) tiveram um desempenho semelhante na inibição de bolores e leveduras ao iogurte controle1 que usou apenas o conservante químico sorbato de potássio (0,03%), principalmente quando se usou apenas as culturas bioprotetoras comerciais na dosagem de 0,2%v/v. É importante destacar que a dosagem de 0,1%v/v das culturas bioprotetoras comerciais no iogurte é orientada pelos fabricantes para ser usada juntamente com o conservante químico sorbato de potássio na concentração de 0,03g/100g como uma segurança alimentar adicional na inibição de bolores e leveduras e, no presente estudo, essa dosagem foi usada sem conservante químico ou com a metade de sua concentração. Portanto, os resultados obtidos na inibição fúngica tanto quando se reduziu a concentração do conservante químico pela metade (0,015%) e usou 0,1%v/v das culturas

bioprotetoras ou quando se dobrou essa dosagem para 0,2%v/v sem o uso do conservante químico são muito importantes e promissores para futuras pesquisas em escalas piloto e industrial.

Vários estudos semelhantes também chegaram a essa mesma conclusão usando outras culturas bioprotetoras. Esses estudos também têm buscado explicações dos mecanismos pelos quais essas culturas inibem o crescimento de bolores e leveduras. Por exemplo, segundo Siedler *et al.* (2020), a depleção do oligoelemento essencial manganês por duas espécies de *Lactobacillus* (*L. paracasei* e *L. rhamnosus*) foi descoberta como o principal mecanismo para a inibição do crescimento de leveduras e bolores que deterioram os iogurtes. Eles relataram que a inibição ou redução do crescimento de leveduras e bolores de deterioração é devido à absorção de uma certa quantidade de manganês por culturas bioprotetoras em produtos lácteos. Portanto, a inibição do crescimento de bolor no iogurte e a capacidade do manganês de restaurar o crescimento do bolor parecem estar associadas à capacidade da LAB de eliminar eficientemente o manganês.

Nessa mesma direção, Shi e Knöchel (2021), demonstraram, em iogurte, que a depleção de manganês por *L. plantarum* LP37 desempenhou um papel importante na inibição do crescimento das cepas de *Penicillium* e *Mucor* testadas. Além do *P. roqueforti* ISI4 não afetado, parece, portanto, que esses fungos deteriorantes são geralmente sensíveis a culturas bioprotetoras capazes de tornar o manganês indisponível na matriz. A elucidação da importância das condições de crescimento, fontes de manganês e a taxa de transporte de manganês ajudariam ainda mais a expandir o uso de culturas bioprotetoras em matrizes semelhantes. O efeito inibitório e o modo de ação das culturas bioprotetoras parecem depender não apenas dos organismos alvo e do crescimento da cultura, mas também da composição da matriz.

Garnier *et al.* (2020) também relataram que os ácidos propiônico, láctico, acético e butírico foram os produtos de fermentação mais abundantes gerados por *L. rhamnosus*. As bactérias ácido lácticas (LAB) produzem uma grande variedade de substâncias antimicrobianas, incluindo além dos ácidos orgânicos, ácidos graxos, reuterina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (Lassois *et al.*, 2008).

Peng *et al.* (2023), observaram que a atividade antifúngica de *L. Plantarum* LPP703 CFS contra *Penicillium* sp. foi reduzida pela neutralização do pH, provavelmente associada aos ácidos orgânicos presentes no CFS. Segundo esses autores, quando o pH é menor que o pKa dos ácidos orgânicos, a forma não dissociada predomina e pode atravessar a membrana da célula fúngica por difusão passiva, levando ao acúmulo de ácidos orgânicos no citoplasma e à inibição do crescimento fúngico. No entanto, o pH alto faz com que os ácidos orgânicos sejam dissociados, e esses ácidos orgânicos dissociados não podem penetrar facilmente através da membrana celular, diminuindo o efeito antifúngico dos ácidos orgânicos (Gülck *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2021). Além disso, o efeito

antifúngico de alguns compostos ativos no *CFS* é dependente do pH, e a neutralização do pH reduz sua atividade antifúngica (Li *et al.*, 2012).

O ácido láctico (AL), importante metabólito produzido pelas LAB, é identificado como o principal composto antifúngico do *L. casei* AST18 (Li *et al.*, 2012). No entanto, outro estudo descobriu que o AL não é diretamente responsável pelos efeitos antifúngicos das cepas de LAB em *Penicillium orylophilum* e *Aspergillus niger* (Le Lay *et al.*, 2016). O ácido láctico (AL) sozinho tem um efeito inibitório fraco em *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus niger* e *Eurotium repens* (Dagnas *et al.*, 2015). Segundo Peng *et al.* (2023), os metabólicos mais abundantes antifúngicos produzidos por *L. Pantarum* LPP703 *CFS* foram oleamida, ácido transcinâmico e ácido cítrico.

Fazendo uma relação com a acidez titulável, no presente estudo se verificou que os iogurtes contendo apenas as culturas bioprotetoras comerciais como agente antifúngico, principalmente o iogurte F3 (*L. rhamnosus* 0,2%v/v) que apresentou uma acidez titulável(%) bem maior do que o iogurte controle2 e próxima ao iogurte controle1 durante todo o período, apresentou uma inibição total durante os 28 dias, enquanto que o experimento H3 (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* 0,2%v/v) que apresentou uma acidez titulável mais próxima do iogurte controle2, teve um desempenho pior na inibição de bolores e leveduras do que o iogurte F3 no período estudado.

Dessa forma, os iogurtes H3 (HOLDBAC-YMB 0,2%v/v) e F3 (FRESHQ-11 0,2%v/v) foram selecionados para a fase II pois apresentaram os melhores resultados na inibição fúngica. Obviamente, essa dosagem das culturas bioprotetoras comerciais pode ser maior ainda do que 0,2%v/v, no entanto, é necessário se verificar o custo/benefício dessa dosagem, pois uma maior inibição de bolores e leveduras pode acarretar numa diminuição de perdas e menos retornos de produtos lácteos.

## *Fase II*

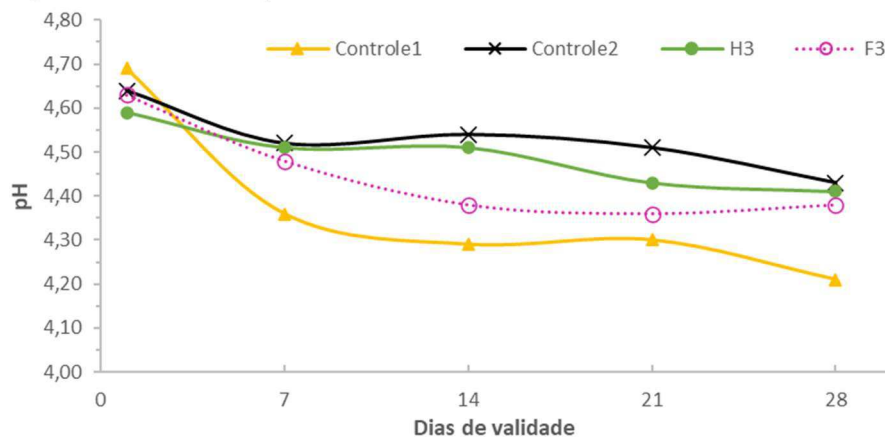
Nesta fase, os iogurtes foram formulados com as culturas bioprotetoras na dosagem de 0,2%v/v, ou seja, foram formulados os iogurtes H3 com a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC YM-B e F3 com a cultura bioprotetora comercial FRESQ-11, pois, conforme relatado anteriormente, esses foram os experimentos que tiveram o melhor desempenho com relação a inibição fúngica na fase I. Nos experimentos da fase II, após o resfriamento a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , os iogurtes foram submetidos a uma contaminação artificial conhecida de bolores e leveduras na concentração de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte. O objetivo dessa fase foi avaliar o desempenho das culturas bioprotetoras comerciais sobre os mesmos parâmetros estudados na fase I em condições iniciais mais severas.

#### 4.6. Efeito das culturas bioprotetoras no pH e acidez titulável – Fase II.

No que se refere a variação do pH com o tempo de armazenamento (em dias), observa-se na Figura 13 que os resultados são semelhantes aos apresentados na primeira fase, ou seja, os valores de pH do iogurte diminuíram gradualmente durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ .

Além disso, o pH do iogurte controle1 também foi mais baixo do que os experimentos com as culturas bioprotetoras comerciais e do que o iogurte controle2 durante os 28 dias de armazenamento. No que se refere ao iogurte controle2 que contém apenas as culturas iniciais *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, observa-se que o mesmo apresentou um comportamento semelhante ao da fase I com valores mais altos de pH do que o iogurte F3 e muito próximo ao pH apresentado pelo iogurte H3.

Figura 13: Variação do pH em função dos dias de armazenamento – Fase II.



Dentre os experimentos com as culturas bioprotetoras, o F3 contendo a cultura FRESHQ-11 na dosagem 0,2%v/v apresentou valores mais baixos de pH do que o iogurte H3 com a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB.

Com relação a acidez titulável (%), observa-se na Tabela 10 (Figura correspondente no Apêndice A) uma tendência inversa à verificada no pH, ou seja, ocorreu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no decorrer do tempo de armazenamento para todos os iogurtes semelhante ao observado na fase I. Além disso, o iogurte controle1 apresentou uma acidez titulável significativamente maior do que o iogurte H3 e não teve diferença significativa em relação ao iogurte F3 ( $p > 0,05$ ). Na fase I, a acidez titulável (%) do iogurte controle1 foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o iogurte F3 a partir dos 21 dias. No tratamento estatístico desse parâmetro na Tabela 10 e detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c, d representam as diferenças significativas entre as médias da acidez titulável em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D representam as diferenças significativas entre as médias da acidez titulável de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência na acidez

titulável. No entanto, a variação foi maior em função dos dias de armazenamento tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para essa variável.

Tabela 10: Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de validade – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	0,635 <sup>cB</sup>	0,666 <sup>dA</sup>	0,639 <sup>cB</sup>	0,648 <sup>dAB</sup>
7	0,743 <sup>cB</sup>	0,702 <sup>bCB</sup>	0,675 <sup>bC</sup>	0,716 <sup>cB</sup>
14	0,774 <sup>aA</sup>	0,693 <sup>cB</sup>	0,684 <sup>abB</sup>	0,770 <sup>bA</sup>
21	0,770 <sup>aB</sup>	0,720 <sup>abC</sup>	0,689 <sup>abD</sup>	0,792 <sup>abA</sup>
28	0,788 <sup>aA</sup>	0,729 <sup>aB</sup>	0,704 <sup>aC</sup>	0,803 <sup>aA</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>24,11</b>	<b>9,46</b>	<b>10,21</b>	<b>23,96</b>

Nota: a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Dentre todos os experimentos da fase II, o iogurte H3 (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) na dosagem de 0,2%v/v foi o que apresentou a acidez titulável significativamente menor ( $p < 0,05$ ) durante o período estudado. Isto ocorre devido aos mesmos motivos explicados na fase I, ou seja, a transformação de ácido lático em ácidos propiônico e acético pela cultura *P. freudenreichii* ssp *shermanii* e, por isso, a acidez titulável (%) foi menor durante o período de armazenamento.

No que se refere ao iogurte controle2 que contém apenas as culturas iniciais *S. salivarius* ssp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, sem conservante químico e bioconservantes, observa-se que, a partir dos 14 dias, o mesmo apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) de acidez titulável (%) do que os iogurtes controle1 e F3 e significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o iogurte H3.

Analisando-se as Figuras 14 e 15, observou-se que a contaminação inicial do iogurte com uma concentração de bolores e leveduras de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte alterou o comportamento do pH e da acidez titulável (%) no período estudado, tendo em vista que na fase II, o pH com 28 dias de validade foi menor para todos os iogurtes estudados. Em ambas as fases, os iogurtes controle2 e H3 apresentam maior pH e menor acidez titulável do que os iogurtes controle1 e F3.

Figura 14: Comparação do pH nas Fases I e II com 28 dias de validade.

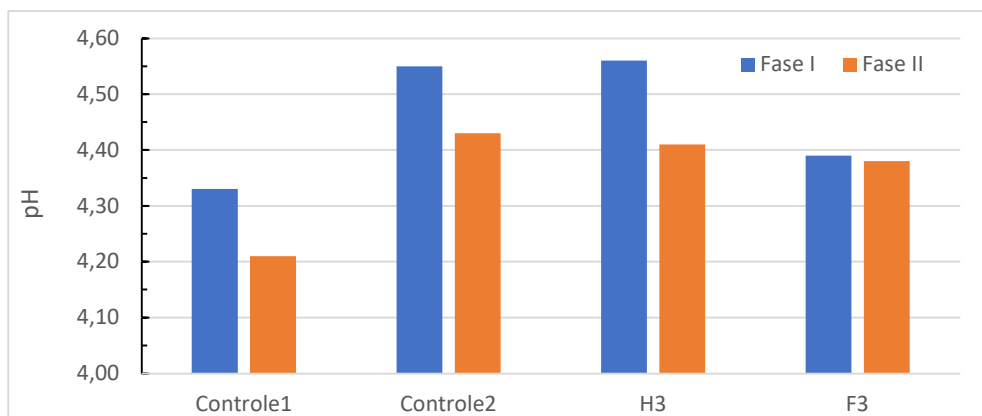
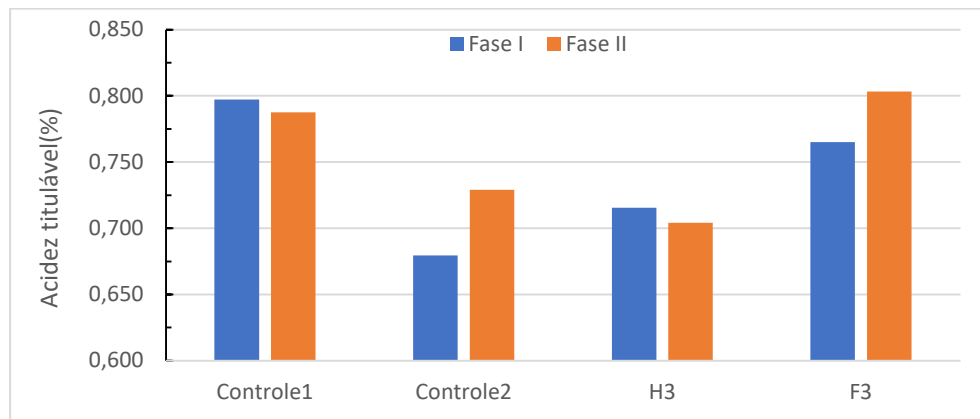




Figura 15: Comparação da acidez titulável (%) nas Fases I e II com 28 dias de validade.



No caso da acidez titulável (%), na fase II, observou-se uma leve diminuição nos iogurtes controle1 e H3 e um aumento considerável nos iogurtes controle2 e F3 em relação a fase I. Os bolores e leveduras inoculados após a etapa de resfriamento do iogurte aumentou a acidez titulável após 28 dias nesses dois iogurtes em comparação a fase I, mas no iogurte controle1 que contém o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima de 0,03g/100g e o iogurte H3 que contém a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB tiveram um efeito inverso. Curiosamente, os iogurtes Controle2 e F3 foram os que apresentaram maior contaminação de bolores e leveduras no final do período de armazenamento. Estes fungos causam diversos problemas nos parâmetros do iogurte inclusive na acidez. Contudo, para entender melhor esse efeito, é necessário identificar e quantificar os tipos de bolores e leveduras.

#### 4.7. Efeito das culturas bioprotetoras no comportamento reológico – Fase II

Como se pode observar nas Tabelas 11 e 12 (Figuras correspondentes no Apêndice A), a viscosidade de todos os experimentos oscilou durante os 28 dias de armazenamento a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ , porém, de uma forma geral, houve um crescimento significativo ( $p < 0,05$ ) em função do tempo de armazenamento com a exceção do iogurte controle1. Vale salientar que no tratamento estatístico desse parâmetro nas Tabelas 11 e 12, detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c, d, e representam as diferenças significativas entre as médias da viscosidade aparente em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C, D representam as diferenças significativas entre as médias da viscosidade aparente de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesse parâmetro. No entanto, a variação foi maior em função do tipo de iogurte tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator nas duas velocidades de rotação (50 rpm e 12 rpm).

Tabela 11: Variação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm em função dos dias de armazenamento a 7±1°C – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	791,6±22,8 <sup>abB</sup>	896,4±25,8 <sup>cA</sup>	800,2±10,8 <sup>eB</sup>	593,3±9,9 <sup>dC</sup>
7	672,4±14,3 <sup>cC</sup>	784,2±20,3 <sup>dB</sup>	1227,3±39,0 <sup>aA</sup>	672,0±21,2 <sup>bcC</sup>
14	834,9±19,2 <sup>aC</sup>	957,8±30,6 <sup>cB</sup>	1107,3±34,9 <sup>bA</sup>	797,4±23,1 <sup>aC</sup>
21	729,9±20,7 <sup>bcC</sup>	1165,5±38,7 <sup>bA</sup>	993,5±41,9 <sup>cB</sup>	643,1±9,7 <sup>cdD</sup>
28	750,8±19,1 <sup>bC</sup>	1250,0±53,1 <sup>aA</sup>	876,3±34,9 <sup>dB</sup>	733,3±11,2 <sup>bC</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>-5,2</b>	<b>39,5</b>	<b>9,5</b>	<b>23,6</b>

**Nota:** a, b, c, d, e - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

No iogurte H3 contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB, a partir dos 21 dias e no iogurte F3, durante todo o período, a viscosidade a 50 rpm e 12 rpm foram significativamente menores do que a do iogurte controle2 ( $p < 0,05$ ) contendo apenas as culturas iniciais. Este resultado é o inverso do que foi obtido na fase I onde foi observado que os iogurtes contendo culturas bioprotetoras apresentaram viscosidades significativamente mais elevadas ( $p < 0,05$ ) do que o iogurte controle2.

Tabela 12: Variação da viscosidade (m.Pas) a 12 rpm em função dos dias de armazenamento a 7±1°C – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	1.537,5±42,1 <sup>bcBC</sup>	2.035,0±72,3 <sup>cA</sup>	1.725,0±63,4 <sup>eB</sup>	1.357,5±33,4 <sup>cC</sup>
7	1.405,0±69,8 <sup>cC</sup>	1.597,5±48,7 <sup>dB</sup>	2.464,3±135,8 <sup>aA</sup>	1.495,0±50,2 <sup>bcBC</sup>
14	1.740,0±83,1 <sup>aB</sup>	2.110,0±92,5 <sup>cA</sup>	2.284,8±83,7 <sup>aA</sup>	1.745,0±84,1 <sup>aB</sup>
21	1.535,0±70,2 <sup>bcC</sup>	2.736,5±106,6 <sup>aA</sup>	1.977,5±101,1 <sup>aA</sup>	1.490,0±71,1 <sup>bcC</sup>
28	1.610,0±83,1 <sup>abC</sup>	2.501,8±164,4 <sup>bA</sup>	1840,0±103,2 <sup>bcB</sup>	1.655,0±84,4 <sup>abBC</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>4,7</b>	<b>22,9</b>	<b>6,7</b>	<b>21,9</b>

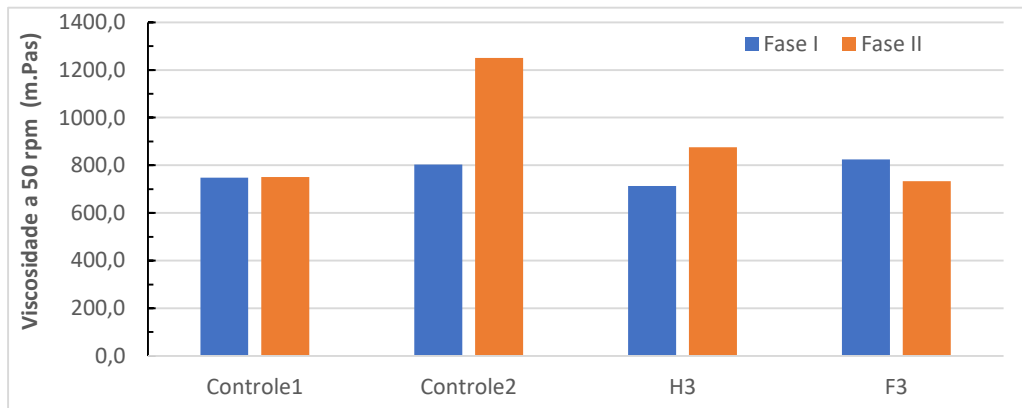
**Nota:** a, b, c - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

O iogurte controle1 apresentou uma viscosidade significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que os iogurtes controle2 e H3, mas não teve diferença significativa em relação ao iogurte F3. Considerando todo o período estudado, este comportamento parece relacionado a acidez titulável, pois os iogurtes controle1 e F3 apresentaram acidez titulável (%) significativamente maior do que os iogurtes controle2 e H3. De fato, a diminuição da viscosidade se deve à redução da capacidade de retenção de água do produto como resultado do aumento da acidez titulável do produto durante o armazenamento (Jozve-Zargharabadi *et al.*, 2020). Além disso, outros pesquisadores concluíram que a viscosidade das amostras de iogurte diminuiu durante o armazenamento (Jozve-Zargharabadi *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2020). Segundo os autores, certamente isso ocorre devido ao aumento da acidez titulável (%) durante o armazenamento.

Analisando-se a Figura 16, observou-se que na fase II a contaminação inicial do iogurte com uma concentração de bolores e leveduras de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g alterou o comportamento da viscosidade

(m.Pas) em relação a fase I onde, com 28 dias de validade, houve um aumento nos iogurtes controle2 e H3, diminuição no iogurte F3 e não houve diferença entre as fases I e II no iogurte controle1.

Figura 16: Comparação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.



#### 4.8. Efeito das culturas bioprotetoras na capacidade de retenção de água e sinérese do iogurte – Fase II

De acordo com a Tabela 13 (Figura correspondente no Apêndice A), assim como na fase I, a separação de soro (sinérese) de todos os experimentos diminuiu significativamente com o tempo de armazenamento ( $p < 0,05$ ) durante os 28 dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ , em que o menor valor foi para o iogurte controle2. Isso indica também que a capacidade de retenção de água (CRA) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) em função do tempo de armazenamento.

Tabela 13: Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II.

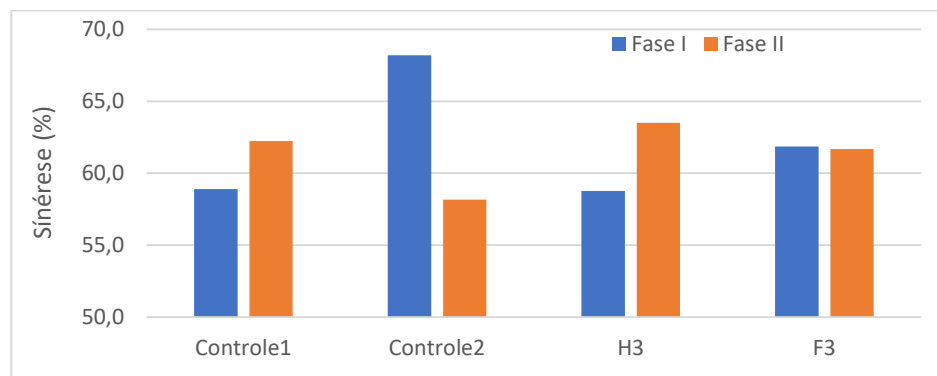
DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	66,0 $\pm$ 0,9 <sup>aB</sup>	62,1 $\pm$ 1,9 <sup>aC</sup>	68,3 $\pm$ 1,1 <sup>aAB</sup>	68,6 $\pm$ 1,3 <sup>aA</sup>
7	64,7 $\pm$ 0,7 <sup>abA</sup>	63,8 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	65,3 $\pm$ 2,0 <sup>bcA</sup>	64,2 $\pm$ 0,8 <sup>bA</sup>
14	62,6 $\pm$ 1,0 <sup>bA</sup>	59,1 $\pm$ 1,6 <sup>bB</sup>	61,9 $\pm$ 1,2 <sup>dA</sup>	61,9 $\pm$ 1,9 <sup>bA</sup>
21	64,8 $\pm$ 0,4 <sup>abAB</sup>	57,0 $\pm$ 1,2 <sup>bC</sup>	66,5 $\pm$ 1,2 <sup>abA</sup>	62,7 $\pm$ 1,1 <sup>bB</sup>
28	62,2 $\pm$ 1,5 <sup>bA</sup>	58,2 $\pm$ 0,6 <sup>bB</sup>	63,5 $\pm$ 0,7 <sup>cdA</sup>	61,7 $\pm$ 0,1 <sup>bA</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>-5,6</b>	<b>-6,4</b>	<b>-7,1</b>	<b>-10,1</b>

**Nota:** a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

No tratamento estatístico desse parâmetro na Tabela 13 e detalhado no Apêndice D, as letras a, b, c, d representam as diferenças significativas entre as médias da sinérese em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C representam as diferenças significativas entre as médias da sinérese de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesse parâmetro. No entanto, a variação foi maior em função do tipo de iogurte tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator.

Ao contrário do que se observou na fase I, se verificou que a sinérese dos iogurtes contendo culturas bioprotetoras foi significativamente maior do que a do iogurte controle2 ( $p < 0,05$ ) e não teve variação significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte controle1 principalmente no final do período de armazenamento (28 dias). Dessa forma, a CRA foi em geral significativamente menor ( $p < 0,05$ ) quando se adicionou as culturas bioprotetoras do que quando se usou apenas as culturas iniciais (controle2). Com a exceção do iogurte controle2 que teve uma forte queda, a contaminação inicial do iogurte com  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de bolores e leveduras contribuiu com o aumento da sinérese dos iogurtes controle1 e H3 e praticamente não teve efeito no iogurte F3 em relação a fase I conforme se pode verificar na Figura 17 com 28 dias.

Figura 17: Comparação da sinérese (%) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.



Como foi explicado na fase I, em geral, há divergências na literatura sobre o comportamento da sinérese ao longo do tempo de armazenamento. Por exemplo, segundo Tamime e Robinson (2007), o aumento da sinérese das amostras de iogurte ao longo do tempo pode ser atribuído ao aumento da acidez titulável e diminuição do pH do produto, bem como à contração da rede de gel devido ao resfriamento. Por outro lado, devido à hidrólise e digestão das proteínas do produto, a quantidade de hidratação aumenta com o aumento do tempo de armazenamento pois as proteínas que dão a textura desejada perdem suas propriedades e quebram sua ligação com a água; mudanças de pH também estão envolvidas porque desnaturam a estrutura da proteína. Devido à desnaturação da proteína, a água aderida foi liberada e, conseqüentemente, a sinérese aumentou (Jozve-Zargharabadi *et al.*, 2020).

No entanto, Ashna *et al.* (2022) mostraram que a secreção da fase aquosa diminui (e assim, o valor de CRA aumenta) durante o armazenamento refrigerado das amostras. Szajnar *et al.* (2014) também mostraram uma tendência de diminuição da sinérese com o aumento do tempo de armazenamento de iogurtes lácteos.

No entanto, deve-se notar que a estrutura do gel de proteína e, portanto, sua dureza também pode determinar o valor da CRA. Ashna *et al.* (2022) sugeriram que a sinérese e o valor de CRA podem ser devidos aos sólidos totais do iogurte que está sendo fermentado.

No estudo de Khan-Mohammadi *et al.* (2023), a taxa de sinérese nas amostras de iogurte probiótico foi maior do que na amostra controle, o que pode ser atribuído à maior acidez titulável (menor pH) dessas amostras segundo os autores.

#### 4.9. Efeito das culturas bioprotetoras na textura do iogurte – Fase II

De acordo com as Tabelas 14 a 17 (Figuras correspondentes no Apêndice A), os parâmetros da textura do iogurte (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) tiveram um comportamento semelhante, onde aumentaram significativamente durante o armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) durante 28 dias, com a exceção do iogurte H3 para todos os parâmetros e do iogurte F3 para os parâmetros coesividade e índice de viscosidade que não apresentaram variação significativa ( $p > 0,05$ ).

Tabela 14: Variação da firmeza (g-força) em função dos dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	22,2 $\pm$ 0,2 <sup>bB</sup>	25,6 $\pm$ 0,5 <sup>dA</sup>	24,5 $\pm$ 0,5 <sup>cA</sup>	22,5 $\pm$ 0,3 <sup>bB</sup>
7	23,1 $\pm$ 0,2 <sup>bC</sup>	25,6 $\pm$ 0,4 <sup>dB</sup>	27,7 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	24,6 $\pm$ 0,7 <sup>aB</sup>
14	23,2 $\pm$ 0,4 <sup>bC</sup>	29,6 $\pm$ 0,7 <sup>cA</sup>	27,3 $\pm$ 0,7 <sup>abB</sup>	24,3 $\pm$ 0,1 <sup>aC</sup>
21	22,7 $\pm$ 0,6 <sup>bD</sup>	33,3 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	26,3 $\pm$ 0,6 <sup>bB</sup>	24,6 $\pm$ 0,6 <sup>aC</sup>
28	25,0 $\pm$ 0,7 <sup>aB</sup>	31,4 $\pm$ 1,6 <sup>bA</sup>	24,7 $\pm$ 0,3 <sup>cB</sup>	24,9 $\pm$ 0,6 <sup>aB</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>12,8</b>	<b>22,3</b>	<b>0,7</b>	<b>10,6</b>

Tabela 15: Variação da consistência (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	461,7 $\pm$ 9,0 <sup>bC</sup>	564,5 $\pm$ 12,7 <sup>dA</sup>	517,3 $\pm$ 10,3 <sup>cB</sup>	471,9 $\pm$ 6,8 <sup>bC</sup>
7	488,6 $\pm$ 10,3 <sup>bC</sup>	544,9 $\pm$ 7,6 <sup>dB</sup>	612,7 $\pm$ 8,4 <sup>aA</sup>	508,0 $\pm$ 9,2 <sup>aC</sup>
14	487,2 $\pm$ 6,7 <sup>bD</sup>	649,5 $\pm$ 21,4 <sup>cA</sup>	578,8 $\pm$ 11,1 <sup>bB</sup>	528,3 $\pm$ 5,7 <sup>aC</sup>
21	470,4 $\pm$ 5,2 <sup>bC</sup>	738,4 $\pm$ 25,8 <sup>aA</sup>	545,6 $\pm$ 6,9 <sup>cB</sup>	532,5 $\pm$ 14,3 <sup>aB</sup>
28	529,4 $\pm$ 15,4 <sup>aB</sup>	685,6 $\pm$ 24,2 <sup>bA</sup>	524,6 $\pm$ 7,3 <sup>cB</sup>	524,4 $\pm$ 4,9 <sup>aB</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>14,7</b>	<b>21,5</b>	<b>1,4</b>	<b>11,1</b>

Tabela 16: Variação da coesividade (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	16,0 $\pm$ 0,7 <sup>bB</sup>	18,8 $\pm$ 0,7 <sup>cA</sup>	16,9 $\pm$ 0,2 <sup>bB</sup>	16,3 $\pm$ 0,3 <sup>aB</sup>
7	16,6 $\pm$ 0,5 <sup>abB</sup>	17,7 $\pm$ 0,3 <sup>cB</sup>	19,7 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	17,1 $\pm$ 0,4 <sup>aB</sup>
14	16,4 $\pm$ 0,6 <sup>abC</sup>	21,3 $\pm$ 1,2 <sup>bA</sup>	19,4 $\pm$ 0,4 <sup>aB</sup>	16,7 $\pm$ 0,4 <sup>aC</sup>
21	15,7 $\pm$ 0,6 <sup>bC</sup>	23,8 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	17,8 $\pm$ 0,7 <sup>bB</sup>	17,3 $\pm$ 0,5 <sup>aB</sup>
28	17,5 $\pm$ 0,3 <sup>bC</sup>	21,1 $\pm$ 0,7 <sup>bA</sup>	17,1 $\pm$ 0,2 <sup>bB</sup>	16,7 $\pm$ 0,4 <sup>aB</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>9,7</b>	<b>12,6</b>	<b>1,2</b>	<b>2,6</b>

**Nota:** a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

Tabela 17: Variação do índice de viscosidade (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase II.

DIAS	Controle1	Controle2	H3	F3
1	4,4±0,8 <sup>abB</sup>	11,4±2,9 <sup>cA</sup>	6,6±0,9 <sup>cB</sup>	4,7±0,5 <sup>aB</sup>
7	5,2±1,1 <sup>abC</sup>	9,9±0,9 <sup>cB</sup>	18,0±0,7 <sup>aA</sup>	6,7±0,7 <sup>aBC</sup>
14	4,6±0,3 <sup>abC</sup>	20,3±1,5 <sup>bA</sup>	13,0±1,8 <sup>bB</sup>	6,6±0,9 <sup>aC</sup>
21	3,2±1,2 <sup>bC</sup>	32,1±2,6 <sup>aA</sup>	8,3±1,1 <sup>cB</sup>	7,5±0,6 <sup>aB</sup>
28	7,6±1,2 <sup>aB</sup>	22,1±4,8 <sup>bA</sup>	6,9±0,4 <sup>cB</sup>	5,7±0,6 <sup>aB</sup>
<b>Variação (%)</b>	<b>71,6</b>	<b>94,6</b>	<b>5,0</b>	<b>22,0</b>

**Nota:** a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ ).

No tratamento estatístico desses parâmetros nas Tabelas 14 a 17, detalhados no Apêndice D, as letras a, b, c, d representam as diferenças significativas entre as médias dos parâmetros de textura em função dos dias de armazenamento ( $p < 0,05$ ) e as letras A, B, C representam as diferenças significativas entre as médias desses parâmetros de cada iogurte ( $p < 0,05$ ). No caso, se observou que ambos os fatores (tempo de armazenamento e tipo de iogurte) exerceram influência nesses parâmetros. No entanto, em todos os parâmetros de textura, a variação foi maior em função do tipo de iogurte tendo em vista que o valor da estatística do teste F foi maior para esse fator.

Nos experimentos contendo as culturas bioprotetoras comerciais H3 e F3, esses parâmetros se apresentaram significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que os observados no iogurte controle2 e não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte controle1 com 28 dias de armazenamento. Porém, o iogurte H3 (cultura HOLDBAC-YMB na dosagem 0,2%v/v), apresentou resultados elevados para estes parâmetros até os 7 dias de armazenamento, mas depois desse período, apresentou uma queda acentuada ao longo do tempo.

Estes resultados dos iogurtes com culturas bioconservantes apresentarem estes parâmetros da textura com valores abaixo do iogurte controle2 estão de acordo com a fase I, apesar dos valores mais altos apresentados pelo iogurte controle2 na fase II. Num estudo de Zhao e Liang (2022), que observaram que a firmeza dos iogurtes contendo a cultura bioprotetora *L. Plantarum MC5* foi menor que a do iogurte controle S. Portanto, a adição de *L. plantarum MC5* reduziu significativamente a firmeza das amostras de iogurte. Segundo esses autores, resultados semelhantes foram relatados por Bancalari *et al.* (2020), onde foi observado que a firmeza dos iogurtes feitos com culturas produtoras de EPS geralmente era menor do que a do iogurte de controle feito sem culturas iniciais produtoras de EPS.

Com a exceção do iogurte controle2, que apresentou valores bem mais elevados para os parâmetros de textura, a contaminação inicial do iogurte com  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de bolores e leveduras não influenciou significativamente a performance desses parâmetros nos iogurtes controle1, H3 e F3 conforme se pode observar nas Figuras 18 e 19 para a firmeza (g-força) e a consistência (g-seg),

respectivamente. Os parâmetros da coesividade (g-força) e índice de viscosidade (g-seg) apresentaram comportamentos semelhantes.

Figura 18: Comparação da firmeza (g-força) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.

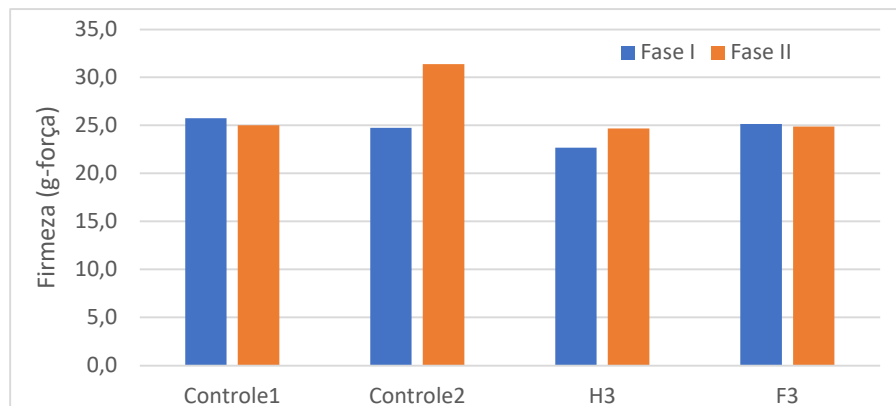
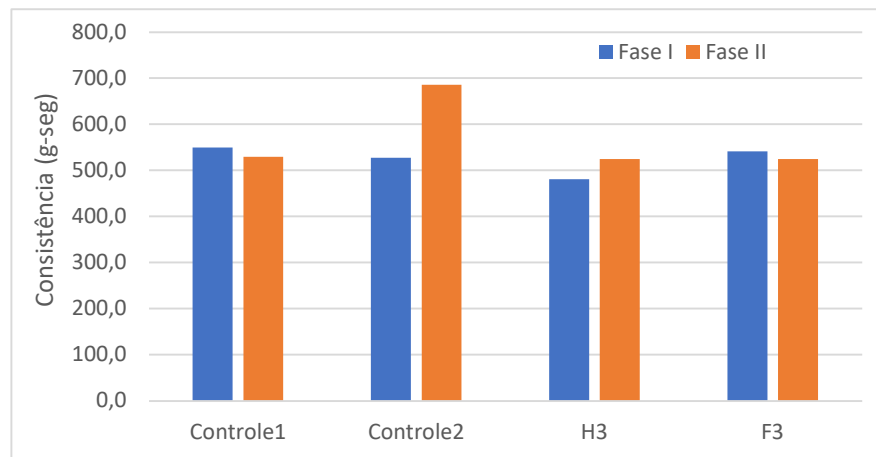


Figura 19: Comparação da consistência (g-seg) nas Fases I e II com 28 dias de armazenamento.



É relatado na literatura que a contaminação por leveduras, como ocorreu com o iogurte controle2, pode alterar os parâmetros reológicos e de textura dos iogurtes. Por exemplo, segundo Álvarez-Martín *et al.* (2008), o crescimento excessivo de certas leveduras em produtos lácteos pode levar a formação de gases, sabores e odores desagradáveis, despigmentações, modificações na textura, viscosidade, formação de limo e sedimentos, e crescimento superficial, como *D. hansenii* e *C. edax*.

Embora os produtos lácteos fermentados sejam considerados fermentações predominantemente lácticas, a coocorrência frequente de leveduras e LAB levou à sugestão de que podem ocorrer interações que podem influenciar as características e a qualidade do produto (Narvhus e Gadaga, 2003). No entanto, os mecanismos de possível interação entre leveduras e as culturas lácteas não foram amplamente estudados. Tal interação pode ser estimulação ou inibição do crescimento de uma, ou ambas, das cepas cocultivadas (Viljoen, 2001). Os organismos cocultivados podem competir por nutrientes de crescimento ou podem produzir produtos metabólicos que inibem

o crescimento uns dos outros. As leveduras podem produzir vitaminas que aumentam o crescimento das LAB. Além disso, a influência mútua dos microrganismos no metabolismo uns dos outros pode levar a diferentes perfis de compostos organolepticamente importantes no leite fermentado (Narvhus e Gadaga, 2003). Para um melhor entendimento do efeito dessas leveduras e bolores sobre os parâmetros do iogurte é preciso uma análise microbiológica mais específica para caracterizar e quantificar as espécies presentes.

#### 4.10. Teste de Desafio das culturas bioprotetoras na inibição de bolores e leveduras – Fase II.

Para melhor avaliar o crescimento de bolores e leveduras em iogurtes formulados com e sem culturas bioprotetoras, na fase II, os iogurtes foram contaminados intencionalmente com bolores e leveduras numa concentração de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte após a etapa de resfriamento a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sendo depois realizadas análises desses microrganismos com 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento em câmara fria a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . Todas as análises de bolores e leveduras demonstradas na Tabela 18 a seguir e nas placas do Apêndice C também foram realizadas com uma diluição ( $10^{-1}$ ) das amostras de iogurte.

Ao contrário do que ocorreu na fase I, em que não foi realizada a contaminação inicial dos iogurtes, a partir dos 7 dias já houve considerável contagem de bolores e leveduras, principalmente para o iogurte controle2 (sem conservante químico e bioconservantes) que apresentou uma contagem de 660 UFC/mL, acima do padrão. Com 14 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras H3 e F3 apresentaram contagem de bolores e leveduras de 150 UFC/mL e 50 UFC/mL, respectivamente, dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira.

Tabela 18: Concentração de bolores/leveduras (UFC/mL) em função dos dias de validade – Fase II.

<b>DIAS</b>	<b>Controle1</b>	<b>Controle2</b>	<b>H3</b>	<b>F3</b>
1	20	ausente	ausente	20
7	10	660	ausente	30
14	20	11.500	150	50
21	30	incontável	20	1.720
28	30	incontável	ausente	3.600

Com 14 dias de armazenamento, o iogurte controle2 apresentou elevada contagem de bolores e leveduras de 11.500 UFC/mL, excedendo o padrão da legislação brasileira de 200 UFC/mL. A partir do dia 21, esse iogurte apresentou supercrescimento de leveduras, incontáveis na diluição  $10^{-1}$  após 21 e 28 dias de armazenamento (placas do Apêndice C). No iogurte controle1, que contém o conservante químico sorbato de potássio na concentração máxima de 0,03g/100g, menor formação de fungos ou leveduras foi detectada durante todo o período de armazenamento de 28 dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ .



Porém, com 7, 14 e 21 dias ocorreu a formação de uma “aglutinação de colônias” ou de uma “super colônia” (placas do Apêndice C), fenômeno não observado nos demais iogurtes.

Com relação aos iogurtes contendo as culturas bioprotetoras na dosagem de 0,2%v/v, sem conservante químico, o iogurte F3 (*L. rhamnosus*) apresentou uma elevada contaminação por bolores e leveduras com 21 e 28 dias de armazenamento onde se observou contagens de 1.720 UFC/mL e 3.600 UFC/mL, respectivamente. No entanto, o iogurte H3 em que se usou a dosagem dobrada de HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) apresentou presença de bolores e leveduras abaixo do padrão estabelecido pela legislação brasileira para o iogurte (200 UFC/mL) durante os 28 dias de armazenamento (placas do Apêndice C).

De uma forma geral, pode-se afirmar que, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 18 no período estudado de 1 a 28 dias, os experimentos de iogurtes contendo as culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) e FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) tiveram um desempenho muito bom na inibição de bolores e leveduras mesmo com a contaminação inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g, principalmente no iogurte H3 que usou a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC-YMB na dosagem de 0,2%v/v. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo de desafio da fase II com bioconservantes sem o uso do conservante químico, confirmam os resultados da fase I e são igualmente muito importantes para futuras pesquisas em escalas piloto e industrial.

Vários estudos na literatura explicam os mecanismos pelos quais as culturas bioprotetoras inibem os bolores e leveduras. Muitos deles afirmam que para uma determinada cultura bioprotetora apresentar efeito antifúngico satisfatório, é necessário que a mesma tenha uma concentração mínima no iogurte. Certamente foi o que ocorreu na presente pesquisa quando se dobrou a dosagem dos bioconseqvantes de 0,1%v/v para 0,2%v/v, a quantidade de culturas viáveis aumentou ao longo do armazenamento, conseqventemente, houve produção de metabólitos antifúngicos em maior concentração e isso inibiu mais os bolores e leveduras. Vale ressaltar também que as culturas bioprotetoras devem ser ativas na menor concentração possível para serem aceitáveis do ponto de vista econômico. Seria, portanto, de interesse avaliar a taxa de inóculo ideal para as cepas mais ativas e garantir que elas não tenham nenhum impacto nas propriedades organolépticas do iogurte (Lačanin *et al.*, 2017).

Por exemplo, em outro estudo de desafio realizado por Delavenne *et al.* (2015), em que variou a concentração de uma espécie de levedura, se verificou que uma contaminação inicial de 100 ou 1000 células de *Y. lipolytica* não afetou nenhuma das respostas estudadas, incluindo as concentrações finais de *Y. lipolytica*. No entanto, a concentração final das culturas lácteas iniciais (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) pode ser alterada pela cultura bioprotetora *L.*

*rhamnosus*. Quando *L. rhamnosus* K.C8.3.II foi inoculado, o nível populacional final de *S. thermophilus* aumentou significativamente (valor  $P < 0,001$ ), enquanto o nível populacional final de *L. bulgaricus* diminuiu quando *L. rhamnosus* K.C8.3.II ou *L. harbinensis* K.V9.3.INp foram inoculados.

Segundo esse mesmo estudo, após 6 semanas de armazenamento a 10°C, *Y. lipolytica* cresceu (com uma concentração máxima de 8,8 log<sub>10</sub> UFC/g) apenas em iogurtes inoculados com menos de  $5 \times 10^6$  UFC/mL de *L. harbinensis* K.V9.3.INp. Portanto, a taxa de inoculação inibitória mínima de *L. harbinensis* K.V9.3.INp que permitiu uma inibição de *Y. lipolytica* foi compreendida entre  $1 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$  UFC/mL. Além disso, quaisquer que sejam as taxas iniciais de inoculação de *L. harbinensis* K.V9.3.INp, não houve diferenças no pH dos iogurtes após a fermentação e durante o armazenamento (DP de pH médio  $\leq 0,1$ ) como já observado (Delavenne *et al.*, 2013). Isso sugere que as modificações do pH não foram responsáveis pelo efeito inibitório e que a atividade antifúngica de *L. harbinensis* K.V9.3.INp foi dependente da taxa de inoculação inicial ou da população atingida no estágio em que ocorreu a contaminação com *Y. lipolytica*.

No estudo de Delavenne *et al.* (2015), a inibição total de *Y. lipolytica* ocorreu apenas quando a população de *L. harbinensis* K.V9.3.INp estava acima de  $5 \times 10^6$  UFC/mL de iogurte sendo esta suficiente para produzir uma inibição total de *Y. lipolytica* durante um período de armazenamento de 6 semanas a 10°C.

Num estudo similar realizado por Lačanin *et al.* (2017), eles verificaram que a taxa de inóculo de  $10^7$  UFC/ml das culturas bioprotetoras aumentou a atividade antifúngica contra *R. mucilaginosa* e *P. brevicompactum* em comparação com a observada a  $10^5$  UFC/ml. Ou seja, quando se aumentou a dosagem das culturas bioprotetoras nesse estudo, houve uma inibição bem mais significativa. De fato, um atraso de crescimento de 4 semanas de *R. mucilaginosa* foi observado para *L. rhamnosus* BIOIII28 e *L. paracasei* SYR90 com  $10^7$  UFC/ml de taxa de inóculo. Pois quando esses autores usaram uma taxa de inóculo de  $10^5$  UFC/ml, efeitos antifúngicos limitados de *L. paracasei* SYR90 e *L. rhamnosus* BIOIII28 foram observados com crescimento apenas ligeiramente retardado de espécies de levedura, enquanto apenas a inibição total de *P. brevicompactum* foi alcançada por mais uma semana em comparação com o controle ao usar *L. rhamnosus* BIOIII28. No entanto, nenhuma das culturas antifúngicas testadas foi capaz de impedir totalmente o crescimento de todos os bolores e leveduras visados.

No estudo realizado por Lačanin *et al.* (2017), independentemente das cepas antifúngicas, uma taxa de inoculação de  $10^5$  UFC/mL rendeu atividades antifúngicas menores do que a taxa de  $10^7$  UFC/mL nas condições testadas. Segundo esses autores, não é a primeira vez que se mostra que a taxa de inoculação de culturas bioprotetoras tem um efeito importante na atividade antifúngica. Em

outros estudos, verificou-se que uma inoculação de *L. plantarum* a  $10^8$  UFC/mL no leite era necessária para obter um efeito fungistático contra *Rhodotorula mucilaginosa* durante o armazenamento do iogurte a 4°C por 4 semanas (Crowley *et al.*, 2012). E que  $\sim 4 \times 10^7$  UFC/mL de *L. casei* AST18 permitiu inibir o crescimento de um *Penicillium* *ssp.* isolado durante o armazenamento do iogurte a 4°C por 22 dias (Li *et al.*, 2013).

A inoculação no leite a  $5 \times 10^6$  UFC/mL foi suficiente para inibir as cepas de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Penicillium brevicompactum* e *Rhodotorula mucilaginosa*, indicando que os compostos antifúngicos produzidos por *L. harbinensis* K.V9.3.1Np possui um grande espectro de atividade (Delavenne *et al.*, 2013). Outros estudos de Suomalainen & Mäyrä-Makinen (1999) e Schwenninger & Meile (2004) mostraram que números iniciais de células de  $10^7 - 10^8$  UFC/ml de *L. rhamnosus* cepa LC705 e *L. paracasei subsp. paracasei* inibiu totalmente o crescimento fúngico por 4 semanas. Pode ser perigoso comparar os resultados obtidos em estudos anteriores com o presente estudo, porque diferentes cepas de bolores e leveduras foram usadas em cada experimento. Além disso, o período de armazenamento do iogurte e a temperatura de armazenamento muitas vezes não foram semelhantes ao presente estudo, o que pode influenciar significativamente o crescimento fúngico e a atividade antifúngica de cepas bacterianas.

Segundo Lačanin *et al.* (2017), o fato da atividade antifúngica ter diminuído com um inóculo menor provavelmente indica que os compostos antifúngicos secretados por *L. paracasei* SYR90, *L. plantarum* OVI e *L. rhamnosus* BIOIII28 não estavam em concentrações suficientes para exercer qualquer atividade antifúngica observável. A atividade antifúngica da LAB pode ser geralmente atribuída à produção de compostos de baixo peso molecular, compostos proteicos, peptídeos e ácidos orgânicos, incluindo ácidos graxos hidroxila (Muhialdin *et al.*, 2016; Varsha e Nampoothiri, 2016). Vários metabólitos antifúngicos mostraram ser produzidos em baixas quantidades (até 7 mM), como ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, ácido 3-fenilático, ácido hidroxifenilático e ácido succínico (Schwenninger *et al.*, 2008), que não atingiram a concentração mínima necessária para a inibição do crescimento fúngico. Assim, a atividade antifúngica da LAB resulta do efeito sinérgico entre vários compostos, que é potencializado por seus produtos finais de fermentação, como lactato e acetato, que são produzidos em concentrações g/L (Belguesmia *et al.*, 2014).

Schnurer e Magnusson (2005) revelaram que três mecanismos podem explicar a eficiência antifúngica e antimicrobiana das LAB: a produção de vários ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, a competição por nutrientes e a produção de compostos antagonistas. Os compostos antifúngicos isolados de culturas de fermentação LAB são principalmente metabólitos de baixa massa molecular, esses compostos são ácidos lácticos, ácido acético, ácido fenilático (Gerez *et al.*, 2009;

Lavermicocca *et al.*, 2000; Magnusson *et al.*, 2003), ácido propiônico e proteico (Lavermicocca *et al.*, 2003).

Em outro estudo de desafio realizado por Buehler *et al.* (2018) indicou que as 2 culturas bioprotetoras disponíveis comercialmente inibiram o crescimento controlado de bolores na superfície, mas não o crescimento de leveduras ao longo de 76 dias de vida útil do iogurte a 7°C. Segundo esse estudo, em iogurtes formulados sem culturas bioprotetoras, o crescimento de bolores na superfície era visível com 23 dias de armazenamento. Para desenvolver um protocolo de estudo de desafio, Buehler *et al.* (2018) inocularam iogurte grego, formulado com e sem culturas protetoras, com um coquetel de leveduras e bolores (contendo 5 cepas de leveduras e uma de bolor) nas concentrações finais de  $10^1$  e  $10^3$  UFC/g de iogurte.

Quando incubado a uma temperatura de 7°C, o iogurte sem culturas bioprotetoras inoculado com  $10^1$  UFC/g de levedura e bolor apresentou números médios totais de leveduras e bolores de 4,7 log<sub>10</sub> UFC/g no dia 9, com números entre 4,9 e 6,5 log<sub>10</sub> UFC/g observados nos dias 23, 60 e 76. Do ponto de vista prático, a deterioração de bolores e leveduras no iogurte é perceptível quando as contagens atingem  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g (Suriyarachchi e Fleet, 1981); portanto, nesse modelo, o iogurte grego no estudo de Buehler *et al.* (2018) atingiu níveis de deterioração de levedura e bolor com 23 dias de armazenamento a 7°C. Ainda segundo este estudo, para as formulações de iogurte grego inoculados com  $10^3$  UFC/g de iogurte, o crescimento para os níveis de deterioração ( $10^5$ - $10^6$  UFC/g) ocorreu no dia 9 a uma temperatura de armazenamento de 7°C. Por isso, optou-se por uma contaminação de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte no teste de desafio da presente pesquisa realizada na fase II.

Nesse mesmo estudo, os pesquisadores observaram que, para iogurtes formulados sem culturas bioprotetoras, o crescimento de bolores visíveis na superfície para iogurtes inoculados com  $10^1$  UFC/g de iogurte ocorreu com 23 dias de armazenamento a 7°C, enquanto iogurtes formulados com culturas bioprotetoras, em todos os níveis de uso (ou seja, 90, 95 e 100% da concentração recomendada pelo fabricante), apenas apresentaram crescimento de levedura ao longo de todo o prazo de armazenamento de 76 dias e, portanto, não houve crescimento visível de bolores. Na presente pesquisa, o crescimento de bolores e leveduras nas placas com um meio de cultura mais favorável ao crescimento desses microrganismos para o iogurte controle<sup>2</sup> sem culturas bioprotetoras se deu a partir dos 7 dias e no iogurte H3 com a cultura comercial HOLDBAC-YMB não houve crescimento de bolores e leveduras nas placas com 28 dias.

Buehler *et al.* (2018) concluíram que nas suas medições de tempo para crescimento visível, as 2 culturas bioprotetoras, em todos os níveis de uso avaliados, foram eficazes na inibição do crescimento de bolor micelial na superfície do iogurte. Nesse estudo, os autores sugerem, portanto,

que as culturas bioprotetoras protegeram o iogurte grego mais contra bolores do que contra as leveduras.

Em outro teste de desafio realizado por Li *et al.* (2013), a adição de *L. casei* AST18 inibiu completamente o crescimento de *Penicillium* sp. a 4 °C. Os testes de desafio também mostraram que *L. casei* AST18 inibiu o crescimento de outros bolores e leveduras corruptores. Esses bolores e leveduras, como espécies de *Penicillium*, *Candida famata* e *K. Marxianus*, ocorrem regularmente em iogurte e produtos lácteos (Fleet, 1990). Em testes acelerados de prova de bolores a 30°C, *Penicillium* sp. cresceu nos grupos em branco e adicionados de *L. casei* AST18, mas uma diferença significativa nas condições de crescimento de *Penicillium* sp. foi encontrada: a morfologia da colônia de *Penicillium* sp. em 2% de iogurte adicionado de AST18 foi pequena e nenhum metabólito verde-amarelo foi produzido. Muitos pesquisadores relataram que a LAB pode inibir a produção de micotoxinas (Dalie *et al.*, 2010).

Schwenninger *et al.* (2008) demonstraram que a combinação de *Lac. paracasei* subsp. *paracasei* SM20 e *Propionibacterium jensenii* aumentou a produção de ácido acético e ácido propiônico, mas diminuiu a concentração de lactato. Foi levantada a hipótese de que o lactato foi consumido pela combinação. Em particular, as propionibactérias podem aumentar o período de armazenamento de produtos alimentícios fermentados graças aos seus componentes antimicrobianos.

Segundo Khan-Mohammadi *et al.* (2023), a inoculação de *L. rhamnosus* (10<sup>6</sup> UFC/mL) reduziu a contagem de *P. expansum* durante o tempo de armazenamento do iogurte. No geral, os resultados indicaram que *L. rhamnosus* melhorou o crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. No entanto, devido ao fato de que nesta amostra o escore geral de aceitabilidade e a viscosidade diminuíram, a sinérese aumentou e o crescimento do mofo não parou completamente, Khan-Mohammadi *et al.* (2023) concluíram que *L. rhamnosus* (10<sup>6</sup> UFC/mL) não pode ser usado sozinho como conservante natural em iogurte para prevenir o crescimento de bolores e leveduras e aumentar o prazo de validade.

No entanto, num estudo de Liang *et al.* (2022), a atividade inibitória foi avaliada em iogurte que foi desafiado com *Saccharomyces bayanus* SCPa01, *Candida sake* CDS01 e *Torulaspota delbrueckii* TOD01. Nessa pesquisa, durante 12 dias de armazenamento a 10°C, *Lc. rhamnosus* FUA3185 e *Lc. paracasei* FUA3186 inibiram significativamente o crescimento de *S. bayanus*, enquanto *L. plantarum* não apresentou efeitos inibitórios. Nenhuma das cepas inibiu o crescimento das leveduras de *T. delbrueckii* e *C. sake* nesse período a 10°C. Os autores também estudaram a inibição de *S. bayanu* e *C. sake* após a fermentação a 30°C e durante o armazenamento a 25°C. Nessas condições, todas as culturas adjuntas inibiram o crescimento de *S. bayanus* nos dias 1, 2 e 3, enquanto *L. plantarum* LP023 inibiu o crescimento de *C. sake*. Nenhuma das cepas adjuntas antifúngicas

inibiu ou atrasou o crescimento das leveduras por mais de 3 dias. No geral, esses resultados indicam que a atividade inibitória contra leveduras é mais fraca do que a atividade inibitória contra bolores, resultado semelhante foi encontrado nessa pesquisa. Os mecanismos de atividade diferiram entre as cepas dos gêneros estudados com produção de diacetil e depleção de manganês, formação de ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa e formação de acetato como principais contribuintes para a atividade antifúngica (Liang *et al.*, 2022).

Na pesquisa de Xu *et al.* (2021) em que foi avaliado a atividade antifúngica de bactérias lácticas, eficácia e aplicabilidade das culturas bioprotetoras escolhidas contra bolores e leveduras estragadores em produtos lácteos, nove cepas de *L. plantarum*, três de *L. paracasei*, uma de *Enterococcus faecium* e uma de *L. rhamnosus* foram preliminarmente triadas por testes *in vitro* contra os fungos *Pichia pastoris D3*, *Aspergillus niger D1*, *Geotrichum candidum N1*, *Kluyveromyces marxianus W1* e *Penicillium chrysogenum B1* e depois validadas por testes de desafio em iogurte e comparadas também com o conservante químico ácido benzóico. De todas estas LABs usadas nesse estudo, o efeito inibidor da suspensão de *L. plantarum N7* a 3% no crescimento do fungo foi o melhor, e o segundo foi o conservante químico ácido benzóico a 0,15%. Segundo os autores, considerando o efeito inibidor do ácido benzóico sobre LAB, a melhor formulação de bebida láctea, de acordo com as propriedades sensoriais e características químicas e microbianas, foi a amostra com 3% de *L. plantarum N7*.

Enfim, no estudo de Fayyaz *et al.* (2020), que analisou a atividade antifúngica de combinações binárias e ternárias de três bactérias lácticas (LAB) contra cinco leveduras deteriorantes em iogurte, a atividade inibitória de LAB mostrou uma barreira eficiente contra todas as cinco leveduras, na qual a maior atividade foi registrada para *L. reuteri* seguido por *L. acidophilus*. Por outro lado, a levedura mais resistente foi *Kluyveromyces marxianus* seguida de *Rhodotorula mucilaginosa*. Segundo os autores, a inoculação de culturas de LAB em iogurte a 5% (v/v) não só pode melhorar as propriedades físico-químicas e sensoriais do iogurte, mas também pode introduzir uma estratégia de substituição de conservantes químicos por agentes de biocontrole.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo da fase I chegou as seguintes conclusões:

- As culturas bioprotetoras comerciais utilizadas neste estudo diminuíram o tempo de fermentação em relação ao iogurte controle1 (conservante químico) e principalmente em relação ao iogurte controle2 (sem conservante químico e bioconservantes);
- O pH do iogurte controle2 foi mais alto do que os experimentos com as culturas bioprotetoras comerciais e do que o iogurte controle1 principalmente com os 28 dias de armazenamento, com a exceção apenas do iogurte H3;
- A adição das culturas bioprotetoras comerciais aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a acidez titulável (%) em relação ao iogurte controle2 que contém apenas as culturas iniciais, sem conservante químico e bioconservantes, no período estudado de 28 dias. Além disso, a acidez titulável (%) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) no decorrer do tempo de armazenamento para todos os iogurtes;
- A viscosidade de todos os experimentos oscilou durante os 28 dias de armazenamento a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . Nos iogurtes contendo culturas bioprotetoras, principalmente a série H, a viscosidade se comportou significativamente mais alta ( $p < 0,05$ ) do que a dos iogurtes controle1 e controle2 contendo apenas as culturas iniciais;
- As culturas bioprotetoras diminuíram a sinérese significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao iogurte controle2 e não teve variação significativa em relação ao iogurte controle1 ( $p > 0,05$ );
- As culturas bioprotetoras comerciais diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) os parâmetros da textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) em relação aos iogurtes controle1 e controle2, com a exceção dos iogurtes F3 e H1;
- Quando se dobrou a dosagem da cultura bioprotetora FreshQ-11 para 0,2%v/v (iogurte F3), houve um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) da sinérese e dos parâmetros de textura durante o tempo de armazenamento em relação aos iogurtes que usaram essa mesma cultura na dosagem de 0,1%v/v (iogurte F1 e F2). Um comportamento inverso foi observado quando se dobrou a dosagem da cultura HOLDBAC-YMB para 0,2%v/v (iogurte H3), ou seja, houve uma diminuição significativa ( $p > 0,05$ ) desses parâmetros;
- Os resultados obtidos na inibição fúngica na fase I tanto quando se reduziu a concentração do conservante químico pela metade (0,015%) e usou 0,1%v/v das culturas bioprotetoras (H1 e F1) ou quando se dobrou essa dosagem para 0,2%v/v sem o uso do conservante químico, são muito importantes e promissores para futuras pesquisas em escalas piloto e industrial, pois esses experimentos tiveram um desempenho semelhante ao iogurte controle1 na inibição de bolores e

leveduras, principalmente quando se usou a cultura comercial F (*L. rhamnosus*) na dosagem 0,2%v/v (iogurte F3) que teve a mesma inibição do iogurte controle1 com 0,03g/100g de sorbato de potássio.

Com relação a fase II, chegou-se as seguintes conclusões:

- A contaminação inicial do iogurte com uma concentração de bolores e leveduras de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g alterou o comportamento do pH no período estudado, tendo em vista que na fase II, o pH com 28 dias de validade foi menor para todos os iogurtes estudados;
- No caso da acidez titulável (%), na fase II, observou-se uma leve diminuição nos iogurtes controle1 e H3 e um aumento considerável nos iogurtes controle2 e F3;
- Com a exceção do iogurte controle2 que teve uma forte queda, a contaminação inicial de bolores e leveduras contribuiu com o aumento da sinérese dos iogurtes controle1 e H3 e praticamente não teve efeito no iogurte F3 em relação a fase I;
- Com a exceção do iogurte controle2, que apresentou valores bem mais elevados para os parâmetros de textura, a contaminação inicial do iogurte com  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de bolores e leveduras não influenciou significativamente a performance desses parâmetros nos iogurtes controle1, H3 e F3;
- De uma forma geral, pode-se afirmar que os experimentos de iogurtes contendo as duas culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB e FRESHQ-11 tiveram um desempenho muito bom na inibição de bolores e leveduras mesmo com a contaminação inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte, principalmente no iogurte H3 que usou a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC-YMB na dosagem de 0,2%v/v. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo de desafio da fase II com bioconservantes sem o uso do conservante químico, confirmam os resultados da fase I e são igualmente muito importantes para futuras pesquisas em escalas piloto e industrial;
- Portanto, devido a todas essas conclusões, o iogurte H3 contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB (*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) na dosagem 0,2% foi que apresentou o melhor resultado nessa pesquisa.



## 6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, temos as seguintes perspectivas:

- Estudar o efeito da cultura comercial SHIELD HpH (*L. plantarum* subsp. *Plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* subsp. *paracasei*) ou de outra cultura comercial contendo a *L. plantarum*;
- Fazer um estudo da inibição fúngica diminuindo ainda mais a concentração do conservante químico sorbato de potássio para 25% da concentração máxima, ou seja, 0,0075% combinado com alguma cultura bioprotetora na dosagem de 0,1%v/v;
- Realizar os experimentos da Tabela 01 formulando o iogurte com leite em pó reconstituído para comparar o desempenho das culturas bioprotetoras em relação ao leite pasteurizado;
- Estudar o efeito da temperatura de fermentação variando de 38°C a 42°C sobre a acidez titulável (%), propriedades reológicas, textura e microbiológicas do iogurte formulado com as culturas bioprotetoras comerciais HOLDBAC-YMB e FRESHQ-11;
- Fazer um estudo das propriedades antifúngicas, físico-químicas, reológicas e textura do iogurte aumentando o tempo de fermentação e diminuindo o pH do ponto para 4,6;
- Realizar um estudo envolvendo análises direcionadas da produção de EPS para confirmar esses efeitos nas cepas específicas usadas neste estudo;
- Fazer um estudo da quantidade de culturas bioprotetoras viáveis (UFC/g) em função da dosagem inicial e do tempo de armazenamento;
- Estudar o efeito dessas culturas bioprotetoras comerciais de melhor inibição fúngica sobre as propriedades sensoriais do iogurte;
- Estudar o desempenho das culturas bioprotetoras na dosagem de 0,2%v/v sem o uso do conservante químico em escala piloto e escala industrial;
- Realizar um estudo dos custos de acordo com a dosagem das culturas bioprotetoras e formulação com leite pasteurizado / leite em pó reconstituído verificando o melhor custo/benefício.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, Y.; CASILLO, A.; GHARSALLAH, H. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Biol. Macromol.**, 108, 719–728, 2018.

ACEVEDO-FANI, A.; OCHOA-GRIMALDO, A.; LOVEDAY, S.; SINGH, H. Digestive dynamics of yoghurt structure impacting the release and bioaccessibility of the flavonoid rutin. **Food Hydrocoll** 111:106215, 2021.

AKAN, E. The effect of fermentation time and yogurt bacteria on the physicochemical, microbiological and antioxidant properties of probiotic goat yogurts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 94: 1-16, 2022.

ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; FLÓREZ, A. B.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A.; MAYO, B. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, New York, v. 19, n. 1, p. 62-70, 2008.

ALZAMILY, I. A. Isolation and Diagnosis of Filamentous Fungi from Dairy Products and Detection their Toxicity. **Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology**, 8 (2), 1-10, 2022.

AMANI, E.; ESKANDARI, M. H. ; SHEKARFOROUSH, S. The effect of proteolytic activity of starter cultures on technologically important properties of yogurt. **Food Science & Nutrition** 5, 525–537. <https://doi.org/10.1002/fsn3.427>, 2017

ANNA, L.; ROSSANA, C.; MARCO, M. Use of selected lactic acid bacteria and quinoa flour for manufacturing novel yogurt-like beverages. **Foods** 7, 51, 2018.

ARENA, M. P.; SILVAIN, A.; NORMANNO, G.; GRIECO, F.; DRIDER, D.; SPANO, G. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. **Front. Microbiol.** 7:464. doi: 10.3389/fmicb.2016.00464, 2016.

ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D.; KORSTEN, L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biol. Control**. 53, 122–128, 2010.

ARYANA, K. J. e OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. **J. Dairy Sci.**, 100, 9987–10013, 2017.

ASHNA, T.; ABDULQADER, R.; QADER, S.; SEBO, N.H. The Effect of Soymilk Addition on Chemical, Physical and Sensorial Properties of Cow Milk Yogurt. **Polytechnic. J.**, 12, 30–39, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação e alimentos**: consolidação das mesmas e padrões de alimentos. São Paulo, 2003. p. 376–382. v. 1/A: Atos do Ministério da Saúde. Revisão 9.

ATANASSOVA, M.; CHOISSET, Y.; DALGALARRONDO, M. J.; CHOBERT, M.; DOUSSET, X.; IVANOVA, I.; HAERTLÉ, T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 12, p. 63–73, 2003.

AUNSBJERG, S. D.; HONORÉ, A. H.; MARCUSSEN, J.; EBRAHIMI, P.; VOGENSEN, F. K.; BENFELDT, C.. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. **Int. J. Food Microbiol.** 194, 46–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007, 2015a.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances** 29, 54–66, 2011.

BAN, Q.; SUN, X.; JIANG, Y.; CHENG, J.; GUO, M. Effect of synbiotic yogurt fortified with monk fruit extract on hepatic lipid biomarkers and metabolism in rats with type 2 diabetes. **J Dairy Sci** 105:3758–3769, 2022.

BANCALARI, E.; ALINOVI, M.; BOTTARI, B.; CALIGIANI, A.; MUCCHETTI, G.; GATTI, M. Ability of a wild *Weissella* strain to modify viscosity of fermented milk. **Front. Microbiol**, 10, 3086–3094, 2020.

BEAL, C., SKOKANOVA, J., LATRILLE, E., MARTIN, N., & CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, 82(4), 673–681, 1999.

BELETSIOTIS, E.; GUIKAS, D.; KALANTZI, K. Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: A case study. **Proc. Food Sci.**, v. 1, p. 1051–1059, 2011.

BELGUESMIA, Y.; RABESONA, H.; MOUNIER, J.; PAWTOWSKY, A.; LE BLAY, G.; BARBIER, G.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M. Characterization of antifungal organic acids

produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np immobilized in gellan-xanthan beds during batch fermentation. **Food Control** 36:205–211, 2014.

BELTRN-BARRIENTOS, L.M.; HERNNDEZ-MENDOZA, A.; TORRES-LLANEZ, M.J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. **J. Dairy Sci.**, 99, 4099–4110, 2016.

BEUSCHEL, B. C.; CULBERTSON, J. D.; PARTRIDGE, J. A. and SMITH, D. M. Gelation and Emulsification Properties of Partially Insolubilized Whey Protein Concentrates. **Journal of Food Science**, 57: 605-609, 1992.

BIBI, A.; XIONG, Y.; RAJOKA, M.S.R.; MEHWISH, H.M.; RADICETTI, E.; UMAIR, M.; SHOUKAT, M.; KHAN, M.K.I.; AADIL, R.M. Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry: A Review. **Sustainability** 13, 12429, 2021. <https://doi.org/10.3390/su132212429>

BOKULICH, N. A.; AND MILLS, D. A. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 79:5214–5223, 2013.

BOTHA, A. AND BOTES, A. “Mucor,” in Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edn. eds C. Batt and M. Tortorello (Cambridge, MA: Academic Press), 834–840, 2014.

BOTHA, A. AND DU PREEZ, J. C.. “Mucor,” in Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edn, eds R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel (San Diego, CA: Academic Press), 1493–1500, 1999.

BOUGLE, D.; ROLAND, N.; LEBEURRIER, F.; ARHAN, P. Effect of propionibacteria supplementation on faecal bifidobacteria and segmental colonic transit time in healthy human subjects. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 34 144–148, 1999.

BOURNE, M. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. **Food science and technology international series**. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - Secretaria de Defesa Animal - Departamento Nacional de Defesa Animal - Coordenação Geral de Laboratório Animal - Instrução Normativa Nº 68, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento-Secretaria de Defesa Animal - Departamento Nacional de Defesa Animal - Coordenação Geral de Laboratório Animal - Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 19 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite fermentado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 de outubro de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em julho, 2008. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de novembro de 2018.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, Chichester, v. 23, n. 6, p. 415-437, 2006.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; SILVA, M. R.; SOUZA, G. N. Crioscopia. **Embrapa Gado de Leite**. Site: [https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado\\_de\\_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/crioscopia#:~:text=O%20%C3%ADndice%20criosc%C3%B3pico%20ou%20crioscopia,brasileira%20%C3%A9%20E2%80%93%20C512oC.](https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/testes-de-qualidade/crioscopia#:~:text=O%20%C3%ADndice%20criosc%C3%B3pico%20ou%20crioscopia,brasileira%20%C3%A9%20E2%80%93%20C512oC.,), 2021.

BUEHLER, A. J.; EVANOWSKI, R. L.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. *J. Dairy Sci.* 100, 8814–8825. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12635> , 2017.

BUEHLER, A. J.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model. *J. Dairy Sci.* 101, 10759–10774. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15082> , 2018.

BUKHARI, S. A.; SALMAN, M.; NUMAN, M.; JAVED, M. R.; ZUBAIR, M.; MUSTAFA, G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. **Mol. Biol. Rep.** 47, 1871–1881, 2020.

BULDO P.; BENFELDT, C.; FOLKENBERG, D. M.; JENSEN, H. B.; AMIGO, J. M.; SIEUWERTS, S.; THYGESEN, K.; VAN DEN BERG, F.; IPSEN, R. The role of exopolysaccharide-producing cultures and whey protein ingredients in yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, 72:189-198, 2016.

CAO, H.; MENG, D.; ZHANG, W.; YE, T.; YUAN, M.; YU, J.; WU, X.; LI, Y.; YIN, F.; FU, C. Growth inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification by lactic acid bacteria and their application in sourdough bread. **Int. J. Food Sci. Tech.** 56, 2304–2314, 2021.

CAPELA, P., HAY, T., SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International** 39 (2), 203-211, 2006.

CHAMLAGAIN B., DEPTULA P., EDELMANN M., KARILUOTO S., GRATTEPANACHE F., LACROIX C., VARMANEN P. AND PIIRONEN V. Effect of the lower ligand precursors on vitamin B12 production by foodgrade Propionibacteria. **LWT - Food Science and Technology** 72 117–124, 2016.

CHAMPAGNE C. P.; CRUZ A. G.; DAGA M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science** 22 160–166, 2018.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio. v. 2, p. 785, 2005.

CHO, W. Y.; KIM, D. H.; LEE, H. J.; YEON, S. J.; LEE, C. H. Quality characteristic and antioxidant activity of yoghurt containing olive leaf hot water extract. **CyTA Journal of Food** 18 (1), 43-50, 2020.

CORDEIRO M. A.; SOUZA E. L. S.; ARANTES R. M. E. Fermented whey dairy beverage offers protection against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium infection in mice. **Journal of Dairy Science** 102, 6756–6765, 2019.

- COSTA, G. M. P. SILVA, N.; ROSA, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA, U. P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p.1938-1942, 2008.
- COUSIN, F. J.; MATER, D. D. G; FOLIGNE, B.; JAN, G. Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. **Dairy Science and Technology** 91(1), 1–26, 2011.
- CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. **J. Appl. Microbiol** 113, 1417–1427, 2012.
- CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends Food Sci. Technol** 33, 93–109, 2013b.
- DAGNAS, S.; GAUVRY, E.; ONNO, B.; MEMBRE, J. M. Quantifying effect of lactic, acetic, and propionic acids on growth of molds isolated from spoiled bakery products. **J Food Prot.** 78, 1689–1698, 2015.
- DALIE, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria e potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control**, 21(4), 370-380, 2010.
- DARILMAZ D. AND BEYATLI Y. Bile salt deconjugation activity of Propionibacterium strains and their cholesterol co-precipitation abilities. **International Journal of Dairy Technology** 72, 511–558. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12619>, 2019.
- DARILMAZ, O. D. **Determination of Propionic Acid Bacterial Species in Traditional Turkish Cheeses and Searching Some of Their Probiotic Properties**. 2010. Ph.D. Thesis. Ankara: Gazi University Institute of Science and Technology. [www.acikarsiv.gazi.edu.tr/File.php?Doc\\_ID=3872](http://www.acikarsiv.gazi.edu.tr/File.php?Doc_ID=3872), 2010.
- DAS, S.; SINGH, V. K.; DWIVEDY, A. K.; CHAUDHARI, A. K.; DUBEY, N. K. Nanostructured *Pimpinella anisum* essential oil as novel green food preservative against fungal infestation, aflatoxin B1 contamination and deterioration of nutritional qualities. **Food Chem.** 344, 128574, 2021.
- DAVIDSON, P. M.; T. M. TAYLOR; SCHMIDT, S. E.; **Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds**. Pages 765– 801 in Food Microbiol. American Society of Microbiology Press, Washington, DC, 2013.

- DELAVENNE, E.; CLIQUET, S.; TRUNET, C.; BARBIER, G.; MOUNIER, J.; LE BLAY, G. Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. **Food Microbiol** 45, 10–17, 2015.
- DELAVENNE, E.; ISMAIL, R.; PAWTOWSKI, A.; MOUNIER, J.; BARBIER, G.; BLAY, G. L. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. **Food Control** 30, 206-213, 2013.
- DELAVENNE, E.; MOUNIER, J.; DÉNIEL, F.; BARBIER, G.; LE BLAY, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. **Int. J. Food Microbiol** 155, 185–190, 2012.
- DELIKANLI, B.; OZCAN, T. Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt. **Int. J. Dairy Technol.**, 67, 495–503, 2015.
- DEUTSCH, S. M.; FALENTIN, H.; DOLS-LAFARGUE, M.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. **International Journal of Food Microbiology** 125, 252-258, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.006>.
- DEVLIEGHERE, F., L. VERMEIREN, AND J. DEBEVERE. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **Int. Dairy J.** 14:273–285, 2004.
- DOLEYRES, Y.; SCHAUB, L.; LACROIX, C. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. **J. Dairy Sci.**, 88, 4146–4156, 2005.
- DOMAGAŁA, J. Texture of yogurts and bio-yogurts from goat's milk depending on starter culture type. **Milchwissenschaft**, 60, 289–292, 2005.
- DOMAGAŁA, J.; WSZOŁEK, M. Effect of Concentration Method and Starter Culture Type on the Texture and Susceptibility to Syneresis of Yoghurt and Bio-Yoghurts Made of Goat's Milk. **Zywn**, 6, 118–126, 2008.
- DOS REIS, D. L.; COUTO, E. P.; RIBEIRO, J. L.; NERO, L. A.; DE AGUIAR FERREIRA, M. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3161–3172, 2014.
- DRAKE, M. A. Sensory analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*. **Champaign**, n. 90, p. 4925-4937, 2007.



- ELGADI, Z. A. M.; GADIR, W. S. A.; DIRAR, H. A. Isolation and identification of lactic acid bacteria yeast from dairy milk Khartoum State (Sudan). **Research Journal of Microbiology**, Hamilton, v. 3, n. 3, p. 163-168, 2008.
- EL-SAYED, E.; EL-GAWAD, A.; MURAD, I.H.; SALAH, S. Utilization of laboratory-produced xanthan gum in the manufacture of yogurt and soya yogurt. **Eur. Food Res. Technol.**, 215, 298–304, 2002.
- FARHADI, S.; DARANI, K.; MASHAYEKH, M.; MORTAZAVIAN, M. A.; MOHAMMAD, A. AND SHAHRAZ, A. F. Production of propionic acid in a fermented dairy beverage. **International Journal of Dairy Technology** 66(1) 127–134, 2013.
- FAYYAZ, N.; SHAHIDI, F.; ROSHANAK, S.. Evaluation of the bioprotectivity of *Lactobacillus* binary/ternary cultures in yogurt. **Food Science Nutritional**, 8:5036-5047, 2020.
- FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: princípios e práticas**. 2. ed. [s.l.] Artmed, FAYYAZ, N.; SHAHIDI, F.; ROSHANAK, S. Evaluation of the bioprotectivity of *Lactobacillus* binary/ternary cultures in yogurt. **Food Sci Nutr**. 8:5036–5047, 2020.
- FERNANDEZ, B., VIMONT, A., DESFOSSÉS-FOUCAULT, É, DAGA, M., ARORA, G., AND FLISS, I. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. **Food Control** 78, 350–356. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.007, 2017.
- FERREIRA, A. D.; VILJOEN, B. C. Yeasts as adjunct iniciiaiss in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 12, p. 131-140, 2003.
- FERREIRA, C.L.D.L.F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*, 2003.
- FLEET, G. H. Yeast in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, 68(3), 199e212, 1990.
- FISCHER, S. W.; TITGEMEYER, F. Protective cultures in food products: From science to market. **Foods** 12 (7), p. 1541. DOI: 10.3390/foods12071541, 2023.
- FUSELLI, F.; GUARINO, C.; LA MANTIA, A.; LONGO, L.; FABERI, A.; AND MARIANELLA, R. M. Multidetecction of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B** 906, 9–18, 2012.

GARCIA C, BAUTISTA L, RENDUELES M AND DIAZ M A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. **International Journal of Dairy Technology** 72(1) 47–56, 2019.

GARNIER, L., F. VALENCE, AND J. MOUNIER. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. **Microorganisms** 5:42, 2017a.

GARNIER, L., PENLAND, M., THIERRY, A., MAILLARD, M. B., JARDIN, J., COTON, M., *et al.* Antifungal activity of fermented dairy ingredients: identification of antifungal compounds. **Int. J. Food Microbiol.** 322:108574. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108574, 2020.

GEREZ, C. L., TORINO, M. I., ROLLÁN, G., FONT DE VALDEZ, G.. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. **Food Control** 20, 144–148, 2009.

GILBERT A.; TURGEON S. L. Studying stirred yogurt microstructure and its correlation to physical properties: a review. **Food Hydrocoll** 121:106, 2021.

GOMES, J. J. L.; DUARTE, A. M.; BATISTA, A. S. M.; DE FIGUEIREDO, R. M. F.; DE SOUSA, E. P.; DE SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. **LWT**, 54, 18–24, 2013.

GÜLCK, T.; BOOTH, J.; CARVALHO, Â.; KHAKIMOV, B.; CROCOLL, C.; MOTAWIA, M.; MØLLER, B.; BOHLMANN, J.; GALLAGE, N. Synthetic biology of cannabinoids and cannabinoid glucosides in *Nicotiana benthamiana* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Nat. Prod.** 83, 2877–2893, 2020.

GUMUS, C. E.; GHARIBZAHEDI, S. M. T. Yogurts supplemented with lipid emulsions rich in omega-3 fatty acids: New insights into the fortification, microencapsulation, quality properties, and health-promoting effects. **Trends Food Sci. Technol** 110, 267–279, 2021.

GUYOMARC'H, F.; FRANCIUS, G.; PARAYRE, S.; MADEC, M-N; DEUTSCH, S.-M. Surface properties associated with the production of polysaccharides in the food bacteria *Propionibacterium freudenreichii*. **Food Microbiology** 92, 103579, 2020.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. **Trends Food Sci. Technol** 56:61–76, 2016.

HABIBI NAJAF, M. B.; FATEMIZADEH, S. S.; TAVAKOLI, M. Release of proteolysis products with ACE-inhibitory and antioxidant activities in probiotic yogurt containing different levels of fat and prebiotics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 25: 367-377, 2019.

HAN, X.; YANG, Z.; JING, X.P. Improvement of the texture of yogurt by use of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. *BioMed Res. Int.*, 2016, 7945675–7945681, 2016.

HARWALKAR, V.; KALAB, M. Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yoghurt made from reconstituted nonfat dry milk. *Food Microstructure*, 5(2), 287–294, 1986.

HILL C, GUARNER F, REID G, *et al.* Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology* 11 506–514, 2014.

HOLLMANN, M., RAZZAZI-FAZELI, E., GRAJEWSKI, J., TWARUZEK, M., SULYOK, M., AND BÖHM, J. Detection of 3-nitropropionic acid and cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. *Mycotoxin Res.* 24, 140–150, 2008.

HORNBAEK, T.; BIRKEROED; LISBERG, M.; ESPERGAERDE; KEJ, S. D.; FREDERIKSBERG. Bioprotection using *Lactobacillus paracasei* strains. **Patent Application Publication No.: US 2015/0064152 A1**, United States, p. 3, 2015.

HUANG, K.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CAO, H.; LUO, D.; YI, C.; GUAN, X. Formulation of plant-based yoghurt from soybean and quinoa and evaluation of physicochemical, rheological, sensory and functional properties. *Food Biosci* 49:101831, 2022.

IZZO, L.; MIKUŠOVÁ, P.; LOMBARDI, S.; SULYOK, M.; RITIENI, A. Analysis of Mycotoxin and Secondary Metabolites in Commercial and Traditional Slovak Cheese Samples. *Toxins* 14, 134, 2022.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 126, n. 3, p. 321-326, 2008.

JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* 6, n. 89, p. 755-768, 1996.

JAUREGUI, C. A.; REGENSTEIN, J. M. ; BAKER, R. C. A Simple Centrifugal Method for Measuring Expressible Moisture, A Water-Binding Property of Muscle Foods. *Journal of Food Science*, 46: 1271-1271, 1981.

JOZVE-ZARGHARABADI, E.; FADAEI-NOGHANI, V.; HUSEINI, H. F. Viability of starter bacteria and anti-oxidative activity of a functional yoghurt containing *Silybum marianum* seed extract. ***Applied Food Biotechnology*** 7 (3), 135-142, 2020.

KANEKO T, MORI H, IWATA M AND MEGURO S.. Growth stimulators for bifidobacteria produced by *P. freudenreichii* and several intestinal bacteria. ***Journal of Dairy Science*** 77 393–404, 1994.

KARIYAWASAM, K. M. M. M.; LEE, N.; PAIK, H. Efect of set-type yoghurt supplemented with the novel probiotic *Lantiplantibacillus plantarum* 200655 on physicochemical properties and the modulation of oxidative stress-induced damage. ***Food Science and Biotechnology*** 32:353–360, 2023.

KAVAS, G. *et al.* Characterization of yeasts isolated from artisinal Turkish dairy products. ***International Journal of Dairy Sciences***, v. 1, n. 1, p. 44-50, 2006.

KHANAL, S.N.; LUCEY, J.A. Effect of fermentation temperature on the properties of exopolysaccharides and the acid gelation behavior for milk fermented by *Streptococcus thermophilus* strains DGCC7785 and St-143. ***J. Dairy Sci.***, 101, 3799–3811, 2018.

KHAN-MOHAMMADI, S.; FADAEI, V.; MIRDAMADI, S. Characterization of yoghurt supplemented with *Lacticaseibacillus rhamnosus* as a bioprotective antifungal culture. ***Mljekarstvo*** 73 (1) 59-72, 2023.

LAČANIN, I.; MOUNIER, J.; PAWTOWSKI, A.; DUŠKOVÁ, M.; KAMENÍK, J.; KARPÍŠKOVÁ, R. Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus spp.* for use as bioprotective cultures in dairy products. ***World J Microbiol Biotechnol*** 33:188, 2017.

LASSOIS, L.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; JIJAKLI, M.H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. ***Biol. Control*** 45, 410–418, 2008.

LAUBSCHER, P. J.; VILJOEN, B. C. The resistance of dairy yeasts against commercially available cleaning compounds and sanitizers. ***Food Technology and Biotechnology*** 37, n. 2, p. 281-286, 1999.

LAURENČÍK, M., SULO, P., SLÁVIKOVÁ, E., PIECKOVÁ, E., SEMAN, M., AND EBRINGER, L.. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese – Bryndza. **Int. J. Food Microbiol** 127, 176–179, 2008.

LAVERMICOCCA, P., VALERIO, F., & VISCONTI, A.. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology** 69(1), 634-640, 2003.

LAVERMICOCCA, P., VALERIO, F., EVIDENTE, A., LAZZARONI, S., CORSETTI, A., GOBBETTI, M.. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Appl. Environ. Microbiol** 66, 4084–4090. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.4084-4090>, 2000.

LE LAY, C.; COTON, E.; LE BLAY, G.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; CHOISSET, Y.; VAN LONG, N. N.; MESLET-CLADIÈRE, L.; MOUNIER, J. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. **Int. J. Food Microbiol** 239, 79–85, 2016.

LE LAY, C.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; WEILL, A.; LE BLAY, G.; BARBIER, G.; COTON, E. In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. **Food Control** 60, 247–255, 2016.

LEBLANC J. G.; RUTTEN G.; BRUINENBERG P.; SESMA F.; SAVOY DE GIORI G. AND SMID E. J. A novel dairy product fermented with *P. freudenreichii* improve the riboflavin status of deficient rats. **Nutrition** 22 645–651, 2006.

LEE, J. J.; CHOI, Y. J.; LEE, M. J.; PARK, S. J.; OH, S. J.; YUN, Y. R.; MIN, S. G.; SEO, H. Y.; PARK, S. H.; LEE, M. A.. Effects of combining two lactic acid bacteria as a starter culture on model kimchi fermentation. **Food Res. Int.** 136:109591, 2020.

LEE, N. K.; LIM, S. M.; CHEON, M. J.; PAIK, H. D. Physicochemical analysis of yogurt produced by *Leuconostoc mesenteroides* H40 and its effects on oxidative stress in neuronal cells. **Food Science of Animal Resources**. 41: 261-273, 2021.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. Formation and physical properties of yogurt. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 23, n. 9, p. 1127-1136, 2010.

LEE, W., LUCEY, J. Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yoghurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. **Journal of Texture Studies** 34 (5-6), 515-536, 2003.

LEYVA SALAS, M., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., and COTON, E.. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. **Microorganisms** 5:37. doi: 10.3390/microorganisms5030037, 2017.

LEYVA SALAS, M.; MOUNIER, J.; MAILLARD, M. B.; VALENCE, F.; COTON, E. AND THIERRY, A. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. **Food Chem.** 301:125260, 2019.

LEYVA SALAS, M.; THIERRY, A.; LEMAÎTRE, M.; GARRIC, G.; HAREL-OGER, M.; CHATEL, M.; LÊ, S.; MOUNIER, J.; VALENCE, F. AND COTON, E. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. **Front. Microbiol.** 9:1787, 2018.

LI, C.; LI, W.; CHEN, X.; FENG, M.; RUI, X.; JIANG, M.; DONG, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **LWT - Food Science and Technology** 57, 477-485, 2014, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.025>.

LI, H.; LIU, L.; ZHANG, S.; CUI, W.; LV, J. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. **Curr. Microbiol.** 65, 156–161, 2012.

LI, H.; LIU, L.; ZHANG, S.; ULUKO, H.; CUI, W.; LV, J. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. **Food Control** 34, 675–680, 2013.

LIANG, N.; ZHAO, Z.; CURTIS, J. M.; ANZLE, M. G. G. Antifungal cultures and metabolites of lactic acid bacteria for use in dairy fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, 383, 109938, 2022.

LIU, L.; JIANG, S.; XIE, W.; XU, J.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Fortification of yogurt with oyster hydrolysate and evaluation of its in vitro digestive characteristics and anti-inflammatory activity. **Food Biosci** 47:10147, 2022.

LIU, S-Q.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control** 20, n. 9, p. 852-855, 2009a.

LO, R.; HO, V. T. T.; BANSAL, N.; TURNER, M. S.. The genetic basis underlying variation in production of the flavour compound diacetyl by *Lactobacillus rhamnosus* strains in milk. **Int. J. Food Microbiol** 265, 30–39. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.029, 2018.

LU, Y.; MAO, L.K.; ZHENG, H.X.; CHEN, H.Q.; GAO, Y.X. Characterization of beta-carotene loaded emulsion gels containing denatured and native whey protein. **Food Hydrocoll**, 102, 105600, 2020.

MADA, T.; DURAISAMY, R.; ABERA, A.; GUESH, F. Effect of mixed banana and papaya peel pectin on chemical compositions and storage stability of Ethiopian traditional yoghurt (ergo). **Int Dairy J** 131:105, 2022.

MAGNUSSON J, STRÖM K, ROOS S, SJÖGREN J, SCHNÜRER J.. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Lett** 219:129 –135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7), 2003.

MALAKI NIK, A.; TOSH, S.; POYSA, V.; WOODROW, L.; CORREDIG, M. Physicochemical characterization of soymilk after step-wise centrifugation. **Food Res. Int.**, 41, 286–294, 2008.

MARRIOTT, N.G.; SCHILLING, M.W.; GRAVANI, R.B. Food Contamination Sources. In: Principles of Food Sanitation. Food Science Text Series. **Springer, Cham**. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67166-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67166-6_5), 2018.

MATHIAS, T. R. S.; ANDRADE, K. C. S.; ROSA, C. L. S.; SILVA, B. A. Avaliação do comportamento reológico de diferentes iogurtes comerciais. **Brazilian Journal of Food Technology**, 16 (1), 12-20, <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232013005000004>, 2013.

MENDONÇA, E. **Estudo do comportamento reológico de iogurtes comerciais**. 2002. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2002.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. **Toxins**. 2, 572–592, 2010.

MIOCINOVIC, J.; MILORADOVIC, Z.; JOSIPOVIC, M.; NEDELJKOVIC, A.; RADOVANOVIC, M.; PUDJA, P. Rheological and textural properties of goat and cow milk set type yogurts. **Int. Dairy J.**, 58, 43–45, 2016.

- MITUNIEWICZ-MAŁEK, A.; DMYTRÓW, I.; NOWAK, Z. Quality characteristics of yoghurt made from refrigerated goat's milk. *Przegl. Mlecz.* 7, 4–8, 2009.
- MITUNIEWICZ-MAŁEK, A.; ZIARNO, M.; DMYTRÓW, I. Application of Frozen Goat's Milk to Production of Potentially Probiotic Fermented Drink. *Zywn.* 6, 140–149, 2015.
- MORIA, Y.; DU, Z.F. The history of yogurt development in the United States: 40 years of rapid development, the coexistence of brands and legends. *Dairy Humanit.* 6, 39–43, 2020.
- MUHIALDIN, B. J.; ALGBOORY, H. L.; KADUM, H.; MOHAMMED, N. K.; SAARI, N.; HASSAN, Z.; HUSSIN, A. S. M. Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds. *Food Control.* 109, 106898, 2020.
- MUHIALDIN, B. J.; HASSAN, Z.; ABU BAKAR, F; SAARI, N. Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* 59:27–30, 2016.
- NARVHUS, J. A.; GADAGA, T. H. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology* 86, 51 – 60, 2003.
- NETO, A. C. R.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 5, p. 1343- 1351, 2012.
- NICOLE, H. M.; ABIGAIL, S.; MARTIN, W. **Spoilage mold in dairy products**, in *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 3rd Edn. (Cambridge, MA: Academic Press), 607–610, 2022.
- OLIVEIRA, K. H.; SOUZA, J. A. R.; MONTEIRO, A. R. Caracterização reológica de sorvetes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28, n. 3, p. 592-598. [http:// dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300014](http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000300014), 2008.
- OLEKSY-SOBCZAK, M.; KLEWICKA, E.; PIEKARSKA-RADZIK, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT* 122, 109055, 2020.
- ÖZTÜRK, B.; ÖNER, M. Production and evaluation of yogurt with concentrated grape juice. *Journal of Food Science*, 64(3), 530–532, 1999.



PASCUA, Y.; KOÇ, H.; FOEGEDING, E. A. Food structure: Roles of mechanical properties and oral processing in determining sensory texture of soft materials. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 18, p. 324–333, 2013.

PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

PAWLOWSKA, A. M.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. “Green preservatives”: combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. **Adv. Food Nutr.** 66, 217–238, 2012.

PENG, Q.; YANG, J.; WANG, Q.; SUO, H.; HAMDY, A. M.; SONG, J. Antifungal Effect of Metabolites from a New Strain *Lactiplantibacillus Plantarum* LPP703 Isolated from Naturally Fermented Yak Yogurt. **Foods** 12, 181, 2023.

PENNA, A.; GURRAM, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. Effect of high hydrostatic pressure processing on rheological and textural properties of probiotic low-fat yogurt fermented by different starter cultures. *Journal of Food Process Engineering*, 29(5), 447–461, 2006.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology** 15, n. 12, 546-553, 2007.

PITT, J. I. “**Penicillium: Penicillium and Talaromyces: introduction,**” in **Encyclopedia of Food Microbiology**, 2nd Edn. eds C. A. Batt and M. L. Tortorello (Cambridge, MA: Academic Press), 6–13, 2014.

PITT, J.I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 3rd ed.; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA; pp. 1–2, ISBN 978-1-4615-6391-4, 2009.

POPOVIĆ, N.; BRDARIĆ, E.; ĐOKIĆ, J.; DINIĆ, M.; VELJOVIĆ, K.; GOLIĆ, N.; TERZIĆ–VIDOJEVIĆ, A. Yogurt Produced by Novel Natural Starter Cultures Improves Gut Epithelial Barrier in Vitro. **Microorganisms**, 8, 1586, 2020.

PRACHYAKIJ, P.; SCHNURER, J.; CHARERNJIRATRAKUL, W.; KANTACHOTE, D.; Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from

fermented plant beverages, **Songklanakarín Journal of Science and Technology** 29, n. 2, p. 211-218, 2007.

PRADHAN, D.; KADYAN, S. Antifungal Lactic Acid Bacteria (LAB): Potential Use In Food Systems. **Novel Strategies to Improve Shelf-Life and Quality of Foods**. (Chapter 4, p. 73-95). Florida, EUA: Apple Academic Press, 2020.

PRADHAN, S.; ANANTHANARAYAN, L.; PRASAD, K.; BHATNAGAR-MATHUR, P. Antifungal activity of lactic acid bacterial isolates against aflatoxigenic fungi inoculated on peanut kernels. **LWT**. 143, 111104, 2021.

RADHA, K., AND L. S. NATH.. Studies on the air quality in a dairy processing plant. **Indian J. Vet. Anim. Sci.** 43:346–353, 2014.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, Minas Gerais: UFV, 2007.

RAMOS-PEREIRA, J.; MAREZE, J.; FERNÁNDEZ, D.; RIOS, E. A.; SANTOS, J. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from milk against *Penicillium commune*, *P. nordicum*, and *P. verrucosum*. **Int. J. Food Microbiol.** 355, 109331, 2021.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goats' milk ice cream and yogurt. **Food Research International** 49(2) 619–625, 2012.

RASHWAN, A. K; KARIM N.; XU, Y.; CUI, H.; FANG, J.; CHENG, K.; MO, J.; CHEN, W. Chemical composition, quality attributes and antioxidant activity of stirred-type yogurt enriched with *Melastoma dodecandrum* Lour fruit powder. **Food Funct** 13:1579– 1592, 2022.

RASHWAN, A. K; OSMAN, A. I.; CHEN, W. Natural nutraceuticals for enhancing yogurt properties: a review. **Environmental Chemistry Letters** 21:1907–1931, 2023.

REZA, M.; AMIR, M.; SARA, S. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Eng. Life Sci**, 12, 399–409, 2012.

REZAC, S.; KOK, C.R.; HEERMANN, M.; HUTKINS, R. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Front. Microbiol**, 9, 1785, 2018.

RIPARI, V. Techno-functional role of exopolysaccharides in cereal-based, yogurt-like beverages. **Beverages**, 5, 16, 2019.

ROCHA, C.; COBUCCI, R.M.A.; MAITAN, V.R.; SILVA, O. C. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos** 26, n. 2, p. 255-266, 2008.

RODRIGUES, M. A. M.; SANTOS, K. A. Qualidade microbiológica de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, comercializadas em Uberlândia/MG. **Higiene Alimentar** 21, n. 150, p. 39-40, 2007.

RYU, E.H.; YANG, E.J.; WOO, E.R.; CHANG, H.C. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. **Food Microbiol** 41, 19–26, 2014.

SAH, B.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR, O. Physicochemical, textural and rheological properties of probiotic yogurt fortified with fibre-rich pineapple peel powder during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, 65, 978–986, 2016.

SALAS, M. L.; MOUNIER, J.; VALENCE, F.; COTON, M.; THIERRY, A.; COTON, E. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. **Microorganisms** 5(3), 37, 2017.

SANTOS, J. F.; DUTRA, B. F.; FILHO, M. A. C. C.; BARROS, R. B.; ROLIM, M. B. Q.; FRANQUE, M. P. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e da água utilizada em propriedades leiteiras da microrregião de Garanhuns-PE. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.1, p.71-76, 2015.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria na qualidade do leite**, 1ª Ed., Barueri: Manole, 314 p, 2007.

SARFRAZ F., FAROOQ U., SHAFI A., HAYAT Z., AKRAM K. AND REHMAN H.U. Hypolipidaemic effects of synbiotic yoghurt in rabbits. **International Journal of Dairy Technology** 72, 545–550. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12618>, 2019.

SCHMIDT, M.; LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. **Food Control**. 88, 139–148, 2018.

SCHNURER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, 16(1-3), 70-78, 2005.

SCHOLZ, C.F.P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol** 66, 4422–4432, 2016.

SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. 2 ed. Germany. p. 291, 2000.

SCHWENNINGER, S. M., AND MEILE, L. A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 229–237, 2004.

SCHWENNINGER, S. M.; LACROIX, C.; TRUTTMANN, S.; JANS, C.; SPÖRNDLI, C.; BIGLER, L.; MEILE, L.. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. **J. Food Protect.** 71, 2481–2487, 2008.

SEIBEL, N. F.; CANSIAN, R. L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de iogurte. **Revista Leite e Derivados** 52, p.44-49, 2000.

SERAFEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K.; SAGREDOS, A. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. **Food Chemistry** 134, n. 4, p. 1839–1846, 2012.

SHALABI, O. Antioxidant, antibacterial, and antitumor activities of goat's stirred yoghurt fortified with carob molasses. *Ann Agric Sci* 67, 119–126, 2022.

SHARMA, H.; OZOGUL, F.; BARTKIENE, E.; ROCHA, J.M. Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 63, 4819-4841, 2023.

SHI, C.; KNØCHEL, S.. Susceptibility of dairy associated molds towards microbial metabolites with focus on the response to diacetyl. **Food Control** 121:107573, 2021.

SHI, C.; MAKTABDAR, M.. Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. **Front. Microbiol.** 12:819684, 2022.

SHIROMA, P. H. **Estudo do comportamento reológico de suspensões aquosas de bentonita e CMC : influência da concentração do NaCl**. 2012. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2012.

SHORI, A. B. Storage quality and antioxidant properties of yogurt fortified with polyphenol extract from nutmeg, black pepper, and white pepper. **Electron J Biotechnol** 57:24–30, 2022.

SIEDLER, S.; RAU, M. H.; BIDSTRUP, S.; VENTO, J. M.; AUNSBJERG, S. D.; BOSMA, E. F.; *et al.*. Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e2312–e2319, 2020.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Afr. J. Agric. Res.** 11. n.39, p.3733-3740, 2016.

SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica de ricota e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo Minas Frescal.** 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, M., AND LIDON, F. Food preservatives - an overview on applications and side effects. **Emir. J. Food Agric.** 28, 366–373., 2016.

SNYDER, A. B.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Characterization and control of *Mucor circinelloides* spoilage in yogurt. **Int. J. Food Microbiol.** 228, 14–21, 2016.

SOARES M. B.; ALMADA C. N.; ALMADA C. N.; MARTINEZ R. G. R.; PEREIRA E. P. R.; BALTHAZAR C. F.; CRUZ A. G.; RANADHEERA C. S.; SANT'ANA A. S. Behavior of different *Bacillus* strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. **International Journal of Food Microbiology** 307, 2019.

STACKEBRANDT, E.; CUMMINS, C. S.; JOHNSON, J. L. **Family Propionibacteriaceae: The genus *Propionibacterium*.** In *The Prokaryotes*. Springer: New York, NY, USA; p. 400–418, ISBN 978-0-387-25493-7, 2006.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering.** 2nd ed. Freeman Press: Michigan. 418 p., 1996.

STRASSBURGER, A. H.; CAYE, V. A. H.; COSTELLA, M. F.; DALCANTON, F. Análise da variação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado: uma revisão sistemática da literatura. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes.** 74 (1), 60-72, 2019.

SUOMALAINEN, T.; MATTILAA, P. S.; MATTO, J.; TYNKKYNENA, S.. In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *P. freudenreichii spp. shermanii*. **International Dairy Journal** 18, 271–278, 2008.

SUPAVITITPATANA, P., WIRJANTORO, T. I., RAVIYAN, P. Characteristics and shelf-life of corn milk yoghurt. **Journal of Natural Science** 9 (1), 133-147, 2010.

SURIYARACHCHI, V. R.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. **Appl. Environ. Microbiol.** 42:574–579, 1981.

SUWANNASANG, S.; ZHONG, Q.; THUMTHANARUK, B.; VATANYOOPAISARN, S.; UTTAPAP, D.; PUTTANLEK, C.; RUNGSARDTHONG, V. Physicochemical properties of yogurt fortified with microencapsulated Sacha Inchi oil. **LWT Food Sci Technol** 161:113375, 2022.

SZAJNAR, K.; ZNAMIROWSKA, A.; PAWLOS, M.; KALICKA, D. Physicochemical and textural properties of calcium citrate-enriched yogurts. **Brom. Chem. Toksykol.**, 4, 946–952, 2014.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R. K.: Tamime and Robinson's yoghurt: Science and Technology, Elsevier, 2007.

TANG, P. L.; CHAM, X. Y.; HOU, X.; DENG, J. Potential use of waste cinnamon leaves in stirred yogurt fortification. **Food Biosci** 48:101838. 2022.

TARNAUD, F.; GAUCHER, F.; ROSA DO CARMO, F.L.; ILLIKOUD, N.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V.; GUYOMARC'H, F.; GAGNAIRE, V.; JAN, G. Differential Adaptation of *P. freudenreichii* CIRM-BIA129 to Cow's Milk Versus Soymilk Environments Modulates Its Stress Tolerance and Proteome. **Front. Microbiol.**, 11, 549027, 2020.

TELIS, V. R. N.; TELIS-ROMERO, J.; GABAS, A. L. Solids rheology for dehydrated food and biological materials. **Drying Technology** 23(4), p.759-780, 2005

THOMAS, T. D.; MILLS, O. E. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. A review, **Journal Food Microbiology** 46, p. 245, 1981.

TITAPICCOLO, G.I.; CORREDIG, M.; ALEXANDER, M. Acid coagulation behavior of homogenized milk: Effect of interacting and non-interacting droplets observed by rheology and diffusing wave spectroscopy. **Dairy Sci. Technol.**, 91, 185–201, 2011.

- TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Review: Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais** 7, n. 2, p. 181-204, 2005.
- VANEGAS-AZUERO, A.M.; GUTIÉRREZ, L.F. Physicochemical and sensory properties of yogurts containing sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and  $\beta$ -glucans from *Ganoderma lucidum*. **J. Dairy Sci.**, 101, 1020–1033, 2018.
- VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control** 69:61–64, 2016.
- VASCONCELOS, F. M.; SILVA, H. L. A.; POSO, S. M. V.; *et al.* Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. **Food Research International** 123 697–703, 2019.
- VEDAMUTHU, C. R.. The yogurt story - past, present and future. Part I Dairy, **Food and Environmental Fermentation** 11, n. 4, p. 202-203, 2019a.
- VÉLEZ-RUIZ, J. F. **Rheological Characterization and Pipeline Transport Needs of Two Fluid Dairy Products (Flavored Milk and Yogurt)**, p 427-472, Woodhead Publishing, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-200013-X>, 2019.
- VERO, S.; GARMENDIA, G.; GONZÁLEZ, M. B.; BENTANCUR, O.; WISNIEWSKI, M. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple. **FEMS Yeast Res.** 13, 189–199, 2013.
- VICENTE, M. R. **Propriedades reológicas de suco de abacaxi com Yacon**. 2015. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
- VILJOEN, B. C. *et al.* Development of yeast populations during processing and ripening of blue veined cheese. **Food Technology and Biotechnology.** 41(4), 291-297, 2003.
- VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology.** 69(12), 37-44, 2001.
- VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; MOLINARI, F.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J. A. Growth of *Lactobacillus paracasei* A 13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristic of the product. **Int. J. Food Microbiol.**, 135, 171–174, 2009.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. **Netherlands: CRC Press**. 808 p., 2006.

WANG, L. L. V. J. P.; CHU, Z. Q.; CUI, Y. Y.; REN, X. H.. Production of conjugated linoleic acid by *P. freudenreichii*. **Food Chemistry** 103, 313–318, 2007.

WANG, L.; WU, T.; ZHANG, Y.; YANG, K.; ELE, Y.; DENG, K.; LIANG, C.; GU, Y. Comparative studies on the nutritional and physicochemical properties of yoghurts from cows', goats', and camels' milk powder. **Int Dairy J.** 138:105542, 2023.

WANG, X.Y.; KRISTO, E.; LAPOINTE, G. Adding apple pomace as a functional ingredient in stirred-type yogurt and yogurt drinks. **Food Hydrocoll.**, 100, 105453–105504, 2020.

WANG, Y. T.; XUE, Y. R.; LIU, C. H.. A Brief Review of Bioactive Metabolites Derived from Deep-Sea Fungi. **Mar. Drugs** 13, 4594–4616, 2015.

WIJESEKARA, A.; WIJESEKARA, A.; WEERASINGHA, V.; JAYARATHNA, S.; PRIYASHANTHA, H. Quality parameters of natural phenolics and its impact on physicochemical, microbiological, and sensory quality attributes of probiotic stirred yogurt during the storage. **Food Chem X** 14:100332, 2022.

WOUTERS, J. T. M. *et al.* Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal** 12, n. 23, p. 91-109, 2002.

XU, R., SA, R., JIA, J., LI, L., WANG, X., LIU, G. Screening of antifungal lactic acid bacteria as bioprotective cultures in yogurt and a whey beverage. *J. Food Prot.* 84, 953–961. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-441>, 2021.

YAN, C.; FU, D.; MCCLEMENTS, D.J.; XU, P.; ZOU, L.; ZHU, Y.; CHENG, C.; LIU, W. Rheological and microstructural properties of cold-set emulsion gels fabricated from mixed proteins: Whey protein and lactoferrin. **Food Res. Int.**, 119, 315–324, 2019.

YERLIKAYA, O.; AKPINAR, A.; SAYGILI, D.; KARAGOZLU, N. Incorporation of *Propionibacterium shermanii* subsp. *freudenreichii* in probiotic dairy drink production: physicochemical, rheological, microbiological and sensorial Properties. **International Journal of Dairy Technology** 73, N° 2, p. 392-402, 2020.

YILDIZ, E.; OZCAN, T. Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. **Int. J. Dairy Technol.**, 72, 199–207, 2019.



YUSUF, M. Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M., Food Packaging and Preservation. Boca Raton: **Academic Press**, v. 9, p. 409-438, 2018.

ZHANG, L. J.; FOLKENBERG, D. M.; AMIGO, J. M. Effect of exopolysaccharide-producing starter cultures and post-fermentation mechanical treatment on textural properties and microstructure of low fat yoghurt. **Int. Dairy J.**, 53, 10–19, 2016.

ZHANG, X.; ZHANG, S.; SHI, Y.; SHEN, F.; WANG, H. A new high phenyl lactic acid-yielding *Lactobacillus plantarum* IMAU10124 and a comparative analysis of lactate dehydrogenase gene. **FEMS Microbiol. Lett.** 356, 89–96, 2014.

ZHAO, J. L.; MA, C. M.; ZHAO, X. H. Effects of yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) juice on fermentation and textural attributes of set-style skimmed yoghurt. **J. Food Meas. Character.**, 15, 2220–2230, 2021.

ZHAO, S.; HAO, X.; YANG, F.; WANG, Y.; FAN, X.; WANG, Y. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* ZZUA493 and its application to extend the shelf life of Chinese steamed buns. **Foods**. 11, 195, 2022.

ZHAO, X.; LIANG, Q. EPS-Producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a Compound Starter Improves Rheology, Texture, and Antioxidant Activity of Yogurt during Storage. **Foods**, 11, 1660, 2022.

ZIARNO, M.; ZARĘBA, D.; DRYZEK, W.; HASSALIU, R.; FLOROWSKI, T. Effect of the Addition of Soy Beverage and Propionic Bacteria on Selected Quality Characteristics of Cow's Milk Yoghurt Products. **Appl. Sci.**, 12, 12603. [https://doi.org/ 10.3390/app122412603](https://doi.org/10.3390/app122412603), 2022.

ZNAMIROWSKA, A.; BUNIOWSKA, M.; ROZEK, P.; KALICKA, D.; PAWLOS, M. Evaluation of the quality of thermostatic yoghurts with spelt fibre and inulin. *Nauka Przyr. Technol.*, 12, 103–112, 2018.

## APÊNDICE A

### Fase I

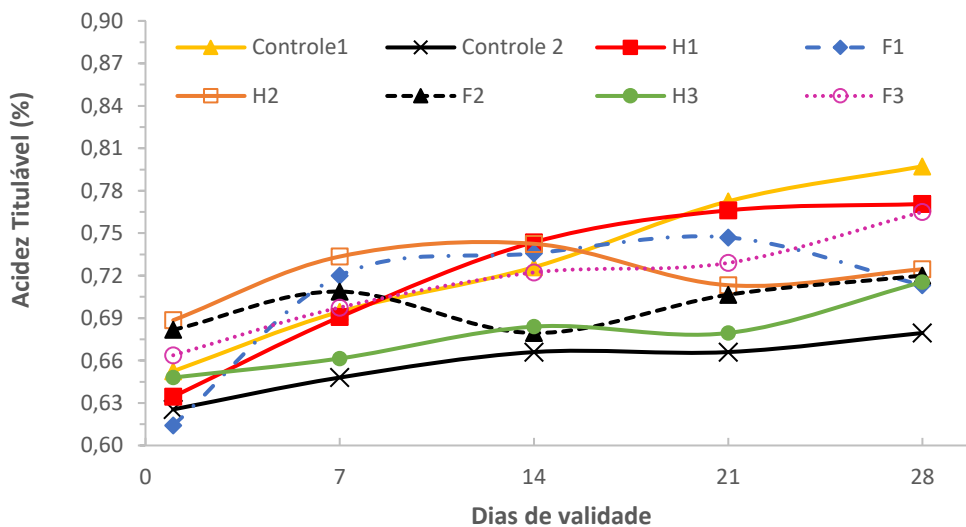
Tabela A.1: Variação do pH em função do tempo (min) de fermentação.

TEMPO (Min)	controle1	controle2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
120	6,27	6,28	6,14	6,09	6,27	6,13	6,19	6,25
180	5,86	5,83	5,54	5,56	5,54	5,64	5,31	5,81
240	5,08	5,25	4,84	4,96	4,95	4,96	4,93	5,14
270	4,84	5,05	4,68	4,78	4,82	4,83	4,77	4,95
300	4,72	4,90	-	4,69	4,70	4,69	4,70	4,85
330	4,66	4,79	-	-	-	-	-	4,73
360	-	4,68	-	-	-	-	-	4,67

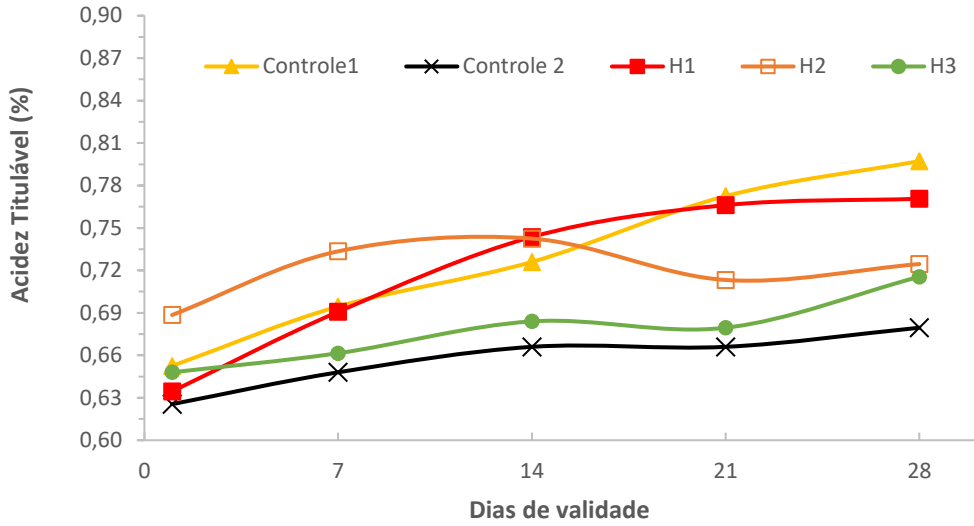
Tabela A.2: Variação do pH em função dos dias de validade – Fase I.

DIAS	controle1	controle2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	4,57	4,68	4,58	4,75	4,67	4,62	4,70	4,62
7	4,48	4,58	4,48	4,59	4,52	4,59	4,61	4,52
14	4,42	4,55	4,41	4,51	4,53	4,59	4,61	4,51
21	4,38	4,55	4,38	4,51	4,48	4,54	4,58	4,46
28	4,33	4,55	4,33	4,53	4,44	4,55	4,56	4,39
<b>Var (%)</b>	<b>-5,3</b>	<b>-2,8</b>	<b>-5,5</b>	<b>-4,6</b>	<b>-4,9</b>	<b>-1,5</b>	<b>-3,0</b>	<b>-5,0</b>

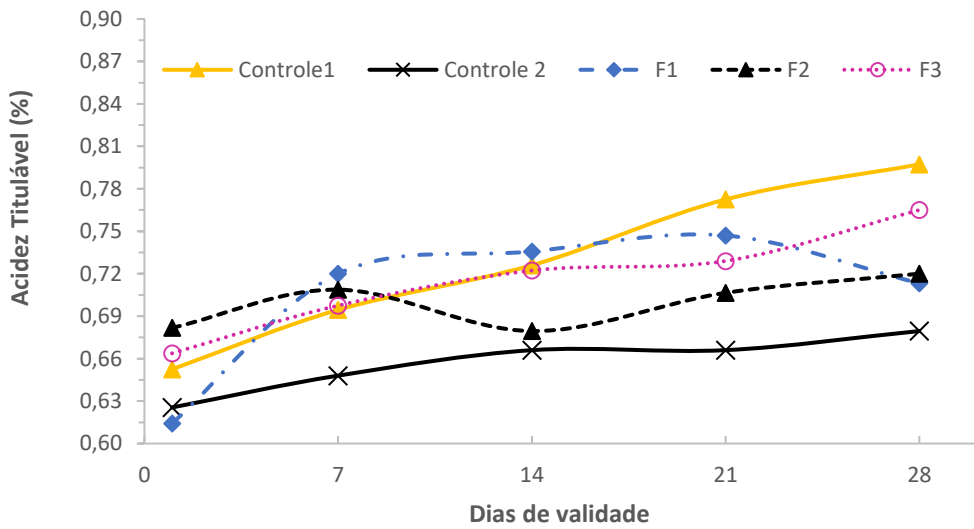
Figura A.1: Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de armazenamento. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

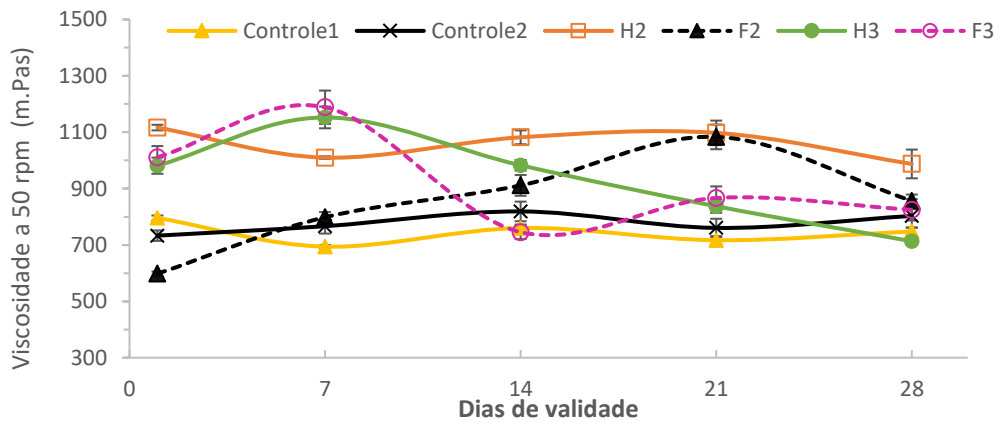


(b)

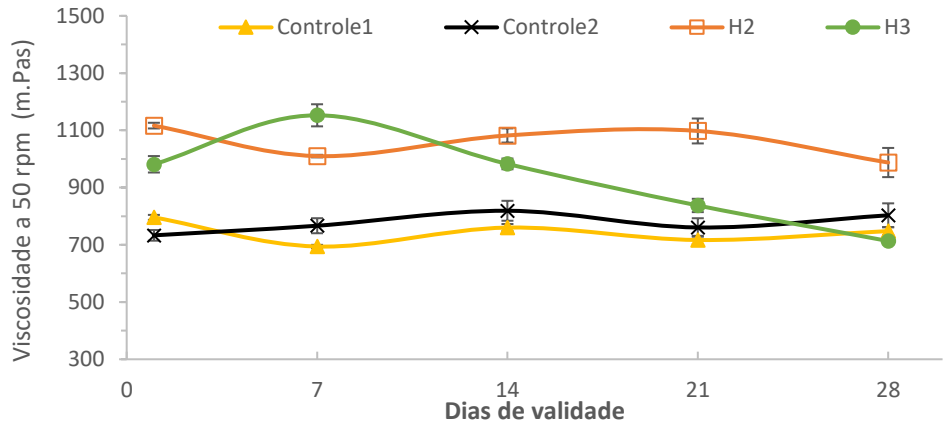


(c)

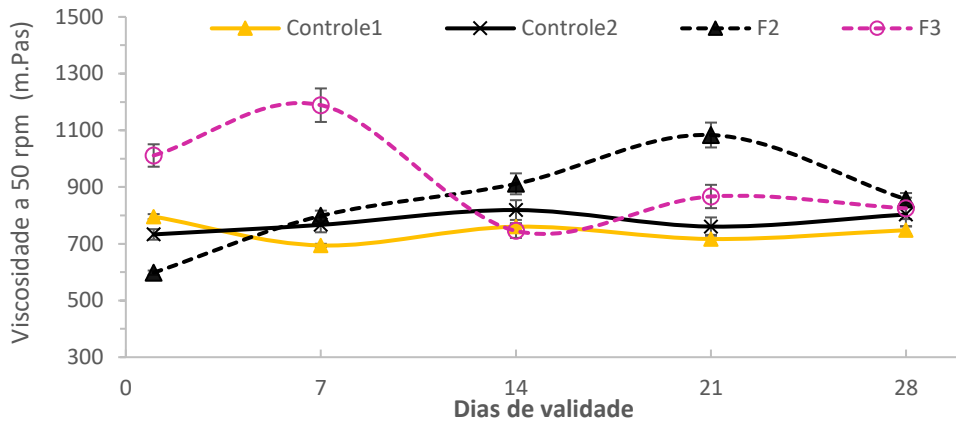
Figura A.2: Variação da viscosidade (m.Pas) a 50 rpm em função dos dias de armazenamento. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

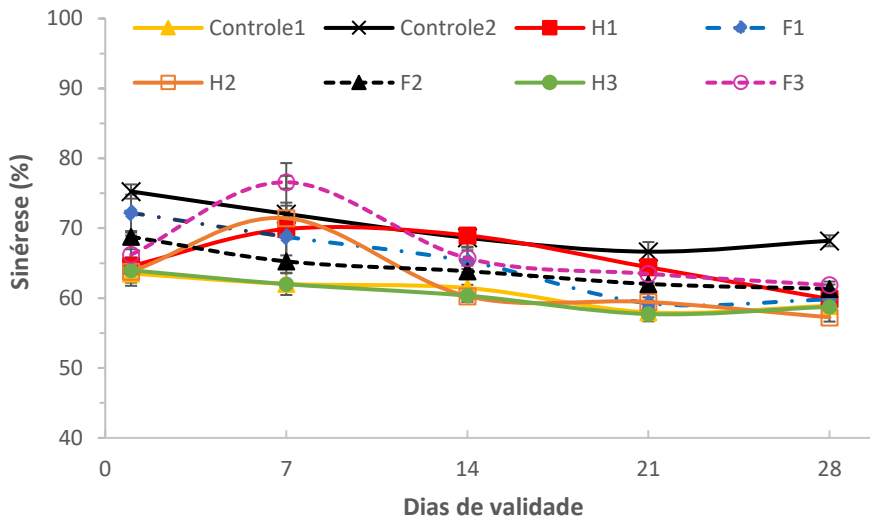


(b)

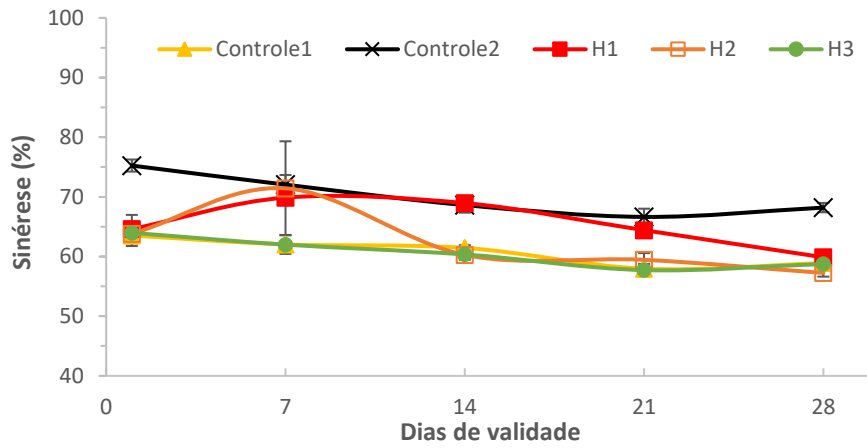


(c)

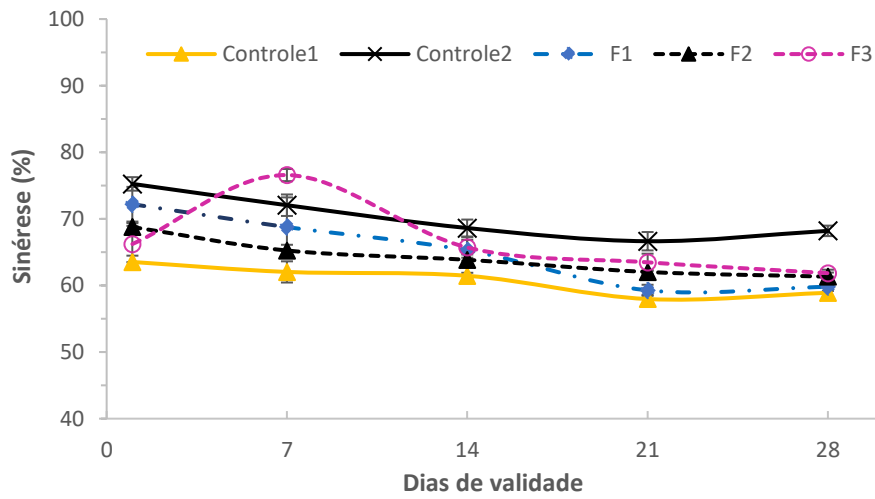
Figura A.3: Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

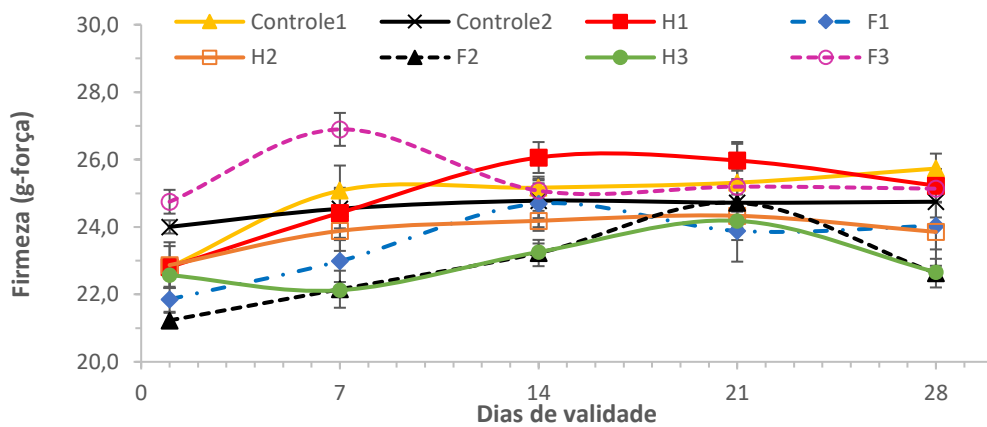


(b)

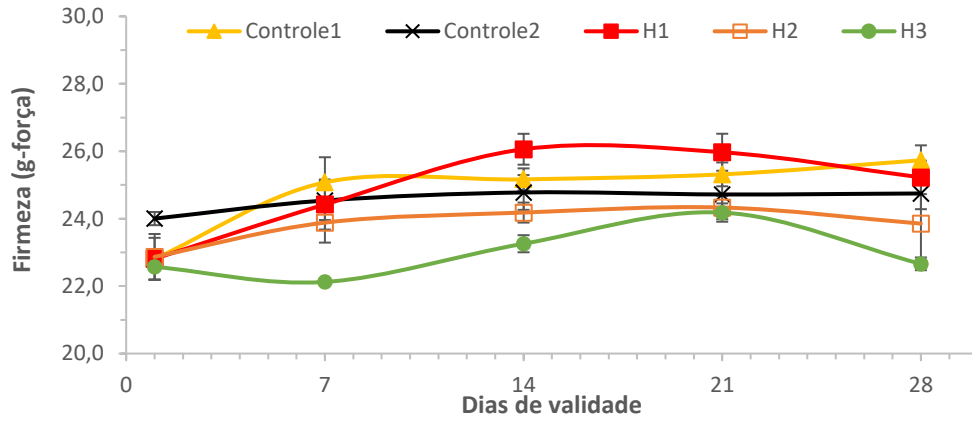


(c)

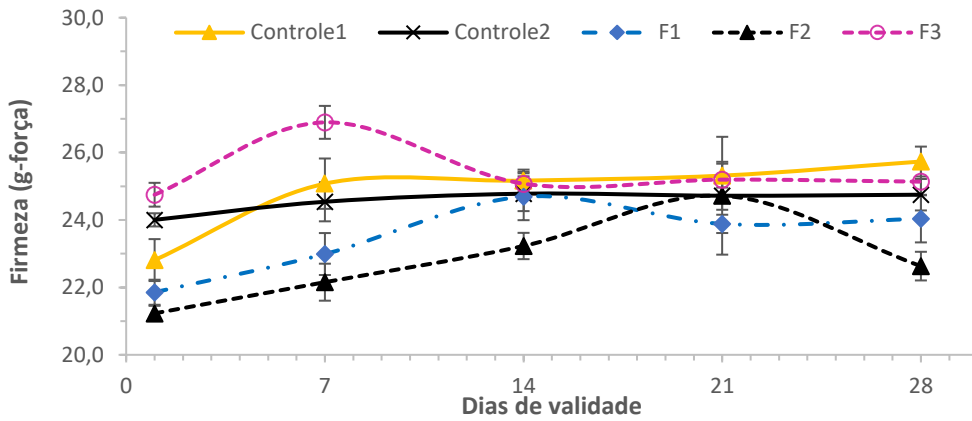
Figura A.4: Variação da firmeza (g-força) em função dos dias de armazenamento. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

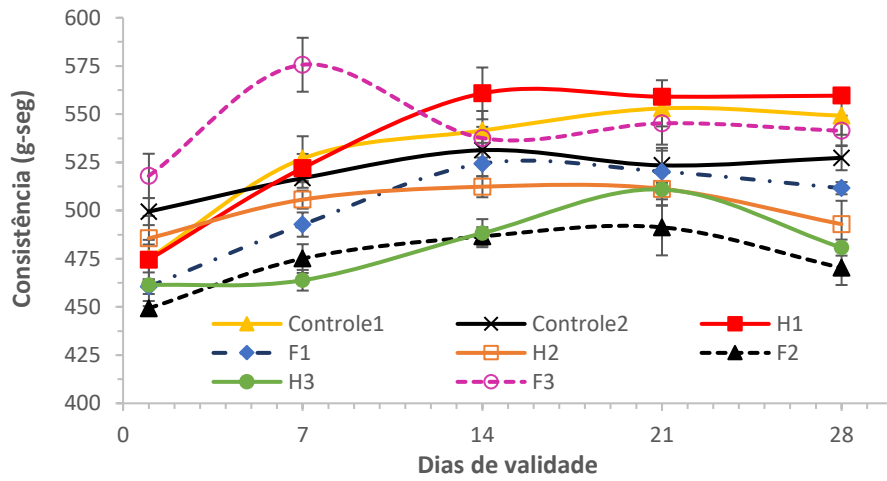


(b)

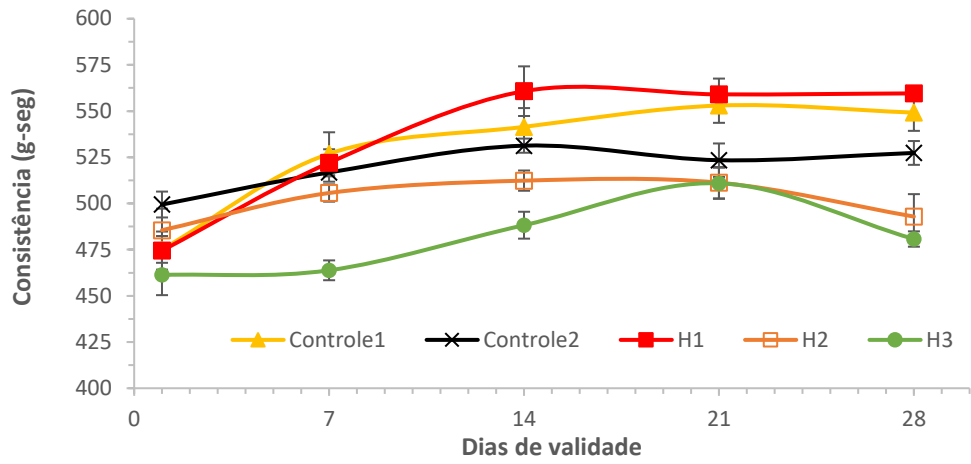


(c)

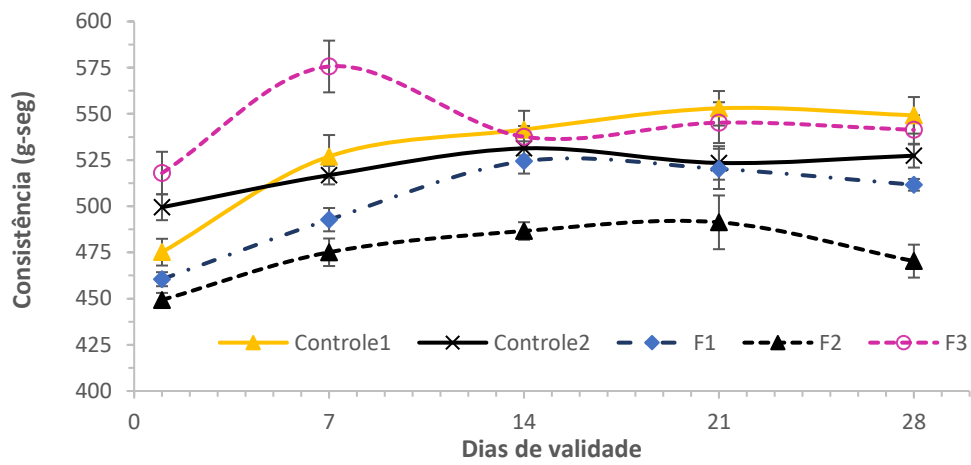
Figura A.5: Variação da consistência (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase I. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

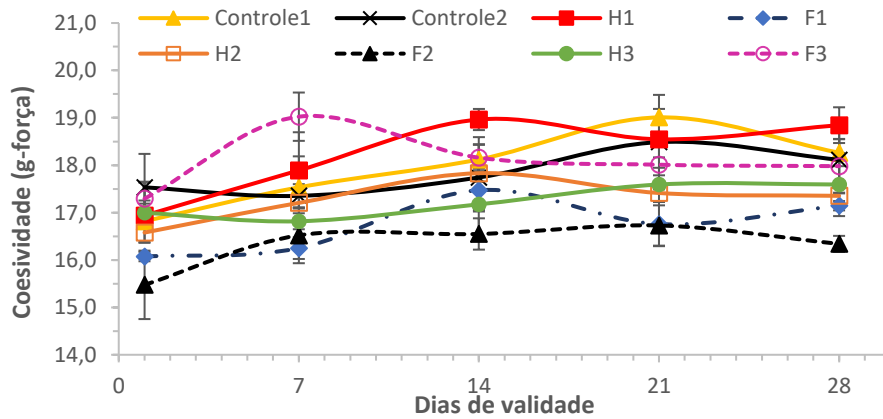


(b)

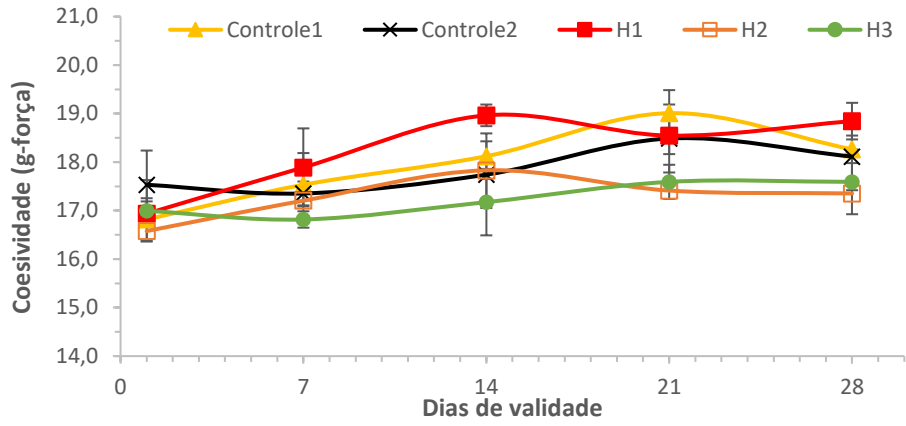


(c)

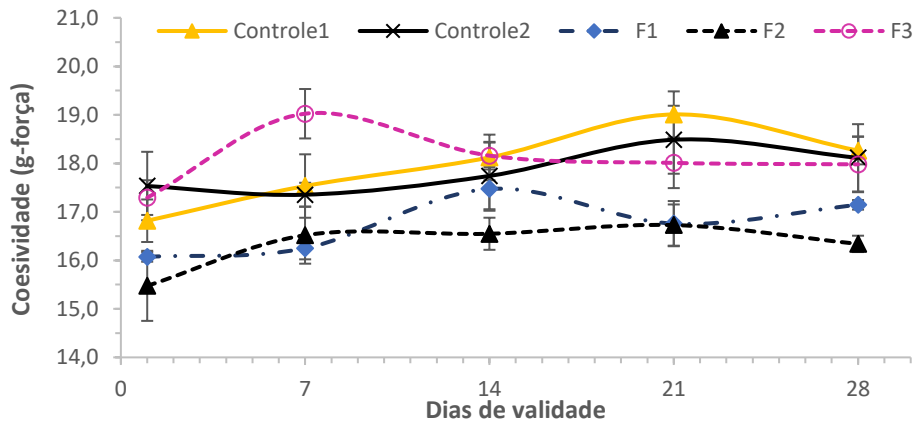
Figura A.6: Variação da coesividade (g-força) em função dos dias de armazenamento – Fase I. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.



(a)

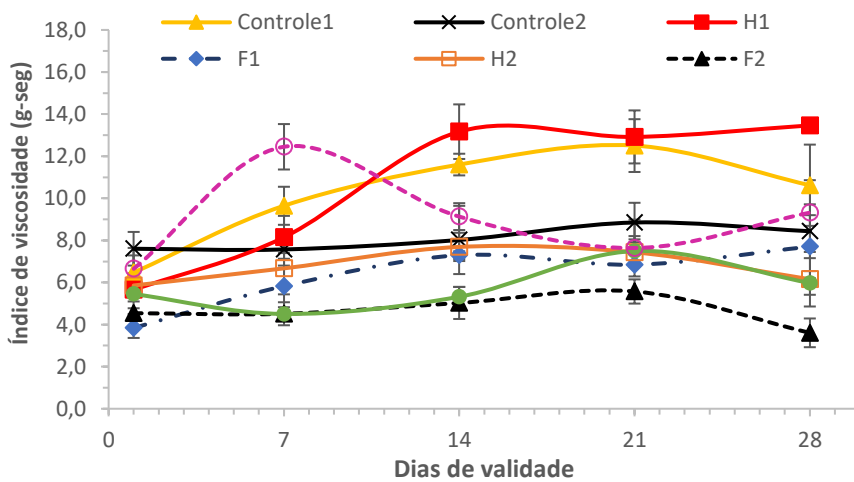


(b)



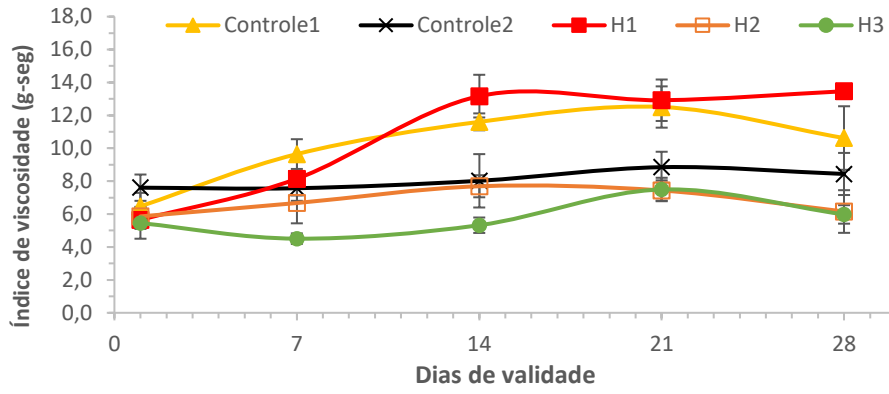
(c)

Figura A.7: Variação do índice de viscosidade (g-seg) em função dos dias de armazenamento – Fase I. (a) Todos os experimentos; (b) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora HOLDBAC-YMB e (c) iogurtes controle1 e controle2 e experimentos contendo a cultura bioprotetora FRESHQ-11.

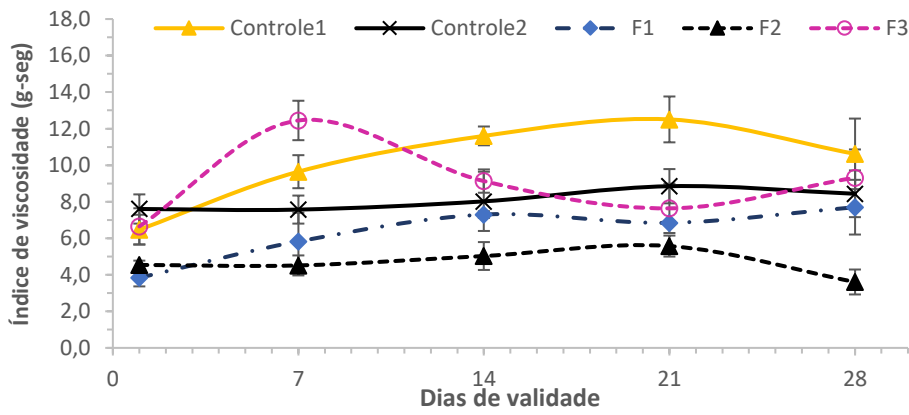


(a)





(b)



(c)

Fase II

Tabela A.3: Variação do pH em função dos dias de validade – Fase II.

<b>DIAS</b>	<b>Controle1</b>	<b>Controle2</b>	<b>H3</b>	<b>F3</b>
1	4,69	4,64	4,59	4,63
7	4,36	4,52	4,51	4,48
14	4,29	4,54	4,51	4,38
21	4,30	4,51	4,43	4,36
28	4,21	4,43	4,41	4,38
<b>Variação (%)</b>	<b>-10,23</b>	<b>-4,53</b>	<b>-3,92</b>	<b>-5,40</b>

Figura A.8: Variação da acidez titulável (%) em função dos dias de armazenamento – Fase II.

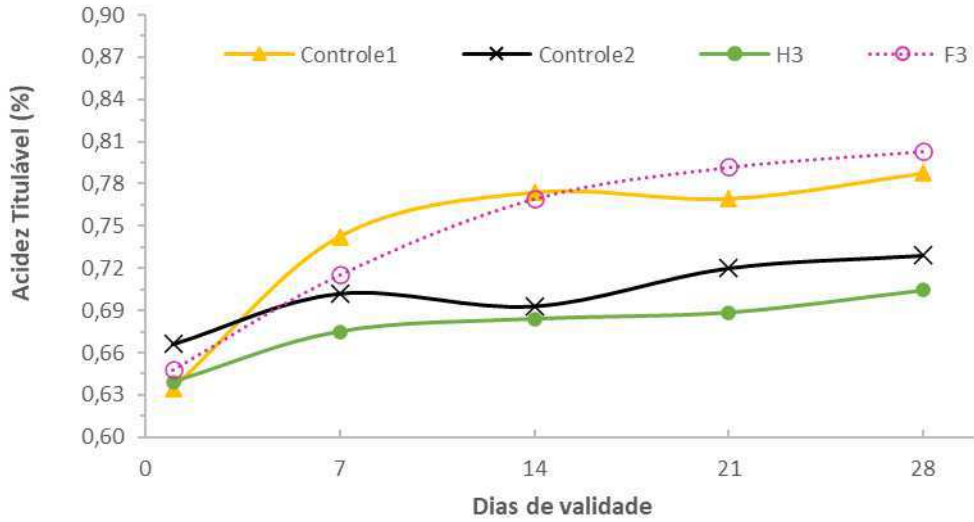
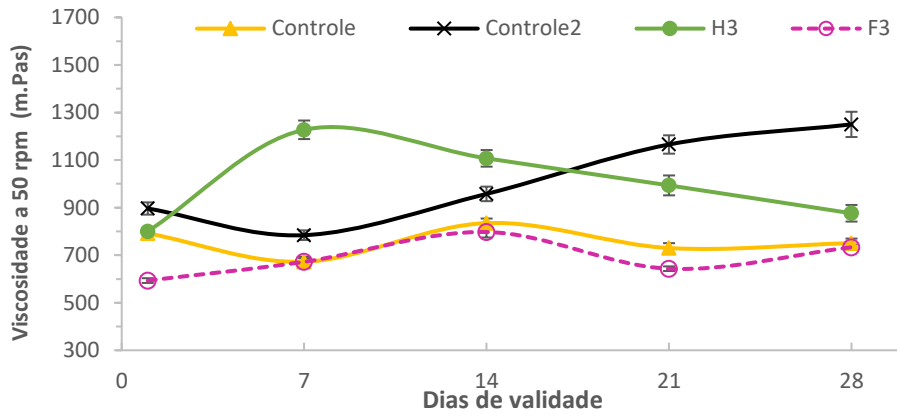
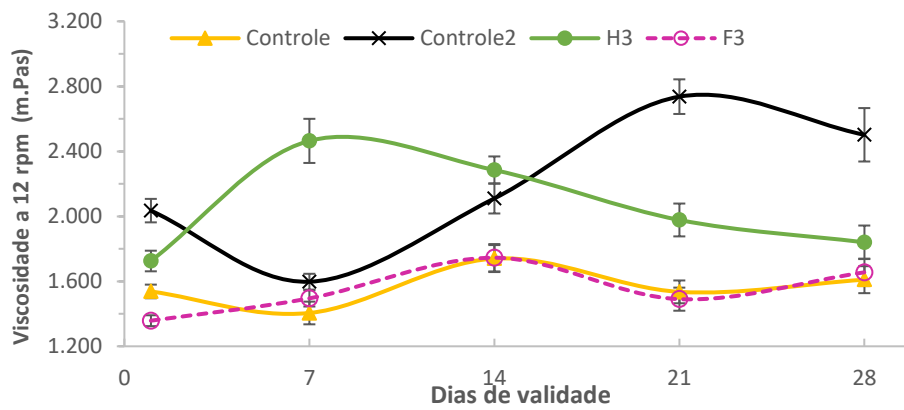


Figura A.9: Variação da viscosidade (m.Pas) em função dos dias de armazenamento – Fase II. (a) 50 rpm; (b) 12 rpm.



(a)



(b)

Figura A.10: Variação da sinérese (%) em função dos dias de armazenamento – Fase II.

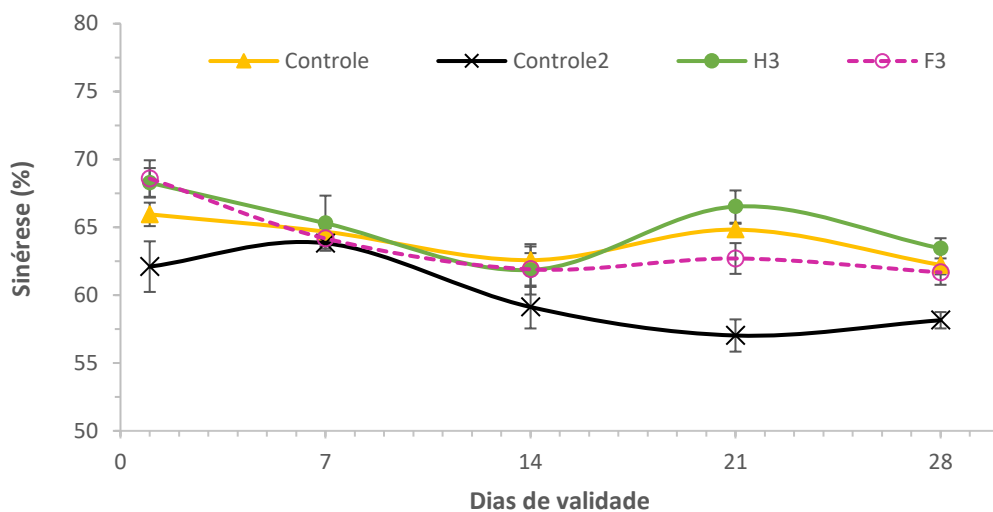
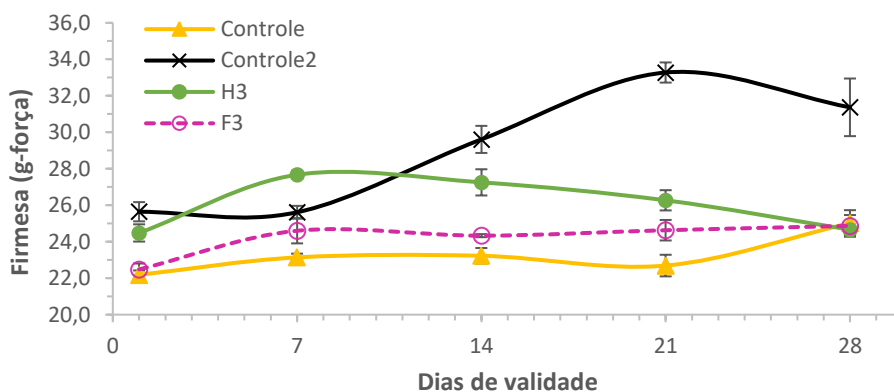
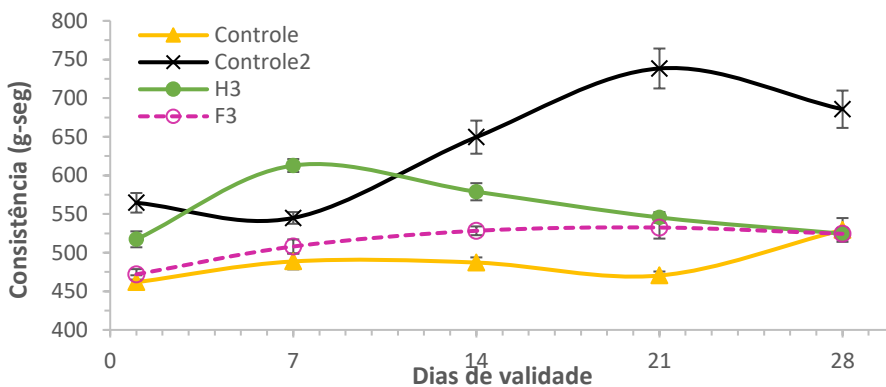


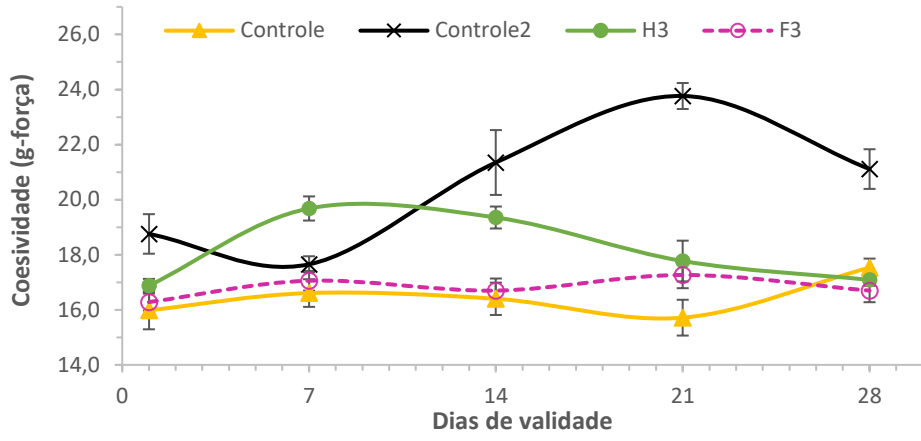
Figura A.11: Variação dos parâmetros da textura em função dos dias de armazenamento. (a) Firmeza (g-força); (b) Consistência (g-seg); (c) Coesividade (g-força); (d) Índice de viscosidade (g-seg).



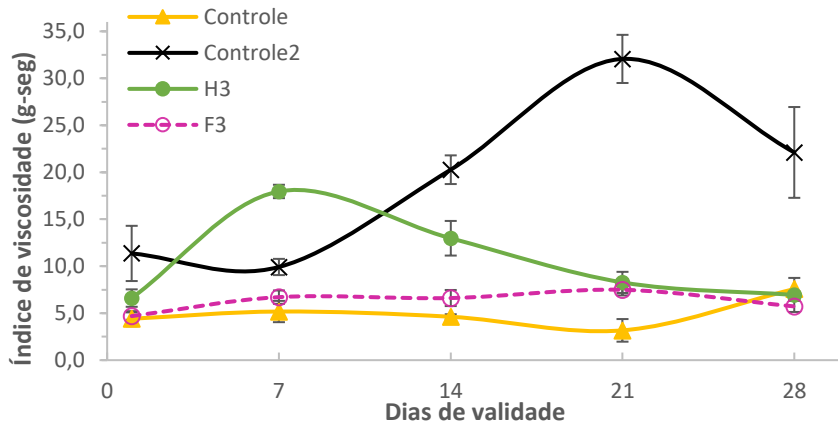
(a)



(b)



(c)

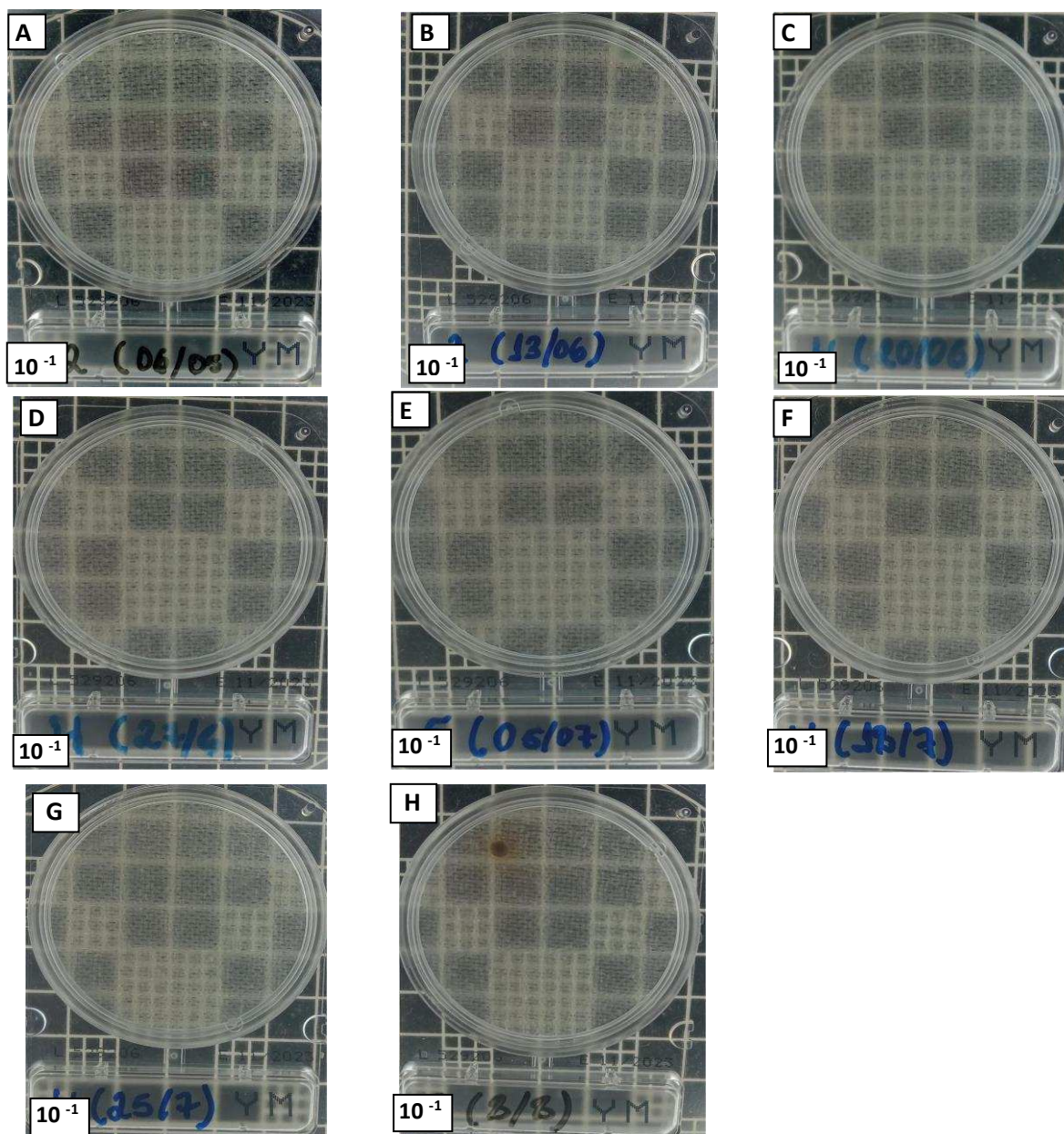


(d)

## APÊNDICE B

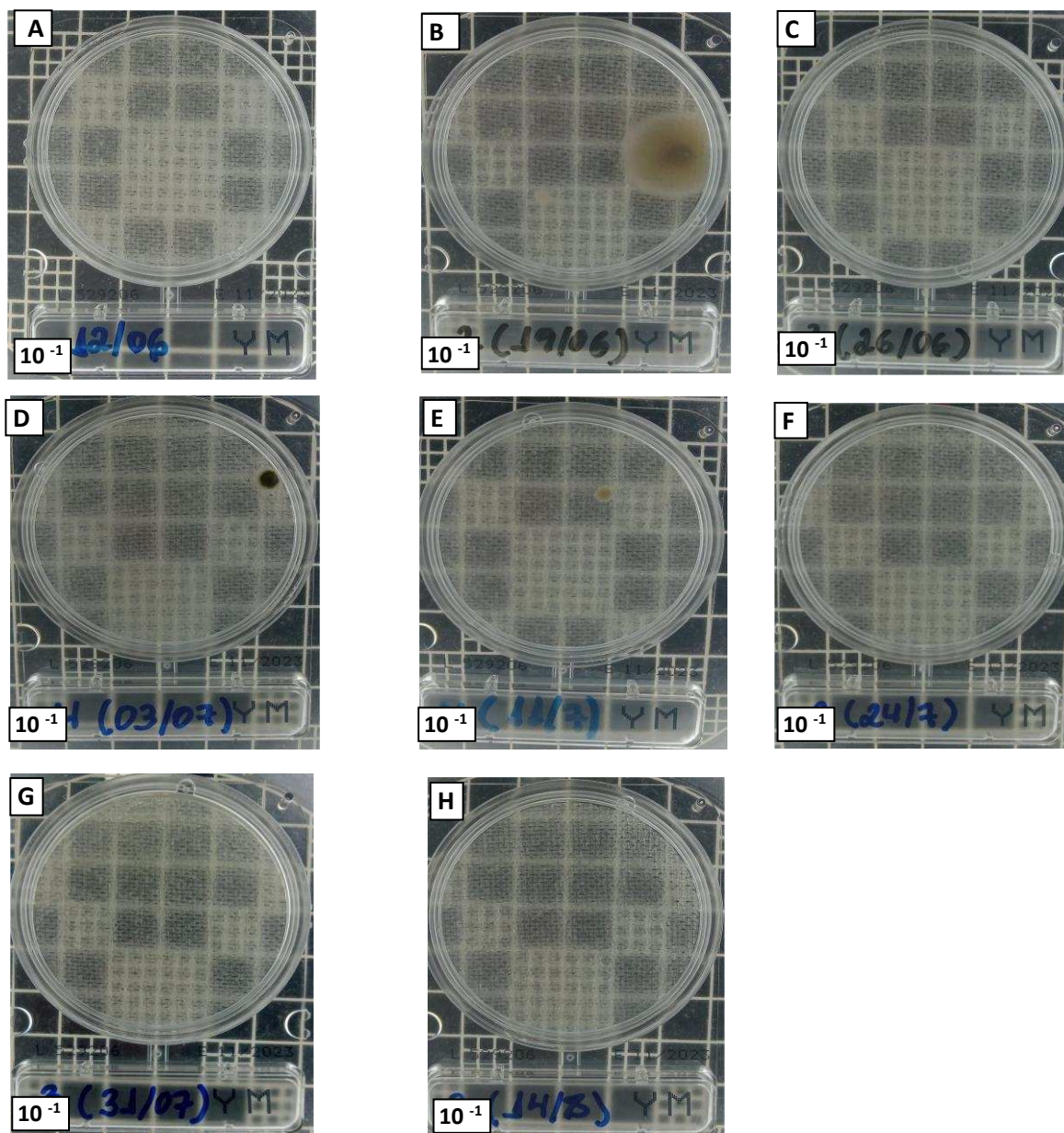
### PLACAS 1 DIA

Figura B.1: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle1 e controle2 conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  (1º dia) – Fase I. A = Controle1, B = H1, C = F1, D = H2, E = F2, F = H3, G = F3, H = Controle2.



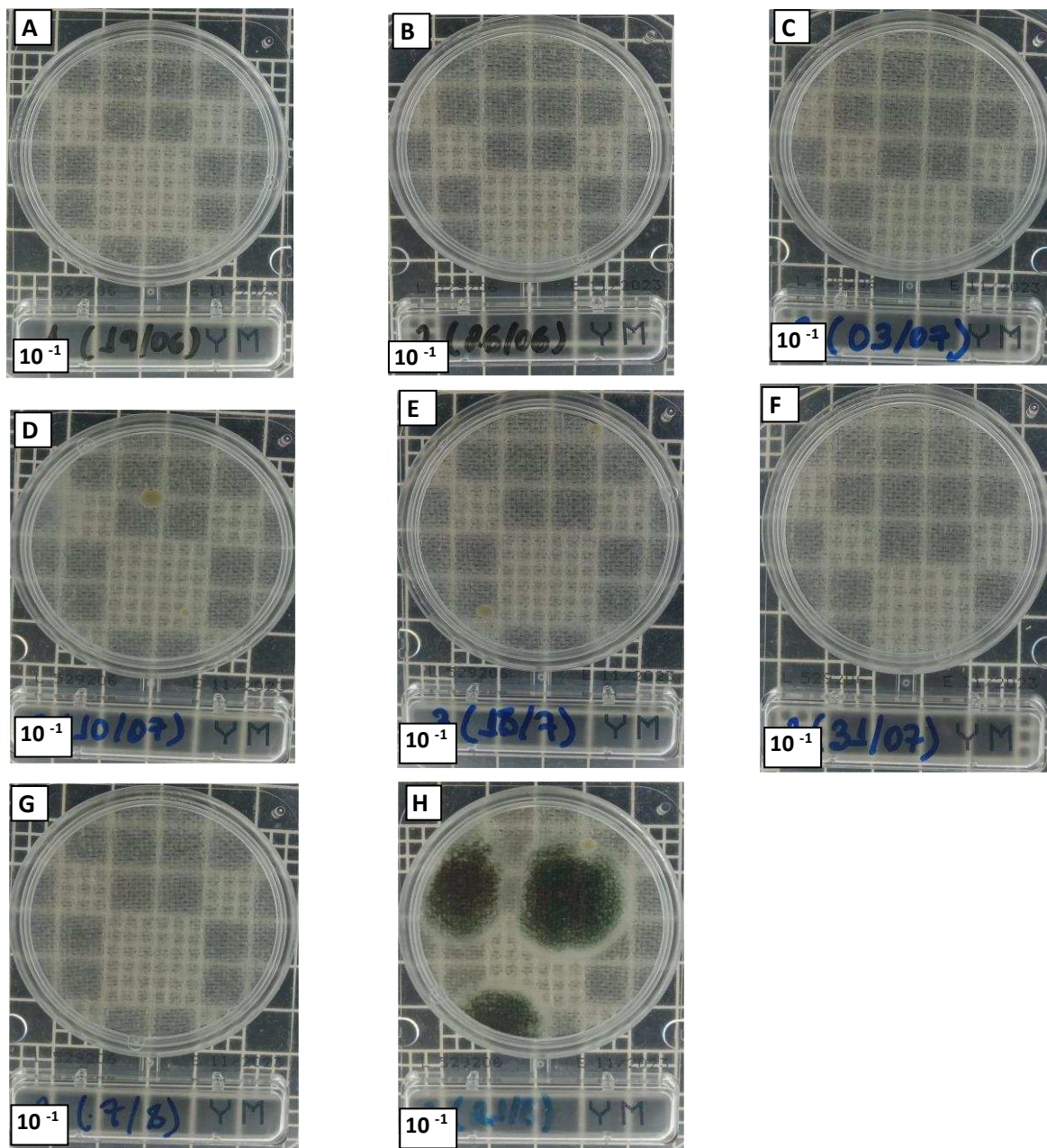
## PLACAS 7 DIAS

Figura B.2: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle1 e controle2 conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  (7º dia) – Fase I. A = Controle1, B = H1, C = F1, D = H2, E = F2, F = H3, G = F3, H = Controle2.



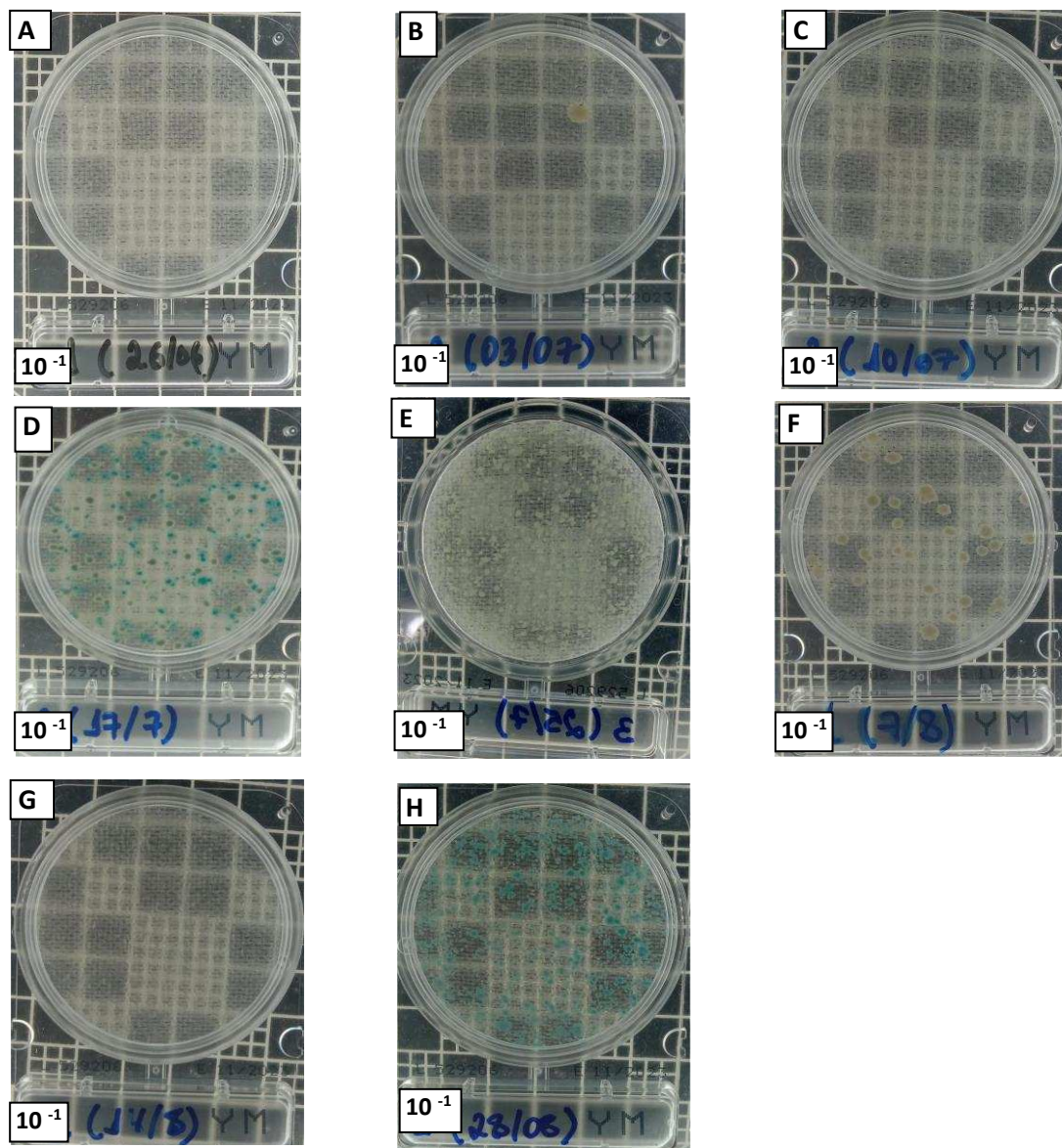
## PLACAS 14 DIAS

Figura B.3: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle1 e controle2 conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  (14° dia) – Fase I. A = Controle1, B = H1, C = F1, D = H2, E = F2, F = H3, G = F3, H = Controle2.



## PLACAS 21 DIAS

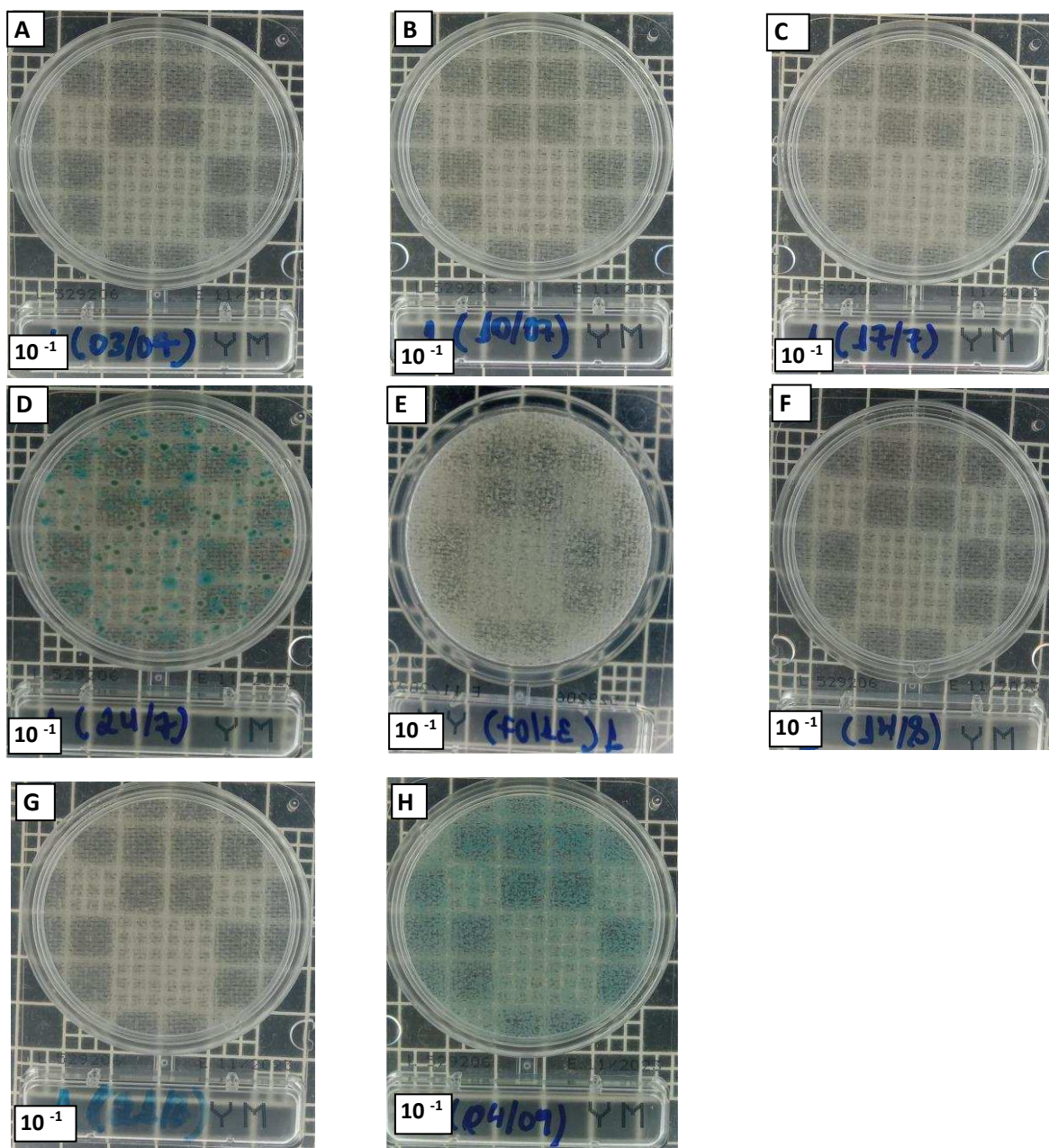
Figura B.4: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle1 e controle2 conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  (21° dia) – Fase I. A = Controle1, B = H1, C = F1, D = H2, E = F2, F = H3, G = F3, H = Controle2.





## PLACAS 28 DIAS

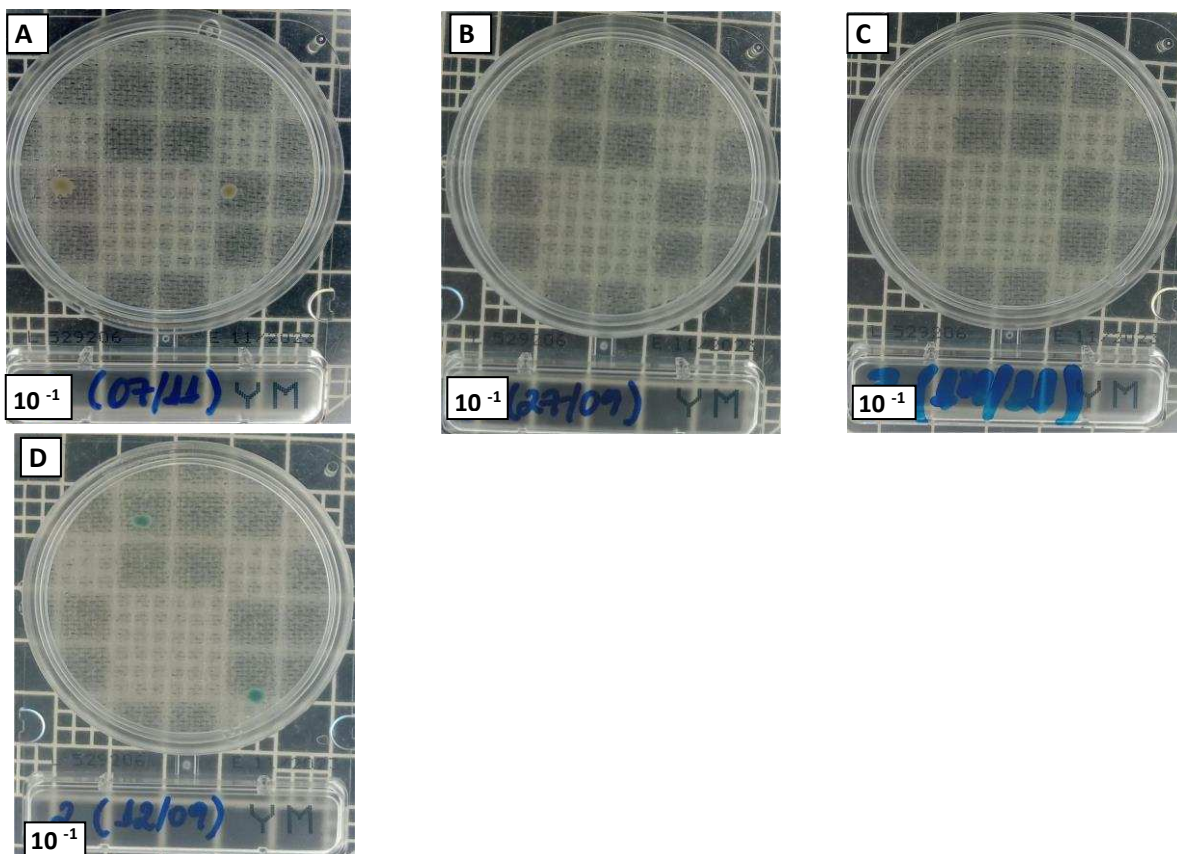
Figura B.5: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle1 e controle2 conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  (28º dia) – Fase I. A = Controle1, B = H1, C = F1, D = H2, E = F2, F = H3, G = F3, H = Controle2.



## APÊNDICE C

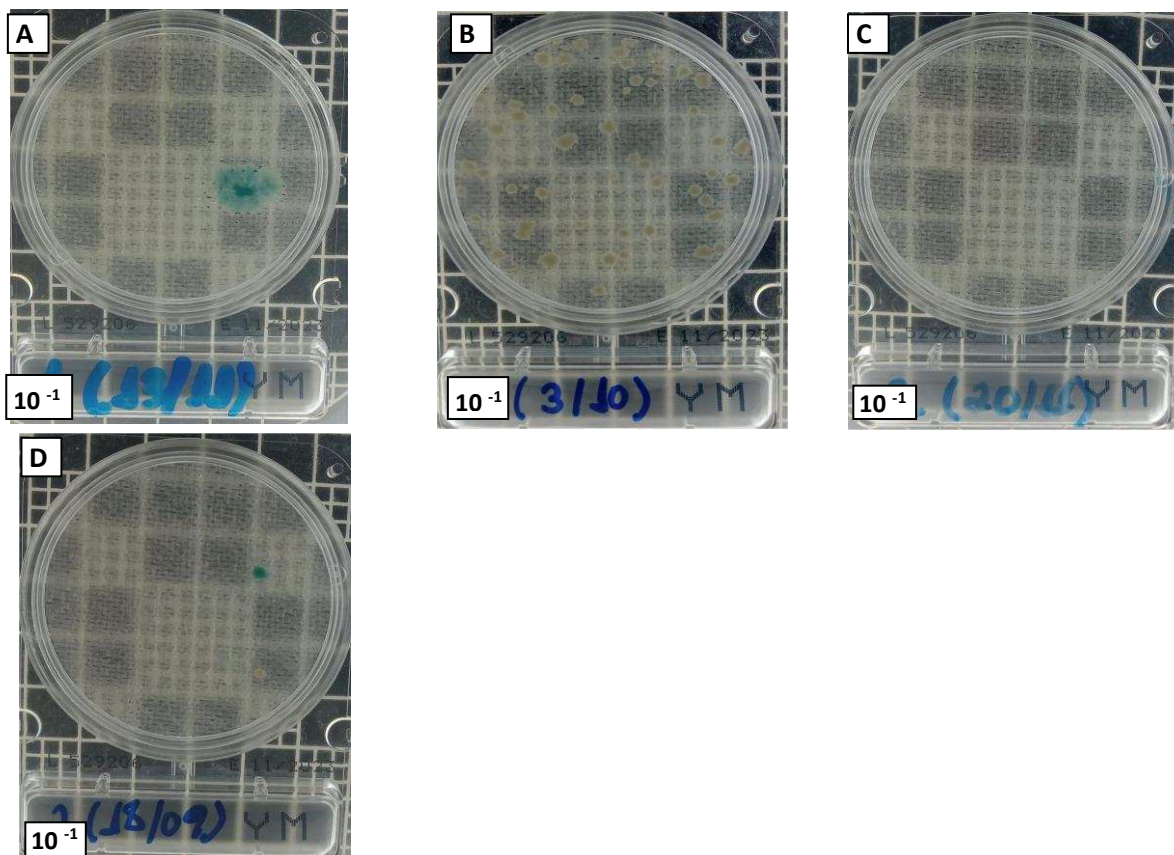
## PLACAS 1 DIA

Figura C.1: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II (1º dia). A = Controle1, B = Controle2, C = H3, D = F3.



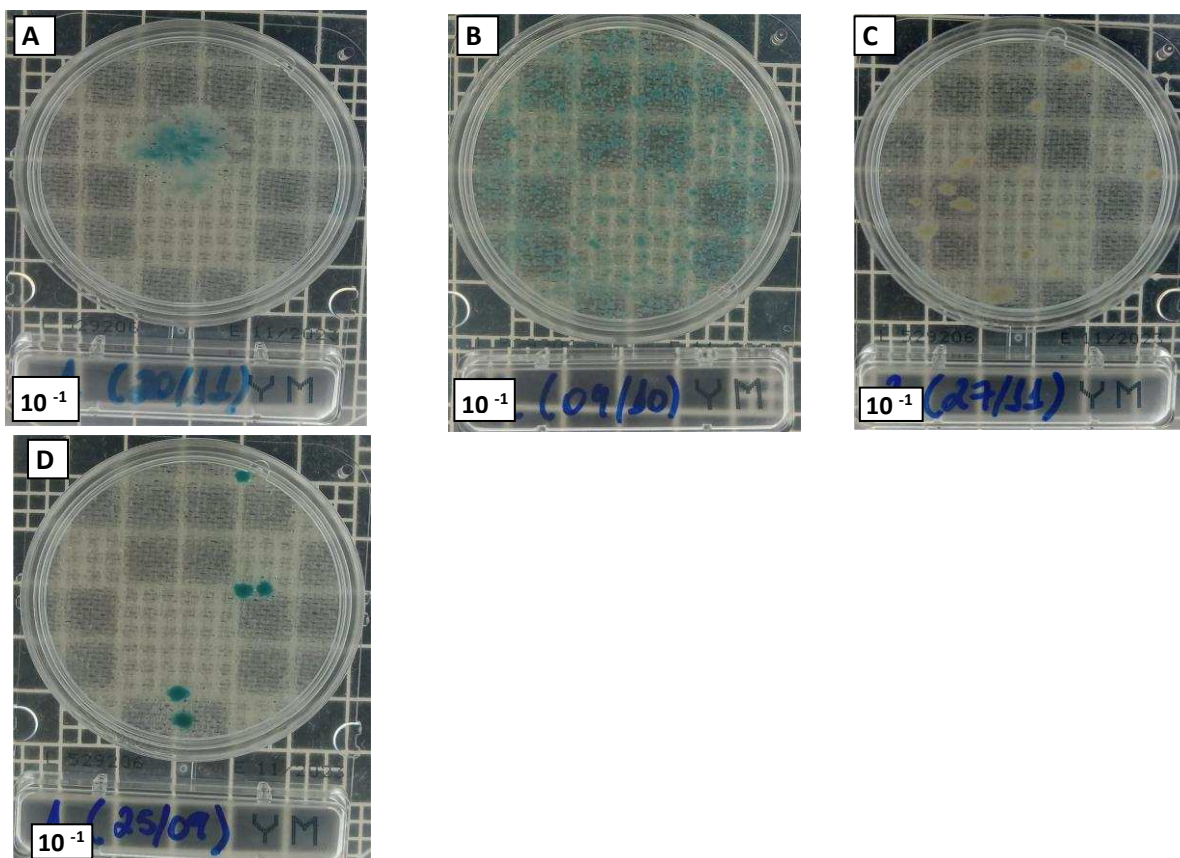
## PLACAS 7 DIAS

Figura C.2: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II (7º dia). A = Controle1, B = Controle2, C = H3, D = F3.



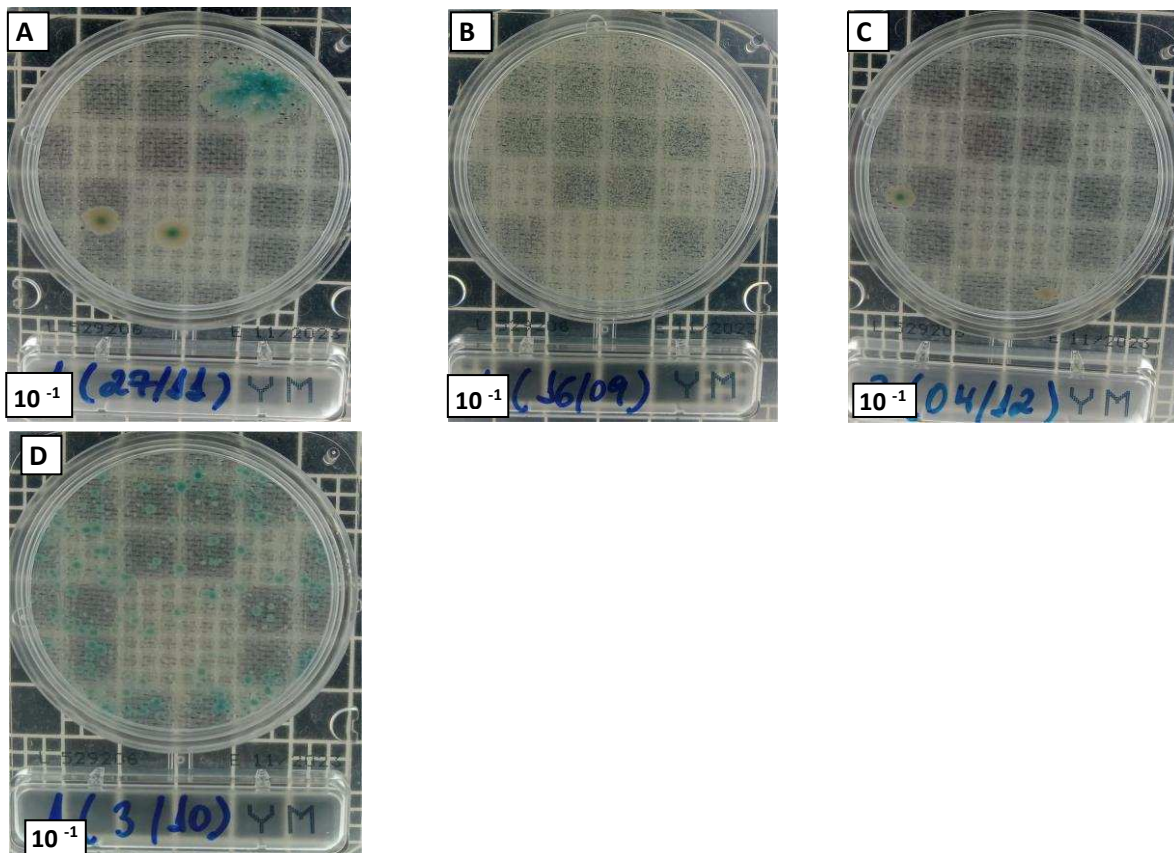
## PLACAS 14 DIAS

Figura C.3: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II (14º dia). A = Controle1, B = Controle2, C = H3, D = F3.



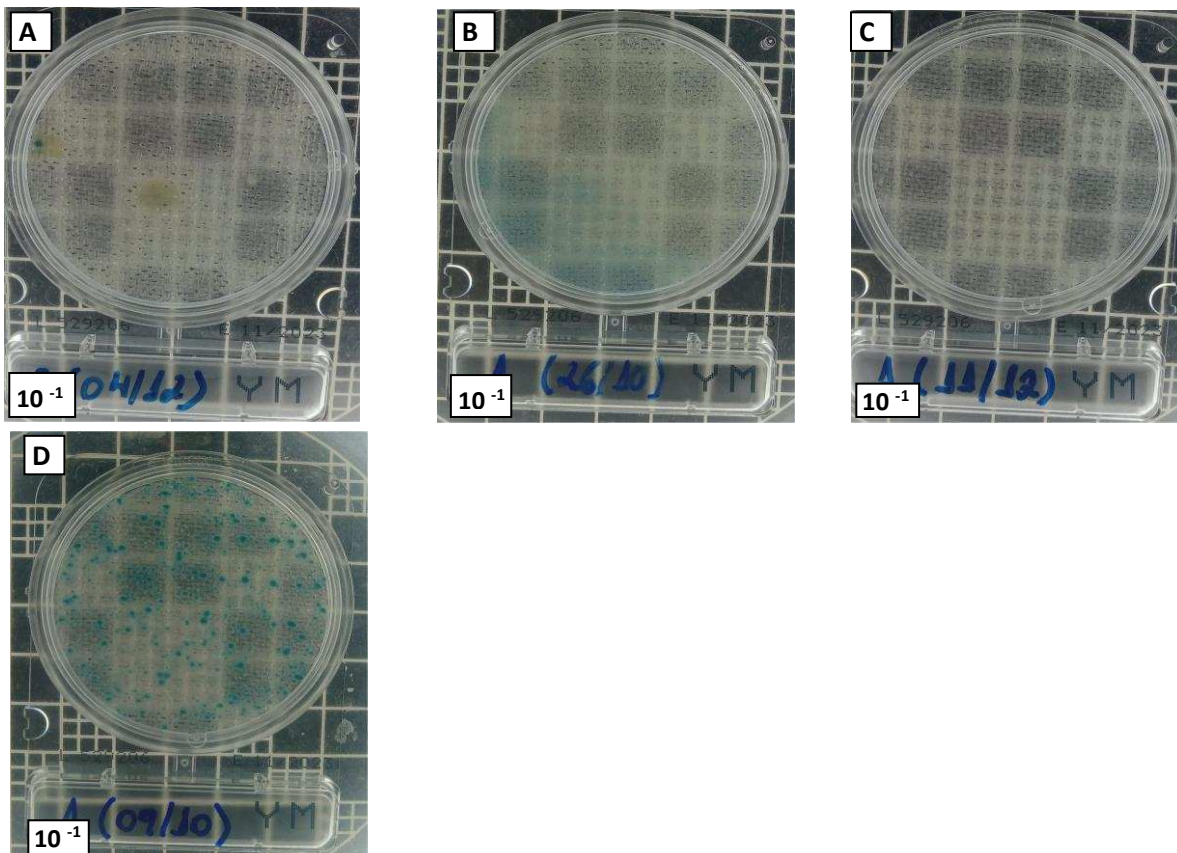
## PLACAS 21 DIAS

Figura C.4: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II (21º dia). A = Controle1, B = Controle2, C = H3, D = F3.



## PLACAS 28 DIAS

Figura C.5: Crescimento de bolores/leveduras em iogurte adicionado de culturas bioprotetoras e amostras controle conservados a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  – Fase II (28º dia). A = Controle1, B = Controle2, C = H3, D = F3.



## **APÊNDICE D**

Arquivo Analise\_Acidez\_Titulavel.TXT
   
Data 01/10/2023 Hora 14:37:12

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE ACIDEZ TITULÁVEL

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	0.06893	0.01723	583.1022 **
Fator2(F2)	7	0.04221	0.00603	204.0352 **
Int. F1xF2	28	0.03366	0.00120	40.6798 **
Tratamentos	39	0.14480	0.00371	125.6331 **
Resíduo	40	0.00118	0.00003	
Total	79	0.14598		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )
   
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )
   
ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	40	3.8283	583.1022	<.0001
7	40	3.1238	204.0352	<.0001
28	40	2.2276	40.6798	<.0001
39	40	2.1211	125.6331	<.0001

Fator 1 = Dias de armazenamento
   
Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.65109	e
2	0.69431	d
3	0.71245	c
4	0.72248	b
5	0.73570	a

dms = 0.00549

Médias do fator 2

1	0.72855	a
2	0.65700	e
3	0.72113	ab
4	0.70605	c



5	0.72045	b
6	0.69930	c
7	0.67770	d
8	0.71550	b

dms = 0.00777

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

		B				
A	B1	B2	B3	B4	B5	
A1	0.6525 eB	0.6255 cDE	0.6345 dCD	0.6143 cE	0.6885 dA	
A2	0.6945 dCD	0.6480 bE	0.6908 cD	0.7200 bAB	0.7335 abA	
A3	0.7260 cBC	0.6660 aE	0.7436 bA	0.7358 aABC	0.7425 aAB	
A4	0.7725 bA	0.6660 aE	0.7661 aA	0.7470 aB	0.7133 cCD	
A5	0.7973 aA	0.6795 aD	0.7706 aB	0.7133 bC	0.7245 bcC	

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

		B		
A	B6	B7	B8	
A1	0.6818 bA	0.6480 cBC	0.6638 dB	
A2	0.7088 aBC	0.6615 cE	0.6975 cCD	
A3	0.6795 bDE	0.6840 bD	0.7223 bC	
A4	0.7065 aD	0.6795 bE	0.7290 bC	
A5	0.7200 aC	0.7155 aC	0.7650 aB	

dms para colunas = 0.0155      dms para linhas = 0.0174  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.70321

CV% = 0.77

Ponto médio = 0.70650

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98779	0.65070	Sim

DADOS

.65100	.65400
.62100	.63000
.63450	.63450
.61200	.61650
.69300	.68400
.68400	.67950
.64800	.64800
.66600	.66150
.69450	.69450
.64800	.64800
.69300	.68850
.72000	.72000
.73350	.73350
.70650	.71100
.65700	.66600
.69300	.70200
.72900	.72300
.66600	.66600
.74025	.74700
.73800	.73350
.74250	.74250
.68400	.67500
.68400	.68400
.72000	.72450
.77700	.76800
.66600	.66600
.76725	.76500
.74700	.74700
.72900	.69750
.71100	.70200
.67500	.68400
.72900	.72900
.80100	.79350
.68400	.67500
.76950	.77175
.70650	.72000
.72900	.72000
.72000	.72000
.72000	.71100
.76500	.76500

-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes

de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação    GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado      QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F      MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

=====
   
ASSISTAT Versão 7.7 pt (2023) - Homepage <http://www.assistat.com>
  
Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 01/03/2017
   
=====
   
Arquivo Analise\_Viscosidade.TXT Data 05/10/2023 Hora 22:11:24

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	158832.85633	39708.21408	32.8172 **
Fator2(F2)	5	1349350.00467	269870.00093	223.0366 **
Int. F1xF2	20	1366854.14867	68342.70743	56.4825 **
Tratamentos	29	2875037.00967	99139.20723	81.9345 **
Resíduo	90	108898.25000	1209.98056	
Total	119	2983935.25967		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )
   
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )
   
ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Fator 1 = Dias de armazenamento
   
Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	872.65420	b
2	935.05830	a
3	883.42910	b
4	893.81250	b
5	822.20420	c

dms = 27.97563

Médias do fator 2

1	742.96500	e
2	776.46000	d
3	1058.75000	a
4	849.57000	c
5	933.44500	b
6	927.40000	b

dms = 32.04582

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	795.8500 aC	733.0000 bC	1116.5000 aA	597.9250 dD
A2	694.1000 bD	766.6500 abC	1010.0000 bB	798.3500 cC
A3	760.1500 abCD	818.9500 aC	1082.0000 aA	911.3750 bB
A4	716.8250 bC	760.6000 abC	1097.7500 aA	1083.5000 aA
A5	747.9000 abCD	803.1000 aBC	987.5000 bA	856.7000 bcB

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B	
	B5	B6
A1	981.3500 bB	1011.3000 bB
A2	1152.5000 aA	1188.7500 aA
A3	982.7000 bB	745.4000 dD
A4	837.4500 cB	866.7500 cB
A5	713.2250 dD	824.8000 cB

dms para colunas = 68.5260      dms para linhas = 71.6566  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 881.43167

CV% = 3.95

Ponto médio = 935.30000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94790	0.00015	Não

DADOS

808.6	799.0	789.4	786.4
763.0	731.8	724.6	712.6
1132.0	1118.0	1110.0	1106.0
609.5	599.9	592.7	589.6
1022.0	993.4	962.2	947.8
1070.0	1020.0	993.0	962.2
700.7	698.3	691.1	686.3
806.4	772.6	751.0	736.6
1016.0	1012.0	1008.0	1004.0

825.2	803.8	789.4	775.0
1205.0	1171.0	1130.0	1104.0
1281.0	1197.0	1152.0	1125.0
779.8	760.6	753.4	746.8
868.6	830.8	801.4	775.0
1120.0	1086.0	1068.0	1054.0
967.0	919.8	890.4	868.3
1013.0	981.4	974.2	962.2
779.8	755.8	731.2	714.8
739.0	719.8	707.8	700.7
806.2	772.6	743.8	719.8
1161.0	1111.0	1075.0	1044.0
1147.0	1099.0	1056.0	1032.0
871.2	844.6	825.4	808.6
928.6	875.6	844.6	818.2
767.8	753.4	739.0	731.4
866.2	811.0	782.2	753.0
1063.0	1001.0	959.8	926.2
890.2	861.4	844.6	830.6
729.4	715.0	707.8	700.7
878.6	839.8	801.4	779.4

-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação    GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado        QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F        MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Sinerese\_Dias\_X\_Iogurte.TXT
   
Data 04/10/2023 Hora 11:33:45

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE SINERESE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	1526.19925	381.54981	95.2032 **
Fator2(F2)	7	1444.06242	206.29463	51.4740 **
Int. F1xF2	28	776.98384	27.74942	6.9240 **
Tratamentos	39	3747.24551	96.08322	23.9744 **
Resíduo	120	480.92899	4.00774	
Total	159	4228.17450		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Fator 1 = Dias de armazenamento

Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	67.29375	a
2	68.49726	a
3	64.31187	b
4	61.37246	c
5	60.74375	c

dms = 1.38727

Médias do fator 2

1	60.77420	e
2	70.15385	a
3	65.54950	bc
4	65.06300	bc
5	62.44000	de
6	64.24500	cd
7	60.56000	e
8	66.76500	b

dms = 1.95174



MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	63.5250 aD	75.2500 aA	64.6000 bCD	72.2000 aAB
A2	62.0331 abD	72.0500 abB	69.8800 aB	68.7650 abBC
A3	61.4500 abcBC	68.6250 bcA	68.9700 aA	65.2750 bAB
A4	57.9629 cD	66.6442 cA	64.4225 bAB	59.2750 cCD
A5	58.9000 bcBC	68.2000 bcA	59.8750 cBC	59.8000 cBC

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B5	B6	B7	B8
A1	63.8000 bD	68.7750 aBC	63.9750 aD	66.2250 bCD
A2	71.4250 aB	65.2500 abCD	62.0000 abD	76.5750 aA
A3	60.2750 bcC	63.8500 bcBC	60.3500 abcC	65.7000 bcAB
A4	59.4500 cCD	62.0250 bcBCD	57.7250 cD	63.4750 bcABC
A5	57.2500 cC	61.3250 cBC	58.7500 bcBC	61.8500 cB

dms para colunas = 3.9238      dms para linhas = 4.3642  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 64.44382

CV% = 3.11

Ponto médio = 66.90000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94217	0.00000	Não

DADOS

63.90000	64.60000	62.00000	63.60000
76.70000	74.40000	74.20000	75.70000
66.50000	66.06000	61.24000	64.60000
74.80000	74.20000	68.20000	71.60000
60.60000	63.80000	64.60000	66.20000
69.40000	68.80000	69.10000	67.80000

64.30000	63.90000	63.60000	64.10000
62.10000	69.70000	67.00000	66.10000
64.10000	59.70000	61.73574	62.59672
73.30000	72.10000	73.40000	69.40000
71.42000	68.34000	69.88000	69.88000
61.30000	70.50000	73.10000	70.16000
77.50000	71.40000	76.50000	60.30000
66.60000	64.20000	65.10000	65.10000
61.30000	62.20000	62.20000	62.30000
75.10000	77.60000	76.80000	76.80000
61.80000	61.00000	62.00000	61.00000
69.50000	68.30000	66.70000	70.00000
69.70000	69.72000	69.00000	67.46000
62.80000	66.40000	65.10000	66.80000
60.70000	59.40000	59.60000	61.40000
63.10000	63.10000	65.00000	64.20000
60.30000	59.90000	60.00000	61.20000
67.70000	66.00000	65.70000	63.40000
58.14421	57.07482	58.80405	57.82857
65.70208	66.95877	68.75125	65.16479
64.15000	64.41000	65.10000	64.03000
58.90000	58.90000	60.70000	58.60000
61.20000	58.50000	59.70000	58.40000
61.80000	61.70000	62.30000	62.30000
57.30000	56.20000	58.60000	58.80000
62.50000	64.90000	61.90000	64.60000
60.50000	58.20000	58.40000	58.50000
68.40000	69.40000	67.40000	67.60000
58.60000	59.10000	61.20000	60.60000
58.90000	60.60000	59.60000	60.10000
56.30000	57.40000	57.90000	57.40000
61.40000	62.30000	60.80000	60.80000
58.40000	58.20000	59.80000	58.60000
62.10000	61.10000	62.50000	61.70000
-----			

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação      GL = Graus de liberdade  
 SQ = Soma de quadrado      QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F      MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Firmeza\_Dias\_x\_Iogurtes.TXT
   
Data 30/09/2023 Hora 21:34:22

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	71.82678	17.95670	43.4270 **
Fator2(F2)	7	130.78826	18.68404	45.1860 **
Int. F1xF2	28	52.94607	1.89093	4.5731 **
Tratamentos	39	255.56111	6.55285	15.8476 **
Resíduo	120	49.61900	0.41349	
Total	159	305.18011		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Fator 1 = Dias de armazenamento

Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	22.86240	d
2	24.01037	c
3	24.55453	ab
4	24.78934	a
5	24.25263	bc

dms = 0.44560

Médias do fator 2

1	24.81991	ab
2	24.55752	b
3	24.89743	ab
4	23.49006	cd
5	23.82401	c
6	22.79233	e
7	22.95931	de
8	25.41029	a

dms = 0.62691

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

		B						
A		B1	B2	B3	B4			
A1	22.8102	bBC	24.0029	aAB	22.8102	cBC	21.8561	cCD
A2	25.0763	aB	24.5396	aB	24.4204	bB	22.9891	bcCD
A3	25.1658	aAB	24.7782	aAB	26.0603	aA	24.6887	aAB
A4	25.3149	aAB	24.7185	aABC	25.9709	aA	23.8836	abC
A5	25.7323	aA	24.7483	aAB	25.2254	abAB	24.0327	abBC

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

		B						
A		B5	B6	B7	B8			
A1	22.8699	bBC	21.2299	cD	22.5717	bCD	24.7484	bA
A2	23.8836	abBC	22.1542	bcD	22.1244	bD	26.8952	aA
A3	24.1818	aBC	23.2277	bC	23.2575	abC	25.0763	bAB
A4	24.3309	aBC	24.7185	aABC	24.1818	aBC	25.1956	bABC
A5	23.8538	abBC	22.6313	bC	22.6611	bC	25.1360	bAB

dms para colunas = 1.2603      dms para linhas = 1.4018  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 24.09386

CV% = 2.67

Ponto médio = 24.27127

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.99066	0.37642	Sim

DADOS

23.01894	23.73456	22.30333	22.18406
23.85383	24.33090	23.97310	23.85383
22.78041	23.01894	23.01894	22.42260
21.22991	22.06479	21.94552	22.18406
23.25748	23.37675	23.13821	21.70698
21.46844	21.34918	20.87210	21.22991

22.54187	22.06479	23.13821	22.54187
24.92725	24.21164	25.16579	24.68871
26.00067	25.10615	25.16579	24.03273
24.68871	25.40433	24.21164	23.85383
25.52360	24.56944	24.09237	23.49602
23.97310	22.66114	23.01894	22.30333
24.68871	23.37675	24.21164	23.25748
22.42260	22.89968	21.82625	21.46844
22.06479	22.18406	22.06479	22.18406
27.31263	26.83556	27.31263	26.11994
25.37451	25.55341	24.74835	24.98689
25.64286	24.33090	24.68871	24.45017
25.76213	26.23921	26.71629	25.52360
25.88140	24.45017	24.21164	24.21164
23.97310	24.68871	24.09237	23.97310
23.37675	22.66114	23.73456	23.13821
23.25748	23.25748	23.61529	22.89968
24.56944	25.40433	25.40433	24.92725
25.58323	25.28506	24.86761	25.52360
24.45017	24.92725	24.21164	25.28506
26.47775	26.47775	25.76213	25.16579
23.85383	24.33090	23.61529	23.73456
24.21164	24.09237	24.09237	24.92725
24.33090	27.67044	23.61529	23.25748
24.45017	24.33090	24.21164	23.73456
25.76213	25.28506	25.40433	24.33090
26.23921	25.88140	25.40433	25.40433
25.04652	24.62908	24.45017	24.86761
25.28506	24.92725	24.68871	26.00067
24.21164	23.73456	25.04652	23.13821
25.52360	22.66114	24.45017	22.78041
23.25748	22.78041	22.18406	22.30333
22.89968	22.54187	22.42260	22.78041
25.04652	25.28506	24.56944	25.64286

-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação      GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado      QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F      MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

=====
   
ASSISTAT Versão 7.7 pt (2023) - Homepage <http://www.assistat.com>
  
Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 01/03/2017
   
=====

Arquivo Analises\_Constistencia\_Dias\_X\_Iogurtes.TXT
   
Data 08/10/2023 Hora 15:04:55

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE CONSISTÊNCIA

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	48441.20903	12110.30226	126.7303 **
Fator2(F2)	7	89025.86391	12717.98056	133.0894 **
Int. F1xF2	28	23856.81930	852.02926	8.9162 **
Tratamentos	39	161323.89224	4136.51006	43.2872 **
Resíduo	120	11467.16056	95.55967	
Total	159	172791.05280		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05)

ns não significativo (p >= .05)

Fator 1 = Dias de armazenamento

Fator 2 = Tipos de iogurtes

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	477.96860	d
2	509.83640	c
3	522.83880	ab
4	526.80030	a
5	516.63270	b

dms = 6.77405

Médias do fator 2

1	529.14750	bc
2	519.66670	c
3	535.19070	ab
4	501.87790	d
5	501.55420	d
6	474.51060	e
7	481.02500	e
8	543.55030	a

dms = 9.53035



MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	475.1409 cCD	499.4446 bAB	474.5040 cCD	460.5084 cDE
A2	526.9182 bB	516.8040 abB	522.0176 bB	492.7206 bCD
A3	541.4735 abAB	531.2962 aBC	560.7807 aA	524.3547 aBC
A4	553.0032 aA	523.4271 aB	559.0585 aA	520.2074 aB
A5	549.2015 aA	527.3617 aBC	559.5925 aA	511.5981 abCD

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B5	B6	B7	B8
A1	485.5517 cBC	449.2991 cE	461.3214 dDE	517.9789 cA
A2	505.6731 abBC	475.0837 abDE	463.8425 cdE	575.6314 aA
A3	512.3689 aC	486.5936 abD	488.2573 bD	537.5855 bB
A4	511.2546 abBC	491.2869 aC	510.9327 aBC	545.2317 bA
A5	492.9228 bcDE	470.2897 bF	480.7711 bcEF	541.3239 bAB

dms para colunas = 19.1599      dms para linhas = 21.3105  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 510.81535

CV% = 1.91

Ponto médio = 518.19100

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98533	0.08966	Sim

DADOS

475.6456	485.2446	474.8965	464.7768
499.2895	508.9331	500.3629	489.1929
465.6033	491.6074	467.2888	473.5166
455.2978	463.3134	464.8510	458.5712
501.5394	488.0589	483.7373	468.8713
453.1121	443.0314	450.0826	450.9702

476.3065	466.4716	447.8430	454.6647
537.2817	510.1599	515.9652	508.5090
539.1680	523.6799	533.3553	511.4696
522.4446	518.5555	517.4592	508.7566
529.7477	522.5794	525.6408	510.1024
501.4418	492.5982	493.2058	483.6368
503.1526	505.1465	501.0079	513.3852
485.7913	477.1357	471.9957	465.4120
471.8091	463.9779	462.8826	456.7004
593.3506	575.4147	579.4694	554.2910
555.7796	544.0599	536.4818	529.5727
537.7111	530.1246	527.5856	529.7635
573.4387	551.8101	574.3403	543.5336
531.0284	521.8855	529.9808	514.5242
519.3556	509.0228	515.7123	505.3849
485.0285	482.6474	483.9937	494.7048
498.6886	489.2534	478.2547	486.8323
543.3368	541.7355	536.9139	528.3558
563.2689	556.1088	544.1021	548.5332
522.6805	513.6101	519.3265	538.0913
573.6025	555.7241	551.6484	555.2592
538.1989	517.6281	516.0623	508.9403
519.3219	519.2272	507.2512	499.2182
509.9524	475.7729	500.9120	478.5102
521.8426	515.6019	506.3102	499.9762
550.1843	542.8278	559.0247	528.8900
562.6122	548.8543	549.2032	536.1365
530.1958	521.8674	523.4561	533.9274
561.0833	558.3971	562.9141	555.9755
514.4142	512.7645	512.9999	506.2140
513.7046	488.3117	486.4559	483.2191
484.4426	460.8323	470.8543	465.0297
486.3765	482.5785	478.9369	475.1926
553.2462	536.5227	532.3724	543.1543
-----			

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação      GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado      QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F      MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

=====
   
ASSISTAT Versão 7.7 pt (2023) - Homepage <http://www.assistat.com>
  
Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 01/03/2017
   
=====
   
Arquivo Analise\_Coesividade.TXT Data 22/11/2023 Hora 19:42:50

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	27.18796	6.79699	22.9319 **
Fator2(F2)	7	65.79552	9.39936	31.7118 **
Int. F1xF2	28	19.00515	0.67876	2.2900 **
Tratamentos	39	111.98864	2.87150	9.6880 **
Resíduo	120	35.56790	0.29640	
Total	159	147.55654		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )
   
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )
   
ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Fator 1 = Dias de validade
   
Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	16.71259	c
2	17.32384	b
3	17.75153	a
4	17.81769	a
5	17.70401	a
dms =	0.37727	

Médias do fator 2

1	17.94851	a
2	17.84564	a
3	18.23625	a
4	16.73943	cd
5	17.27614	b
6	16.32198	d
7	17.23439	bc
8	18.09313	a
dms =	0.53077	

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	16.8170 cAB	17.5326 abA	16.9362 cAB	16.0715 cBC
A2	17.5326 bcBC	17.3537 bBCD	17.8904 bcAB	16.2504 bcD
A3	18.1215 abAB	17.7413 abB	18.9638 aA	17.4729 aBC
A4	19.0085 aA	18.4867 aAB	18.5464 abAB	16.7573 abcC
A5	18.2631 abAB	18.1140 abAB	18.8445 abA	17.1449 abBC

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B5	B6	B7	B8
A1	16.5784 bABC	15.4752 bc	16.9959 aAB	17.2940 bA
A2	17.2046 abBCD	16.5188 abCD	16.8170 aBCD	19.0234 aA
A3	17.8307 aAB	16.5486 aC	17.1748 aBC	18.1587 abAB
A4	17.4133 abBC	16.7275 aC	17.5922 aBC	18.0096 abAB
A5	17.3537 abBC	16.3399 abC	17.5922 aB	17.9798 abAB

dms para colunas = 1.0671      dms para linhas = 1.1868  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 17.46193

CV% = 3.12

Ponto médio = 17.17476

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98788	0.18182	Sim

DADOS

17.53256	16.69768	16.33987	16.69768
16.45914	17.89037	18.36745	17.41329
17.17476	16.57841	16.81695	17.17476
15.98207	16.10133	16.22060	15.98207
17.41329	15.86280	16.33987	16.69768
16.45914	14.67010	15.86280	14.90864
17.53256	16.69768	17.65183	16.10133

17.41329	17.65183	16.69768	17.41329
17.41329	18.30781	17.77110	16.63804
16.93622	17.41329	17.53256	17.53256
17.17476	19.20233	17.89037	17.29403
16.57841	15.98207	16.33987	16.10133
17.29403	16.81695	17.53256	17.17476
17.53256	16.22060	16.10133	16.22060
16.81695	16.81695	17.05549	16.57841
19.67941	18.72525	18.36745	19.32160
18.30781	18.39726	18.18854	17.59220
18.72525	17.89037	17.53256	16.81695
18.84452	18.72525	19.32160	18.96379
16.81695	17.89037	17.29403	17.89037
17.89037	18.36745	17.89037	17.17476
16.81695	16.93622	16.22060	16.22060
17.05549	17.05549	18.24818	16.33987
18.48672	18.00964	17.77110	18.36745
19.44087	19.14270	18.42708	19.02343
19.44087	18.84452	17.65183	18.00964
18.48672	18.60599	19.08306	18.00964
15.98207	17.17476	16.81695	17.05549
17.65183	17.77110	17.29403	16.93622
16.81695	17.29403	16.10133	16.69768
17.77110	17.53256	17.05549	18.00964
18.12891	18.12891	17.17476	18.60599
18.36745	17.89037	18.30781	18.48672
19.08306	18.36745	17.59220	17.41329
19.08306	18.60599	18.36745	19.32160
17.17476	17.29403	17.05549	17.05549
16.93622	17.53256	17.05549	17.89037
16.57841	16.10133	16.33987	16.33987
17.29403	18.48672	16.69768	17.89037
17.53256	17.77110	17.65183	18.96379

-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação	GL = Graus de liberdade
SQ = Soma de quadrado	QM = Quadrado médio
F = Estatística do teste F	MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Indice\_Viscosidade.TXT
   
Data 14/01/2024 Hora 17:41:06

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	174.99780	43.74945	39.4949 **
Fator2(F2)	7	656.02665	93.71809	84.6042 **
Int. F1xF2	28	273.30023	9.76072	8.8115 **
Tratamentos	39	1104.32468	28.31602	25.5624 **
Resíduo	120	132.92682	1.10772	
Total	159	1237.25150		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	5.76041	c
2	7.41511	b
3	8.40726	a
4	8.65505	a
5	8.16380	a

dms = 0.72933

Médias do fator 2

1	10.17083	a
2	8.09608	b
3	10.67110	a
4	6.29939	c
5	6.76584	c
6	4.65215	d
7	5.74989	c
8	9.03732	b

dms = 1.02609



MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	6.4797 cAB	7.6023 aA	5.6501 cABC	3.8376 bc
A2	9.6448 bB	7.5702 aBCD	8.1351 bBC	5.8256 abDE
A3	11.6026 abA	8.0215 aB	13.1753 aA	7.2975 aBC
A4	12.5060 aA	8.8504 aB	12.9129 aA	6.8345 aBC
A5	10.6210 abB	8.4360 aBCD	13.4822 aA	7.7016 aCDE

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B5	B6	B7	B8
A1	5.8687 aABC	4.5311 aBC	5.4630 abABC	6.6508 cAB
A2	6.6786 aCDE	4.5138 aE	4.5040 bE	12.4488 aA
A3	7.6907 aB	5.0283 aC	5.3111 bC	9.1311 bB
A4	7.4252 aBC	5.5796 aC	7.4931 aBC	7.6387 bcBC
A5	6.1660 aDE	3.6080 aF	5.9783 abE	9.3173 bBC

dms para colunas = 2.0629      dms para linhas = 2.2944  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 7.68032

CV% = 13.70

Ponto médio = 8.74279

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.94586	0.00001	Não

DADOS

7.069798	7.026861	5.322266	6.500000
7.600000	8.705216	6.834122	7.269931
5.079911	5.132390	6.060065	6.327943
4.242880	3.733840	4.266496	3.107200
6.154288	6.372312	5.900000	5.048186
4.352369	4.400000	4.500000	4.871906

6.728449	5.166262	5.500000	4.457088
8.221222	6.600593	6.284530	5.496876
10.745430	9.948835	9.641598	8.243167
8.240543	7.480560	6.350605	8.209056
8.100000	9.426317	8.081200	6.932877
7.256334	6.874673	5.938410	3.233148
4.935119	7.377989	6.700000	7.701447
5.290063	4.378370	4.624542	3.762226
4.085922	4.568008	4.862126	4.500000
13.902250	12.909210	10.989940	11.993700
11.919940	11.947790	10.942820	11.600000
10.319400	8.735749	6.822433	6.208436
12.041890	13.200000	14.983780	12.475550
7.327180	7.566195	7.056201	7.240591
8.287774	8.432567	7.012787	7.029485
3.945662	6.016413	4.782931	5.368065
5.300000	4.854015	5.790278	5.300000
10.068700	9.320406	8.371024	8.764135
13.873980	12.875700	11.514480	11.759940
7.881305	9.642672	7.956683	9.921045
14.697540	11.977250	12.076720	12.900000
6.874912	6.946235	6.800000	6.717000
8.112926	7.566673	6.621107	7.400000
5.128335	5.600000	6.384954	5.205144
7.393733	7.707649	6.444589	8.426365
9.573495	5.854683	7.142552	7.983876
13.527030	9.330305	11.134850	8.491724
9.100354	9.189210	7.389558	8.064741
13.283480	13.645110	13.500000	13.500000
7.413770	9.895045	7.810936	5.686753
7.596013	6.413579	4.454464	6.200000
2.501790	4.370260	3.785603	3.774391
6.665475	5.624017	6.363963	5.259769
11.729170	9.589239	7.810698	8.140119
-----			

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação      GL = Graus de liberdade  
 SQ = Soma de quadrado      QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F      MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

=====
   
ASSISTAT Versão 7.7 pt (2023) - Homepage <http://www.assistat.com>
  
Por Francisco de A. S. e Silva - UFCG-Brasil - Atualiz. 01/03/2017
   
=====
   
Arquivo Analise\_Acidez\_FaseII.TXT Data 16/12/2023 Hora 19:26:24

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	0.05863	0.01466	245.3729 **
Fator2(F2)	3	0.03160	0.01053	176.3390 **
Int. F1xF2	12	0.01473	0.00123	20.5480 **
Tratamentos	19	0.10496	0.00552	92.4781 **
Resíduo	20	0.00119	0.00006	
Total	39	0.10616		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )
   
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )
   
ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	20	4.4307	245.3729	<.0001
3	20	4.9382	176.339	<.0001
12	20	3.2311	20.548	<.0001
19	20	2.9614	92.4781	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade
   
Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	0.64688	e
2	0.70875	d
3	0.73013	c
4	0.74250	b
5	0.75600	a
-----		
dms =	0.01159	

Médias do fator 2

1	0.74160	a
2	0.70200	b
3	0.67815	c
4	0.74565	a
-----		
dms =	0.00968	

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	0.6345 cB	0.6660 dA	0.6390 cB	0.6480 dAB
A2	0.7425 bA	0.7020 bcB	0.6750 bC	0.7155 cB
A3	0.7740 aA	0.6930 cB	0.6840 abB	0.7695 bA
A4	0.7695 aB	0.7200 abC	0.6885 abD	0.7920 abA
A5	0.7875 aA	0.7290 aB	0.7043 aC	0.8033 aA

dms para colunas = 0.0232      dms para linhas = 0.0216  
 Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.71685

CV% = 1.08

Ponto médio = 0.72000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.95295	0.09579	Sim

DADOS

```

.6390 .6300
.6660 .6660
.6390 .6390
.6480 .6480
.7380 .7470
.6930 .7110
.6660 .6840
.7110 .7200
.7830 .7650
.6930 .6930
.6750 .6930
.7650 .7740
.7740 .7650
.7200 .7200
.6840 .6930
.7830 .8010
.7920 .7830
.7290 .7290
.7020 .7065
.8100 .7965
  
```

-----

## OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

## SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação    GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado        QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F    MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

## REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Viscosidade\_50rpm\_FaseII.TXT
   
Data 16/12/2023 Hora 22:44:29

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	238112.82800	59528.20700	58.1724 **
Fator2(F2)	3	1659964.77037	553321.59012	540.7188 **
Int. F1xF2	12	991025.95900	82585.49658	80.7045 **
Tratamentos	19	2889103.55737	152058.08197	148.5947 **
Resíduo	60	61398.45250	1023.30754	
Total	79	2950502.00987		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	58.1724	<.0001
3	60	4.1259	540.7188	<.0001
12	60	2.4961	80.7045	<.0001
19	60	2.2222	148.5947	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	770.35630	d
2	838.96250	c
3	924.31250	a
4	882.98750	b
5	902.57500	ab

dms = 31.82923

Médias do fator 2

1	755.92500	b
2	1010.75000	a
3	1000.88000	a
4	687.80000	c

dms = 26.75221

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

		B			
A	B1	B2	B3	B4	
A1	791.6000 abB	896.3500 cA	800.2000 eB	593.2750 dC	
A2	672.4250 cC	784.1500 dB	1227.2500 aA	672.0250 bcC	
A3	834.9000 aC	957.7500 cB	1107.2500 bA	797.3500 aC	
A4	729.9000 bcC	1165.5000 bA	993.4500 cB	643.1000 cdD	
A5	750.8000 bc	1250.0000 aA	876.2500 dB	733.2500 bc	

dms para colunas = 63.6585      dms para linhas = 59.8198  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 863.83875

CV% = 3.70

Ponto médio = 955.05000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.91979	0.00009	Não

DADOS

825.0	799.0	777.4	765.0
933.4	904.6	883.6	863.8
815.8	803.8	794.2	787.0
609.4	592.7	587.9	583.1
693.5	676.4	664.7	655.1
811.0	794.8	772.6	758.2
1284.0	1238.0	1209.0	1178.0
705.4	674.9	657.5	650.3
863.8	839.8	823.0	813.0
1005.0	962.2	940.6	923.2
1159.0	1116.0	1089.0	1065.0
832.6	801.4	784.6	770.8
758.2	739.0	719.4	703.0
1219.0	1183.0	1142.0	1118.0
1056.0	1003.0	971.8	943.0
657.5	645.5	638.3	631.1
779.4	755.8	739.0	729.0
1327.0	1267.0	1221.0	1185.0
928.4	885.0	856.6	835.0



749.6 736.6 727.0 719.8  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Viscosidade\_12rpm\_FaseII.TXT
   
Data 16/12/2023 Hora 22:32:19

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	1129937.67500	282484.41875	27.6644 **
Fator2(F2)	3	6696047.23750	2232015.74583	218.5868 **
Int. F1xF2	12	4114521.82500	342876.81875	33.5788 **
Tratamentos	19	11940506.73750	628447.72303	61.5454 **
Resíduo	60	612667.25000	10211.12083	
Total	79	12553173.98750		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	27.6644	<.0001
3	60	4.1259	218.5867	<.0001
12	60	2.4961	33.5788	<.0001
19	60	2.2222	61.5454	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	1663.75000	b
2	1740.43800	b
3	1969.93800	a
4	1934.75000	a
5	1901.68800	a

dms = 100.54480

Médias do fator 2

1	1565.50000	c
2	2196.15000	a
3	2058.30000	b
4	1548.50000	c

dms = 84.50713

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	1537.5000 bcBC	2035.0000 cA	1725.0000 cB	1357.5000 cC
A2	1405.0000 cC	1597.5000 dB	2464.2500 aA	1495.0000 bcBC
A3	1740.0000 aB	2110.0000 cA	2284.7500 aA	1745.0000 aB
A4	1535.0000 bcC	2736.5000 aA	1977.5000 bB	1490.0000 bcC
A5	1610.0000 abC	2501.7500 bA	1840.0000 bcB	1655.0000 abBC

dms para colunas = 201.0897      dms para linhas = 188.9637  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 1842.11250

CV% = 5.49

Ponto médio = 2104.50000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.90842	0.00003	Não

DADOS

1600	1550	1510	1490
2140	2060	1990	1950
1820	1740	1690	1650
1410	1360	1340	1320
1520	1400	1360	1340
1670	1610	1570	1540
2659	2519	2369	2310
1570	1510	1460	1440
1870	1750	1690	1650
2240	2150	2050	2000
2409	2310	2230	2190
1870	1770	1690	1650
1640	1550	1500	1450
2889	2769	2689	2599
2130	2000	1920	1860
1600	1500	1450	1410
1740	1620	1560	1520
2769	2499	2399	2340
2000	1850	1790	1720

1790 1660 1600 1570  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Sinerese\_FaseII.TXT
   
Data 17/12/2023 Hora 10:03:14

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	283.71474	70.92869	37.5427 **
Fator2(F2)	3	291.45192	97.15064	51.4220 **
Int. F1xF2	12	116.47385	9.70615	5.1375 **
Tratamentos	19	691.64051	36.40213	19.2677 **
Resíduo	60	113.35692	1.88928	
Total	79	804.99743		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	37.5427	<.0001
3	60	4.1259	51.422	<.0001
12	60	2.4961	5.1375	<.0001
19	60	2.2222	19.2677	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	66.22917	a
2	64.49375	b
3	61.36250	d
4	62.76875	c
5	61.37500	d

dms = 1.36764

Médias do fator 2

1	64.05000	ab
2	60.04500	c
3	65.08000	a
4	63.80834	b

dms = 1.14949

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	65.9500 aB	62.1000 aC	68.2750 aAB	68.5917 aA
A2	64.6750 abA	63.8250 aA	65.3000 bcA	64.1750 bA
A3	62.5750 bA	59.1250 bB	61.8500 dA	61.9000 bA
A4	64.8250 abAB	57.0250 bC	66.5250 abA	62.7000 bB
A5	62.2250 bA	58.1500 bB	63.4500 cdA	61.6750 bA

dms para colunas = 2.7353      dms para linhas = 2.5703  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 63.24583

CV% = 2.17

Ponto médio = 62.89566

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.98676	0.58331	Sim

DADOS

66.70000	66.90000	64.90000	65.30000
62.30000	63.70000	63.40000	59.00000
68.10000	67.40000	70.10000	67.50000
68.39190	68.02563	70.79131	67.15790
64.80000	63.50000	65.10000	65.30000
63.70000	63.60000	64.20000	63.80000
66.70000	65.60000	67.00000	61.90000
65.10000	64.20000	63.00000	64.40000
61.70000	63.90000	61.50000	63.20000
59.80000	61.20000	58.60000	56.90000
63.80000	61.30000	60.40000	61.90000
63.90000	61.40000	59.10000	63.20000
64.80000	65.50000	64.30000	64.70000
55.00000	57.70000	58.00000	57.40000
65.10000	65.90000	68.30000	66.80000
62.20000	64.40000	62.90000	61.30000
60.90000	64.10000	60.70000	63.20000
58.50000	57.20000	58.80000	58.10000
63.60000	63.90000	64.10000	62.20000

61.50000 61.60000 61.90000 61.70000  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Firmeza\_FaseII.TXT
   
Data 17/12/2023 Hora 10:56:11

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	95.96975	23.99244	49.1071 **
Fator2(F2)	3	399.91144	133.30381	272.8428 **
Int. F1xF2	12	159.27037	13.27253	27.1659 **
Tratamentos	19	655.15157	34.48166	70.5762 **
Resíduo	60	29.31442	0.48857	
Total	79	684.46598		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	49.1071	<.0001
3	60	4.1259	272.8428	<.0001
12	60	2.4961	27.1659	<.0001
19	60	2.2222	70.5762	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	23.69729	c
2	25.25524	b
3	26.10503	a
4	26.71629	a
5	26.47775	a

dms = 0.69549

Médias do fator 2

1	23.25152	d
2	29.10167	a
3	26.06627	b
4	24.18182	c



dms = 0.58455

### MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	22.1841 bB	25.6429 dA	24.4800 cA	22.4822 bB
A2	23.1382 bC	25.6130 dB	27.6704 aA	24.5993 aB
A3	23.2277 bC	29.6086 cA	27.2530 abB	24.3309 aC
A4	22.6910 bD	33.2761 aA	26.2690 bB	24.6291 aC
A5	25.0167 aB	31.3678 bA	24.6589 cB	24.8676 aB

dms para colunas = 1.3910      dms para linhas = 1.3071  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 25.65032

CV% = 2.73

Ponto médio = 27.84934

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.88015	0.00000	Não

### DADOS

21.94552	22.42260	22.42260	21.94552
26.23921	25.64286	24.80798	25.88140
24.09237	24.33090	25.28506	24.21164
22.89968	22.06479	22.30333	22.66114
23.49602	23.01894	23.01894	23.01894
25.04652	26.00067	25.64286	25.76213
27.31263	27.90898	27.78971	27.67044
23.97310	25.76213	24.45017	24.21164
23.85383	23.37675	22.78041	22.89968
30.53290	29.93655	29.45948	28.50533
28.26679	27.19336	27.31263	26.23921
24.33090	24.45017	24.21164	24.33090
23.25748	23.01894	21.70698	22.78041
33.63390	33.99170	32.79902	32.67974
25.64286	26.47775	27.07409	25.88140
25.16579	25.04652	24.56944	23.73456
25.40433	25.88140	24.80798	23.97310
32.08340	31.36778	33.15682	28.86313
24.45017	25.04652	24.80798	24.33090

25.04652 24.33090 24.33090 25.76213  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Consistencia\_FaseII.TXT
   
Data 17/12/2023 Hora 11:23:41

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	49468.52952	12367.13238	57.6816 **
Fator2(F2)	3	255939.03800	85313.01267	397.9089 **
Int. F1xF2	12	102663.86101	8555.32175	39.9029 **
Tratamentos	19	408071.42853	21477.44361	100.1731 **
Resíduo	60	12864.20140	214.40336	
Total	79	420935.62993		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	57.6816	<.0001
3	60	4.1259	397.9089	<.0001
12	60	2.4961	39.9029	<.0001
19	60	2.2222	100.1731	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	503.84510	c
2	538.57430	b
3	560.94760	a
4	571.71340	a
5	565.98740	a

dms = 14.56931

Médias do fator 2

1	487.46620	d
2	636.58680	a
3	555.79330	b
4	513.00790	c

dms = 12.24538

### MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	461.6948 bc	564.5215 dA	517.2524 cB	471.9117 bC
A2	488.6368 bc	544.9415 dB	612.7473 aA	507.9719 aC
A3	487.1858 bD	649.4812 cA	578.8398 bB	528.2834 aC
A4	470.4234 bc	738.3699 aA	545.5609 cB	532.4995 aB
A5	529.3904 aB	685.6198 bA	524.5663 cB	524.3732 aB

dms para colunas = 29.1386      dms para linhas = 27.3815  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 548.21356

CV% = 2.67

Ponto médio = 613.66015

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.88208	0.00000	Não

### DADOS

475.0969	464.3360	455.8438	451.5024
582.1756	570.3021	556.2083	549.4001
530.6141	522.3323	513.0832	502.9799
480.5284	476.5995	465.0774	465.4414
503.9474	491.0275	483.4925	476.0797
550.2267	552.1054	532.6617	544.7720
616.1308	621.2853	614.6506	598.9224
518.9868	513.3224	504.8672	494.7110
497.1982	488.8828	483.0240	479.6382
683.7132	650.9638	628.1147	635.1332
592.9396	580.4118	580.1998	561.8080
528.8096	532.3940	533.0779	518.8522
477.3232	472.5613	463.2843	468.5247
775.8179	745.8124	725.9982	705.8510
554.5743	549.2623	541.9993	536.4077
554.9987	534.4562	522.5112	518.0317
550.7925	536.9003	517.6018	512.2669
712.5167	680.2454	700.8646	648.8523
535.0862	527.8041	518.0588	517.3160

531.4721 520.4032 519.2396 526.3781  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

Arquivo Analise\_Coesividade\_FaseII.TXT
   
Data 17/12/2023 Hora 11:46:52

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	27.57250	6.89313	16.7842 **
Fator2(F2)	3	205.14243	68.38081	166.5018 **
Int. F1xF2	12	100.89599	8.40800	20.4728 **
Tratamentos	19	333.61092	17.55847	42.7535 **
Resíduo	60	24.64146	0.41069	
Total	79	358.25238		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	16.7842	<.0001
3	60	4.1259	166.5018	<.0001
12	60	2.4961	20.4728	<.0001
19	60	2.2222	42.7535	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	16.97349	c
2	17.74874	b
3	18.44944	a
4	18.62835	a
5	18.10655	ab

dms = 0.63765

Médias do fator 2

1	16.44721	c
2	20.52622	a
3	18.15276	b
4	16.79906	c

dms = 0.53594

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	15.9821 bB	18.7551 cA	16.8766 bB	16.2802 aB
A2	16.6082 abB	17.6518 cB	19.6794 aA	17.0555 aB
A3	16.3995 abC	21.3492 bA	19.3514 aB	16.6977 aC
A4	15.7137 bC	23.7644 aA	17.7711 bB	17.2642 aB
A5	17.5326 aB	21.1106 bA	17.0853 bB	16.6977 aB

dms para colunas = 1.2753      dms para linhas = 1.1984  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 17.98131

CV% = 3.56

Ponto médio = 19.79868

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.86533	0.00000	Não

DADOS

15.98207	15.14718	15.74353	17.05549
19.91795	18.72525	18.00964	18.36745
16.57841	17.05549	16.69768	17.17476
16.57841	16.57841	15.86280	16.10133
16.45914	17.17476	16.93622	15.86280
17.17476	17.65183	17.89037	17.89037
20.03722	19.67941	20.03722	18.96379
16.69768	17.41329	17.41329	16.69768
16.10133	15.98207	17.41329	16.10133
23.37675	20.63356	20.87210	20.51429
18.72525	19.56014	19.79868	19.32160
16.22060	16.33987	17.29403	16.93622
16.81695	15.50499	15.38572	15.14718
24.45017	23.85383	23.61529	23.13821
18.96379	17.53256	17.65183	16.93622
17.65183	17.05549	16.57841	17.77110
17.89037	17.77110	17.05549	17.41329
21.82625	21.46844	19.91795	21.22991
16.81695	17.05549	17.05549	17.41329

16.93622 15.98207 17.05549 16.81695  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil

SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12



Arquivo Analise\_Indice\_de\_viscosidade\_FaseII.TXT
   
Data 17/12/2023 Hora 16:08:58

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	4	309.52912	77.38228	21.2100 **
Fator2(F2)	3	2458.76316	819.58772	224.6441 **
Int. F1xF2	12	1419.72289	118.31024	32.4281 **
Tratamentos	19	4188.01517	220.42185	60.4163 **
Resíduo	60	218.90298	3.64838	
Total	79	4406.91816		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
4	60	3.649	21.21	<.0001
3	60	4.1259	224.6441	<.0001
12	60	2.4961	32.4281	<.0001
19	60	2.2222	60.4163	<.0001

Fator 1 = Dias de Validade

Fator 2 = Tipos de Iogurte

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	6.76807	c
2	9.94089	b
3	11.12118	ab
4	12.75115	a
5	10.58588	b

dms = 1.90052

Médias do fator 2

1	4.99019	c
2	19.14624	a
3	10.55221	b
4	6.24510	c

dms = 1.59738

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B			
	B1	B2	B3	B4
A1	4.4109 abB	11.3610 cA	6.6089 cB	4.6914 aB
A2	5.1779 abC	9.9182 cB	17.9575 aA	6.7100 aBC
A3	4.6195 abC	20.2739 bA	12.9772 bB	6.6142 aC
A4	3.1719 bC	32.0662 aA	8.2773 cB	7.4892 aB
A5	7.5707 aB	22.1120 bA	6.9400 cB	5.7207 aB

dms para colunas = 3.8010      dms para linhas = 3.5718  
Classific.c/letras minúsculas      Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 10.23343

CV% = 18.67

Ponto médio = 18.80183

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística)	Valor	p-valor	Normal
Shapiro-Wilk (W)	0.78761	0.00000	Não

DADOS

5.213493	4.199944	5.039121	3.191165
16.028340	11.621350	9.420592	8.373648
8.107439	6.647585	5.772626	5.908116
5.248081	4.135300	4.682268	4.700000
7.038072	4.360957	5.140261	4.172273
10.196800	10.431040	10.601120	8.443778
18.868850	17.107250	17.436670	18.417300
7.925911	6.177664	6.313154	6.423120
4.883594	4.887650	4.302038	4.404609
22.751540	20.070850	19.655550	18.617440
14.983070	13.282530	13.665140	9.978056
7.976720	6.586042	6.247318	5.646678
4.632891	3.919422	2.647536	1.487763
36.115890	32.432380	29.899340	29.817050
9.637424	6.919757	9.105483	7.446688
7.906113	6.616575	8.155147	7.278996
8.397024	9.048234	6.630171	6.207482
29.519830	22.951910	16.610370	19.365970
7.396833	7.122515	6.460809	6.779974

6.208913 6.232767 4.781261 5.660036  
-----

#### OBSERVAÇÕES

Estes resultados terão validade se só se as exigências da ANOVA foram atendidas, ela não é apenas cálculos para dados quaisquer

O Assistat não é responsável por resultados incoerentes devidos a utilização inadequada de análise ou teste, feita pelo usuário

Quando F se aproxima mas não atinge a significância mesmo assim o Teste de Tukey poderá encontrar diferença significativa entre a maior e a menor média e também poderá ocorrer o inverso. Esse caso é previsto na literatura e também ocorre com outros testes de comparação. Não entenda essa ocorrência como erro na análise

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
F = Estatística do teste F MG = Média geral  
CV% = Coeficiente de variação em %  
dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIA DO ASSISTAT

Silva FAS, Azevedo CAV (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res. Vol. 11(39), pp. 3733-3740, 29 September.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

No formato do Brasil




SILVA, F. de A. S. e.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. Afr. J. Agric. Res, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.  
DOI: 10.5897/AJAR2016.11522

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

## **APÊNDICE E**

## Article

# Effect of Commercial Bioprotective Lactic Cultures on Physicochemical, Microbiological, and Textural Properties of Yogurt

Elói Duarte de Mélo <sup>1</sup>, Pedro Ivo Soares e Silva <sup>2</sup>, Suelma Ferreira do Oriente <sup>2</sup>, Renata Duarte Almeida <sup>2</sup>, Julia Morais Pessoa <sup>2</sup>, Kepler Borges França <sup>1</sup>, Thaísa Abrantes Souza de Gusmão <sup>2</sup>, Rennan Pereira de Gusmão <sup>2</sup>, Hugo M. Lisboa Oliveira <sup>2</sup> and Amanda Priscila Silva Nascimento <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Campina Grande, Av. Aprígio Veloso 882, Campina Grande 58429-900, PB, Brazil; eloi19melo@yahoo.com.br (E.D.d.M.); kepler123@gmail.com (K.B.F.)

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal Campina Grande, Av. Aprígio Veloso 882, Campina Grande 58429-900, PB, Brazil; pedroivosoares@hotmail.com (P.I.S.e.S.); suelma\_oriente09@hotmail.com (S.F.d.O.); renata.duarte@tecnico.ufcg.edu.br (R.D.A.); julia.morais@estudante.ufcg.edu.br (J.M.P.); thaisa.abrantes@professor.ufcg.edu.br (T.A.S.d.G.); rennan.pereira@professor.ufcg.edu.br (R.P.d.G.); hugom.lisboa80@gmail.com (H.M.L.O.)

\* Correspondence: amandapriszil@yahoo.com.br

**Abstract:** The present study investigated the effects of the commercial biopreservatives FRESHQ-11 (*Lactobacillus rhamnosus*), labeled as F, and HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU (*Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*), labeled as H, at different dosages on the pH, titratable acidity (%), fungal inhibition, and textural parameters of yogurt during 28 days of storage at  $7 \pm 1$  °C. The study compared these biopreservatives with yogurt containing only the chemical preservative potassium sorbate at the maximum allowed concentration (C1) and yogurt without any chemical preservatives (C2), with the goal of identifying alternatives to reduce or replace potassium sorbate. Yogurts were formulated with biopreservatives at concentrations of 0.1% and 0.2% (*v/v*) and with potassium sorbate at 0.015% and 0.03%. The results indicated that yogurts containing biopreservatives had significantly lower pH and higher titratable acidity (%) than C2 ( $p < 0.05$ ). Syneresis significantly decreased over the 28-day storage period at  $7 \pm 1$  °C ( $p < 0.05$ ). Additionally, yogurts with bioprotective cultures exhibited significantly lower textural parameters ( $p < 0.05$ ) compared to C1 and C2. This study underscores the potential of biopreservatives as viable replacements for potassium sorbate, with these formulations being comparable to C1 in inhibiting molds and yeasts, particularly when *L. rhamnosus* was used at 0.2% *v/v*. This finding is promising for future pilot and industrial-scale applications.

**Keywords:** lactic acid bacteria; fermentation; fungal contamination; biopreservation



**Citation:** Mélo, E.D.d.; e Silva, P.I.S.; do Oriente, S.F.; Almeida, R.D.; Pessoa, J.M.; França, K.B.; de Gusmão, T.A.S.; de Gusmão, R.P.; Lisboa Oliveira, H.M.; Nascimento, A.P.S. Effect of Commercial Bioprotective Lactic Cultures on Physicochemical, Microbiological, and Textural Properties of Yogurt. *Fermentation* **2024**, *10*, 585. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110585>

Academic Editor: Alessandra Pino

Received: 26 June 2024

Revised: 28 August 2024

Accepted: 30 August 2024

Published: 14 November 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Consumers are now more informed about foods and ingredients, especially functional foods, which have sparked considerable interest due to their advantages in preventing various health problems, enhancing physicochemical functions, and high nutritional value [1]. Therefore, several recent studies have shown increased demand for these beneficial natural products [2]. Yogurt is one of the most consumed fermented dairy products due to the combination of pasteurized milk with lactic acid bacteria (LAB), specifically *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* under controlled conditions [2]. Various yogurt formulations are currently being produced to enhance the product's nutritional value, quality properties, and health properties and meet the growing consumer demand for this type of yogurt [2,3]. Ultimately, adding natural functional ingredients significantly enhances the biological effects of yogurt, including its antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory, antibacterial, and anticancer properties [4].

Preventing deterioration by molds and yeasts in food currently relies on prevention methods (e.g., implementation of Hazard Analysis and Critical Control Points—HACCP), hurdle technologies (e.g., heat treatments, water removal, modified atmosphere packaging, salting, fermentation), and the use of chemical preservatives, including benzoate, propionate, sorbate, nitrate, and sulfites [5]. Agri-food industries primarily depend on chemical preservatives to control microbial contamination and extend product shelf life. However, there is increasing social demand for minimally processed and preservative-free foods, prompting ongoing revisions to additive regulations aimed at limiting their use [6].

Currently, food deterioration caused by the growth of molds and yeasts has become a significant concern worldwide. Between 25 and 40% of food products in various developing countries are lost due to mold and yeast deterioration [7]. Therefore, it is necessary to find alternative strategies to prevent spoilage caused by fungi and/or increase the products' shelf life [8]. Currently, biopreservation by LAB is the most promising alternative to chemical preservatives in the dairy industry due to their Generally Recognized as Safe (GRAS) status and Qualified Presumption of Safety (QPS) status in the United States and the EU, respectively [9]. Various bioactive metabolites (such as proteinaceous substances, cyclic dipeptides, organic acids, fatty acids, and hydrogen peroxide) generated by LAB are closely associated with the inhibitory effect on molds and yeasts [10]. Salas et al. [11] also report that PAB are considered antifungal. According to Yerlikaya et al. [12], although *propionibacteria* spp. are used for many purposes, including as a biopreservative culture and adjunct, *P. freudenreichii* may also be suitable to produce probiotic dairy beverages and does not have adverse effects on the physicochemical, rheological, microbiological, and sensory properties of the product.

However, although commercial antifungal formulations based on LAB and PAB are available for application in different food formats, more detailed research is still needed to understand their effects on final food quality, stability during processing, mechanism of action, synergistic activities, safety, etc., as well as their potential for commercial food exploitation [13]. Additionally, many factors can affect the rheology of yogurt, such as solids content, milk and fermentation thermal treatment temperatures, and homogenization pressure, among others [14]. The types of dairy cultures added during the manufacturing process also influence yogurt rheology.

Numerous studies in the literature have examined the effects of bioprotective cultures on the microbiological, physicochemical, and rheological parameters of fermented milk. However, most of this research has been conducted in developed countries where the raw materials used for fermented milk production are of significantly higher microbiological quality than those typically available in the Brazilian Northeast. In this region, research on bioprotective cultures is scarce or non-existent. Therefore, the conclusions drawn from studies conducted elsewhere require further investigation to assess the efficacy of commercial lactic acid bacteria (LAB) as antifungals under the specific hygienic and sanitary conditions, ambient temperatures, and raw material acquisition processes prevalent in the Brazilian Northeast during yogurt production, processing, and preservation.

Moreover, most commercial bioprotective culture manufacturers currently recommend their use in conjunction with chemical preservatives, primarily potassium sorbate, as an additional food safety measure. These manufacturers do not generally suggest replacing chemical preservatives with bioprotective cultures at the recommended dosages.

The dairy basin in the Brazilian Northeast is mostly composed of small producers who cannot afford to invest in appropriate infrastructure for obtaining milk on their properties, with milking being performed manually under inadequate hygienic conditions. The Brazilian dairy sector has been facing quality issues with its raw materials, repeating errors that demonstrate the need for improvements in handling, cooling, and collection stages, but primarily a cultural change for everyone involved [15]. All these reported problems directly influence the microbiological quality of yogurt made with this raw material, given that, according to Viljoen [16], various factors make the production environment conducive

to the development of molds and yeasts in dairy products; among them, the quality of the raw material stands out.

Therefore, in this context of raw material acquisition in the Brazilian Northeast and consumers increasingly seeking natural products without chemical preservatives, this research investigated the effect of the commercial biopreservatives FRESHQ-11 (F) and HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU (H) on pH, titratable acidity (%), fungal inhibition, syneresis, and yogurt texture parameters during 28 days of storage at  $7 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  to obtain new formulations based on their concentrations as an alternative to chemical preservatives.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bioprotective Cultures

A commercial culture composed exclusively of LAB and another culture consisting of a mixture of LAB and dairy PAB with bioprotective properties—*Lactobacillus rhamnosus* (FreshQ<sup>®</sup> 11, Novanesis, Kongens Lyngby, Denmark), provided by Chr. Hansen<sup>®</sup>, Valinhos, Brazil, and *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU, IFF Health & Biosciences, Dange Saint Romain, France), provided by Fermentech/Danisco Brazil—was utilized. The cultures were prepared for the experiments according to the manufacturer’s recommended dosage, as well as at a doubled dosage. For this purpose, each culture was dissolved in one liter of pasteurized milk at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , then stored in sterilized 1.5 mL containers and kept frozen at  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 days.

### 2.2. Experiment Distribution

To study their biopreservative capacity and its effects on yogurt compared to the chemical preservative potassium sorbate, dosages of 0.1% and 0.2% (*v/v*) were used for both types of commercial bioprotective cultures. Additionally, potassium sorbate was tested at concentrations of 0.015% and 0.03%, as outlined in Table 1. The C1 and C2 yogurts served as controls for comparison with the yogurts prepared using LAB and dairy PAB cultures.

**Table 1.** Final experiment distribution for the study of biopreservative performance.

Exp.	Chemical Preservative Content * (g/100 g)	Commercial Biopreservative Cultures **	Culture Concentration ( <i>v/v</i> )
C1	0.030	Absent	0.0%
C2	0	Absent	0.0%
H1	0.015	H	0.1%
F1	0.015	F	0.1%
H2	0	H	0.1%
F2	0	F	0.1%
H3	0	H	0.2%
F3	0	F	0.2%

\* Chemical preservative potassium sorbate; \*\* FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*), referred to as F, and HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU (*L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*), referred to as H.

Similar studies, where the parameters of yogurt containing bioprotective cultures at different dosages were compared with a control yogurt containing only initial cultures, have been conducted by Zhao and Liang [17], Fayyaz et al. [18], and Li et al. [19], among others.

### 2.3. Yogurt Preparation

In the production of yogurt, whole pasteurized milk sourced from a dairy in the state of Paraíba, located in the Northeast region of Brazil, was used. This milk was analyzed, and the chemical preservative potassium sorbate was added for the C1, H1, and F1 experiments. The milk was then pasteurized again at  $86 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  for ten minutes,

cooled to  $42 \pm 1$  °C, and inoculated with the starter cultures *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius*, provided by Chr. Hansen® Brazil. The biopreservatives were subsequently added in experiments H1, F1, H2, F2, H3, and F3. The mixture was maintained isothermally at  $42 \pm 1$  °C for five to six hours until the pH reached 4.7. The yogurt was then cooled to 20 °C within 15 min, packaged in sterilized 100 mL plastic bottles, and stored at  $7 \pm 1$  °C until physicochemical (pH and titratable acidity) and microbiological (molds and yeasts) analyses were conducted. Finally, the yogurt was packaged in sterilized 300 mL plastic bottles and stored at  $7 \pm 1$  °C.

#### 2.4. pH and Titratable Acidity Analysis

During fermentation, the pH of the yogurts was determined and recorded (using Milwaukee's MW150 MAX pH meter, Milwaukee Instruments, Rocky Mount, NC, USA) until a pH of 4.70 was reached, and the fermentation time was recorded. The pH was also determined every seven days for a maximum of 28 days. A potentiometric method was used for the determination of the titratable acidity levels expressed in % lactic acid, conducted in triplicate through acid–base titration, using phenolphthalein as the indicator [20].

#### 2.5. Microbiological Analyses (Mold and Yeast Counting)

To conduct mold and yeast analyses in triplicate on Days 1, 7, 14, 21, and 28, CompactDry YM plates (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. Tokyo, Japan), pre-prepared with culture medium, were used to minimize the risk of contamination during the analyses. CompactDry YM plates feature a dry culture medium covered by a layer of chromogenic absorbent tissue, which enhances productivity and efficiency. For each experiment, the samples were diluted to  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  in sterile peptone water, which had been autoclaved at 121 °C for 15 min. Subsequently, 1 mL of each diluted sample was inoculated onto the CompactDry YM plates and incubated at  $25 \pm 1$  °C for seven days. Following the incubation period, colony counts were performed using the Phoenix CP602 colony counter (PHOENIX LUFERCO LTDA, Araraquara, São Paulo, Brazil). According to Brazilian legislation, the maximum acceptable standard for yogurt is a total mold/yeast count of  $M = 2.0 \times 10^2$  CFU/g [21].

#### 2.6. Syneresis Analysis (Whey Separation)

Syneresis analysis of the different yogurt samples stored at  $7 \pm 1$  °C was performed on Days 1, 7, 14, 21, and 28 in quadruplicate by centrifugation according to the methodology proposed by Jauregui et al. [22] with modifications by Beuschel et al. [23]. For this purpose, 5.0 g of the samples was weighed and centrifuged at 2500 rpm for 20 min at  $7 \pm 1$  °C in the refrigerated centrifuge NT 815 (Nova técnica, São Paulo, Brazil). The supernatant was collected and weighed, and the syneresis index was determined according to Equation (1).

$$\text{Syneresis}(\%) = \frac{\text{supernatant weight (g)}}{\text{yogurt total weight (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

#### 2.7. Apparent Viscosity Measurements

Apparent viscosity measurements were made on yogurt samples using a Brookfield viscometer (RV+ model, Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleborough, MA, USA) at a temperature of  $7 \pm 1$  °C with a spindle speed of 50 rpm. The temperature was maintained using a thermostatically controlled water bath. All data were taken after 30 s for each sample. Appropriate spindles were used, guaranteeing torque within 25 to 75%. A 500 mL beaker was used for all measurements with the guard leg on, and enough sample was added to cover the immersion grooves on the spindle shafts. All experiments were replicated three times. Shear rates were calculated by the method of Mitschka [24,25].



## 2.8. Texture Parameter Analysis

The instrumental texture of the yogurts was determined using a TA.XT Plus texture analyzer (Stable Micro Systems®, Godalming, UK). Firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index parameters were evaluated using a compression test employing the A/BE probe with a diameter of 40 mm. Samples were homogenized and placed in an acrylic test cup until reaching a volume of 150 mL (height of 50 mm). The test speed was set to 1 mm/s with a max distance of 30 mm. Sample evaluation was conducted in quadruplicate on Days 1, 7, 14, 21, and 28 at 6.0 to 6.5 °C. As a result of these experiments, force–time curves were built and analyzed to determine the mechanical parameters (Firmness, Consistency, Viscosity Index, Cohesivity) [26].

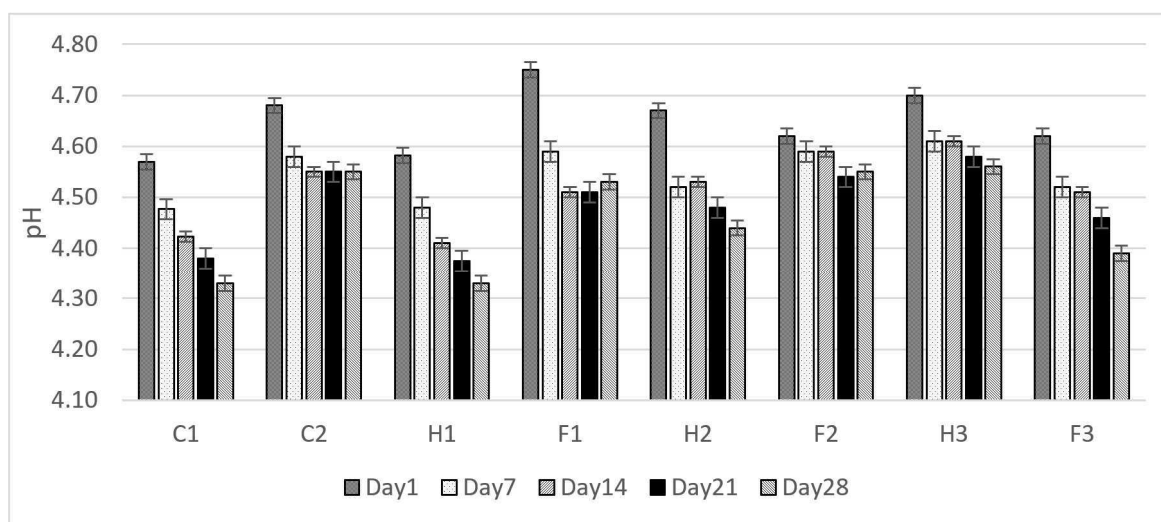
## 2.9. Statistical Treatment of Data

Statistical differentiation of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA). A  $p$ -value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant for differences among the data groups. Tukey's test was subsequently applied to evaluate the specific mean differences between groups.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Effect of Bioprotective Cultures on pH and Titratable Acidity

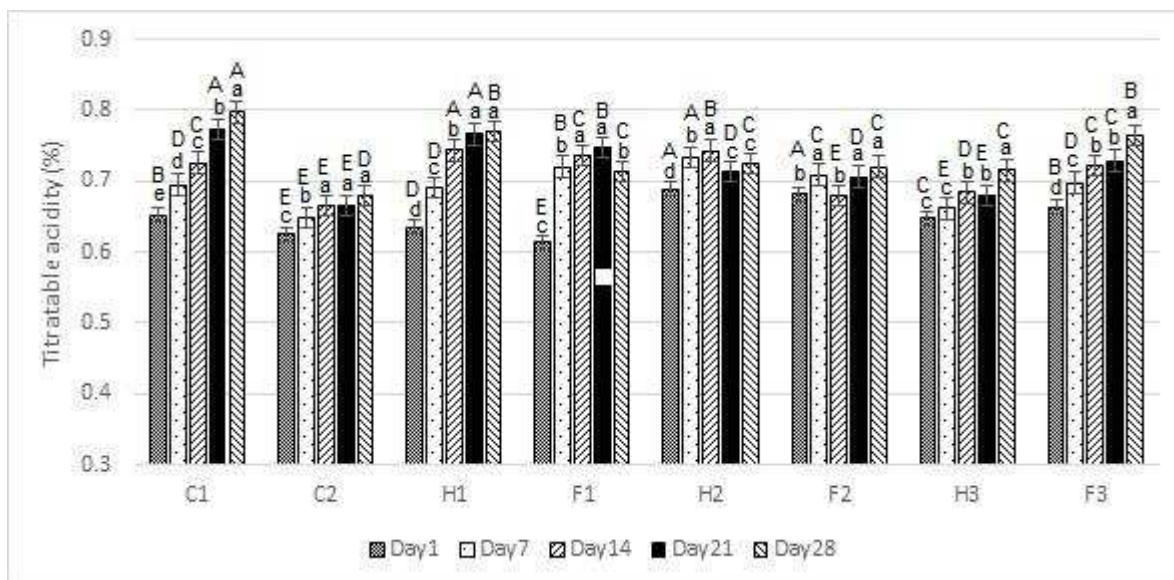
The following analysis evaluates the effects of biopreservative cultures and potassium sorbate on the physicochemical, microbiological, and textural properties of yogurt over 28 days of storage. Figure 1 illustrates the variation in pH over the 28-day storage period at  $7 \pm 1$  °C. As shown in the figure, there is a gradual decrease in pH values, which corresponds to the continuous production of organic acids by the starter cultures during storage. This decline in pH is indicative of the ongoing metabolic activity of the lactic acid bacteria, contributing to the yogurt's acidity over time.



**Figure 1.** Effect of storage at  $7 \pm 1$  °C on the pH of yogurt with or without the addition of chemical preservatives/bioprotective cultures. C1: 0.03% chemical preservative; C2: 0% chemical preservative and commercial biopreservative cultures; H1: 0.015% chemical preservative and 0.1% HOLDBAC YM-B; F1: 0.015% chemical preservative and 0.1% FRESHQ-11; H2: 0.1% HOLDBAC YM-B; F2: 0.1% FRESHQ-11; H3: 0.2% HOLDBAC YM-B; F3: 0.2% FRESHQ-11.

Control yogurt C2 exhibited higher pH values compared to the yogurts containing bioprotective cultures, except for the F2 and H3 experiments, where the pH values were equal to or greater than that of C2 at the conclusion of the storage period. With respect to titratable acidity (%), Figure 2 indicates an inverse relationship with pH, showing a significant increase ( $p < 0.05$ ) in titratable acidity across all yogurts over the storage period.

Among the yogurts containing bioprotective cultures, the H3 sample (*L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) at a concentration of 0.2% *v/v* exhibited the lowest titratable acidity throughout the study. This lower acidity is attributed to the ability of propionic acid bacteria (PAB), such as *P. freudenreichii*, to metabolize lactic acid into various organic acids, including propionic acid and acetic acid [27].



**Figure 2.** Effect of storage at  $7 \pm 1$  °C on the acidity of yogurt with or without the addition of chemical preservatives/bioprotective cultures. C1: 0.03% chemical preservative; C2: 0% chemical preservative and commercial biopreservative cultures; H1: 0.015% chemical preservative and 0.1% HOLDBAC YM-B; F1: 0.015% chemical preservative and 0.1% FRESHQ-11; H2: 0.1% HOLDBAC YM-B; F2: 0.1% FRESHQ-11; H3: 0.2% HOLDBAC YM-B; F3: 0.2% FRESHQ-11. a, b, c, d, e—Significant differences between the means depending on the days of storage of a given yogurt ( $p < 0.05$ ). A, B, C, D, E—Significant differences between the means depending on the yogurts on a given day of storage ( $p < 0.05$ ).

In the C2 yogurt, which contained only the starter *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, significantly lower ( $p < 0.05$ ) titratable acidity (%) values were observed compared to the yogurts containing bioprotective cultures over the 28-day study period. This pattern, where yogurts with bioprotective cultures exhibited lower pH and significantly higher titratable acidity (%) than C2 yogurt during the 28 days, is consistent with findings by Khan-Mohammadi et al. [28]. In their study, the lowest pH values were observed in T1 (yogurt formulated with starter cultures containing  $10^6$  CFU/mL of *L. rhamnosus*) and T3 (yogurt formulated with starter cultures containing  $10^6$  CFU/mL of *L. rhamnosus* and  $10^5$  CFU/mL of *Penicillium expansum*) throughout the study period. The researchers suggested that this could be attributed to the presence of the probiotic bacterium *L. rhamnosus* in combination with the yogurt starter cultures. In their study, yogurt T0, which is comparable to C2 in the present research, contained only the starter cultures and similarly exhibited a higher pH than the yogurts with bioprotective cultures.

When comparing yogurt C1 with yogurt C2, it was observed that yogurt C1, which contains the chemical preservative potassium sorbate, exhibited a lower pH and significantly higher titratable acidity ( $p < 0.05$ ) throughout the 28-day storage period at  $7 \pm 1$  °C. In addition to the cultures used, post-acidification of the yogurt depends on other factors, such as the composition of the raw material, the manufacturing process, and the fermentation time, which was 30 min longer for yogurt C2 than for yogurt C1. Numerous studies have noted that the composition of fermented beverages plays a crucial role in determining

the final pH value and its changes during refrigerated storage, which are influenced by the buffering capacity of the beverage, the levels of non-protein nitrogen and vitamins, and the availability of fermentable carbohydrates necessary for the growth of microorganisms [29]. Furthermore, certain species of molds and yeasts can raise the pH of the medium, which may explain the higher pH and lower acidity of yogurt C2, which showed a high level of yeast contamination. Lactic acid bacteria produce organic acids, primarily lactic acid, while yeasts assimilate these acids, forming alcohol and CO<sub>2</sub>, thereby increasing the pH. Additionally, during the metabolism of lactic acid, yeasts release vitamins such as vitamin B, pantothenic acid, niacin, riboflavin, and biotin, which are important for the development of lactic acid bacteria [16].

Several studies have demonstrated that LAB, such as *L. rhamnosus* (F), produce lactic acid and various other organic acids during and after fermentation, which increases the titratable acidity of yogurt and lowers its pH. This creates an environment that is unfavorable for the growth of undesirable microorganisms, including pathogenic bacteria, yeasts, and molds. For instance, Arena et al. [30] found that among the organic acids produced by LAB, lactic acid and acetic acid are the most well-characterized and effective metabolites, particularly in their protonated form at low pH. Similarly, Garnier et al. [31] reported that propionic, lactic, acetic, and butyric acids were the predominant fermentation products in milk fermented with *L. rhamnosus* and *Acidipropionibacterium jensenii*. LAB are known for their antimicrobial properties, producing a wide range of antimicrobial substances, including organic acids, fatty acids, reuterin, antifungal peptides, and bacteriocins [32].

In the study by Kariyawasam et al. [33], the titratable acidity of yogurt samples also showed a continuous increase during storage. The titratable acidity values of control C yogurt samples, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* KCTC 3108, and *L. plantarum* 200655 at the end of the storage period were 0.78 ± 0.02%, 0.82 ± 0.04%, 0.81 ± 0.06%, and 0.82 ± 0.04%, respectively. This study similarly found that the titratable acidity was higher in yogurts containing bioprotective or probiotic cultures compared to the control yogurt, which contained only the starter cultures.

These findings indicate that bioprotective cultures can effectively control acidity during storage, thereby contributing to the stability of the yogurts. Therefore, analyzing titratable acidity is a crucial parameter in assessing the viability of using bioprotective cultures in fermented dairy products.

### 3.2. Effect of Bioprotective Cultures on the Inhibition of Molds and Yeasts

It was observed that mold and yeast colonies were virtually absent in all experiments up to 14 days of storage at 7 ± 1 °C (Table 2). In control yogurt C1, which contained only the chemical preservative potassium sorbate at the maximum concentration of 0.03%, no mold or yeast formation was detected throughout the 28-day storage period at 7 ± 1 °C. However, in control yogurt C2, which lacked both chemical preservatives and bioprotective cultures, a significant increase in mold and yeast counts was observed beginning at 21 days of storage, reaching 5440 CFU/mL at 21 days and escalating to 21,000 CFU/mL by 28 days.

**Table 2.** Concentration of molds/yeasts (CFU/mL) as a function of days of storage at 7 ± 1 °C\*.

DAYS	C1	C2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	absent	10	10	absent	absent	absent	absent	absent
7	absent	absent	30	absent	10	10	absent	absent
14	absent	40	10	absent	20	20	absent	absent
21	absent	5440	10	absent	2300	4470	340	absent
28	absent	21,000	absent	absent	2770	18,000	absent	absent

\* Note: C1: 0.03% chemical preservative potassium sorbate; C2: 0% chemical preservative and commercial biopreservative cultures; H1: 0.015% chemical preservative and 0.1% HOLDBAC YM-B; F1: 0.015% chemical preservative and 0.1% FRESHQ-11; H2: 0.1% HOLDBAC YM-B; F2: 0.1% FRESHQ-11; H3: 0.2% HOLDBAC YM-B; F3: 0.2% FRESHQ-11.

In the case of yogurts containing bioprotective cultures combined with half the maximum dosage (0.015%) of the preservative potassium sorbate (experiments H1 and F1), it was observed that only yogurt H1, which used a dosage of 0.1% *v/v* of commercial culture H, did not achieve complete fungal inhibition, except at 28 days of storage when total fungal inhibition was observed. Conversely, yogurt F1, with a dosage of 0.1% *v/v* of commercial culture F and 0.015% potassium sorbate, achieved complete fungal inhibition throughout the 28-day storage period, similar to the results observed in control yogurt C1.

However, when the chemical preservative was entirely removed while maintaining the same dosage of 0.1% *v/v* of bioprotective cultures (experiments H2 and F2), a noticeable increase in mold and yeast formation occurred after 21 days of storage at  $7 \pm 1$  °C, with counts reaching 2300 CFU/mL and 4470 CFU/mL, respectively. By 28 days, mold and yeast counts had further increased, with 2770 CFU/mL for yogurt H2 and 18,000 CFU/mL for yogurt F2. When the dosage of bioprotective cultures was doubled to 0.2% *v/v* without adding chemical preservatives, yogurt F3, containing commercial culture F, exhibited total inhibition of molds and yeasts throughout the 28-day storage period. Similarly, yogurt H3, with a doubled dosage of commercial culture H, showed no colony formation within 28 days.

Several similar studies have reached comparable conclusions using other bioprotective cultures and have sought to elucidate the mechanisms by which these cultures inhibit mold and yeast growth. For instance, Siedler et al. [34] found that the depletion of the essential trace element manganese by *Lactobacillus paracasei* and *L. rhamnosus* was a key mechanism for inhibiting yeast and mold growth that typically deteriorates yogurt. They reported that the inhibition or reduction of spoilage yeasts and molds is linked to the absorption of a significant amount of manganese by bioprotective cultures in dairy products. Thus, the inhibition of mold growth in yogurt and the ability of manganese to restore mold growth appear to be closely associated with the capacity of LAB to efficiently deplete manganese.

Similarly, Shi and Knöchel [35] demonstrated that in yogurt, the depletion of manganese by *Lactobacillus plantarum* LP37 played a crucial role in inhibiting the growth of *Penicillium* and *Mucor* strains. Peng et al. [36] observed that the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* LPP703 CFS against *Penicillium* sp. was reduced by pH neutralization, likely due to the organic acids present when *L. plantarum* LPP703 CFS was added. According to these authors, when the pH is lower than the pKa of the organic acids, the undissociated form predominates and can pass through the fungal cell membrane via passive diffusion, leading to the accumulation of organic acids in the cytoplasm and the inhibition of fungal growth. Conversely, at higher pH levels, organic acids dissociate, and these dissociated acids cannot easily penetrate the cell membrane, thereby reducing the antifungal effect of organic acids [37].

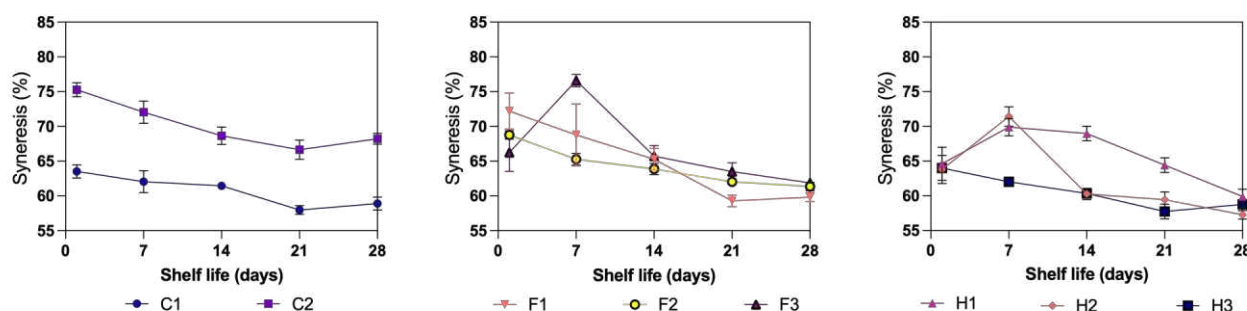
### 3.3. Effect of Bioprotective Cultures on Yogurt Water Retention Capacity and Syneresis

According to Figure 3, whey separation (syneresis) in all experiments significantly decreased over the storage time ( $p < 0.05$ ) during the 28 days at  $7 \pm 1$  °C. This indicates that water retention capacity (WRC) significantly increased ( $p < 0.05$ ) as a function of storage time or shelf life.

Yogurts containing bioprotective cultures exhibited significantly lower syneresis compared to C2 yogurt ( $p < 0.05$ ) and showed no significant variation ( $p > 0.05$ ) when compared to C1 yogurt, particularly towards the end of the storage period (28 days). As a result, the WRC was generally higher ( $p < 0.05$ ) in yogurts with added bioprotective cultures compared to those containing only the initial starter cultures (C2). At the end of the 28-day storage period, yogurts containing bioprotective culture H (H2 and H3) exhibited significantly lower syneresis ( $p < 0.05$ ) than those containing commercial culture F (F2 and F3).

It was observed that doubling the dosage of bioprotective culture F to 0.2% *v/v* (yogurt F3) resulted in a significant increase in syneresis ( $p < 0.05$ ) during storage compared to yogurts using the same culture at a dosage of 0.1% *v/v* (yogurts F1 and F2). Conversely, when the dosage of culture H was doubled to 0.2% *v/v* (yogurt H3), there was a decrease

in syneresis during most of the storage period compared to yogurts using culture H at 0.1% *v/v* (yogurts H1 and H2). However, these differences were not statistically significant at the end of the 28-day storage period ( $p > 0.05$ ).



**Figure 3.** Effect of storage at  $7 \pm 1$  °C on the syneresis of yogurt with or without the addition of chemical preservatives/bioprotective cultures.

It is widely recognized that *L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* are species known for their ability to produce exopolysaccharides (EPS), which contribute to the textural and rheological properties of fermented dairy products such as yogurt. While EPS production can vary among different strains, the literature provides substantial evidence that strains of *L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* are capable of producing significant amounts of EPS [38–42].

In this study, we utilized commercial bioprotective cultures HOLDBAC YM-B (a combination of *L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) and FRESHQ-11 (*L. rhamnosus*) to assess their impact on yogurt quality. Although the specific EPS production capabilities of these commercial strains have not been characterized by the manufacturers, their antifungal properties have been well documented, as this is their primary intended use. These bioprotective cultures are typically employed alongside starter cultures such as *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, a species well known for its robust EPS production and its role in enhancing yogurt viscosity.

Given the established EPS production capabilities of the species involved, it is reasonable to hypothesize that the observed improvements in yogurt texture and viscosity may be partially attributed to EPS production by these bioprotective cultures, either directly or through synergistic effects with the starter cultures. While direct quantification of EPS was not conducted in this study, the existing body of literature supports the likelihood of EPS production by the strains used, and no studies have been found to suggest otherwise. Further research could involve targeted analysis of EPS production to confirm these effects in the specific strains used in this study.

The study by Zhao and Liang [17] reported similar results, concluding that the WRC values of yogurt samples containing the bioprotective culture *L. plantarum* were significantly higher than those of the control ( $p < 0.05$ ) during storage. These findings suggest that the addition of *L. plantarum* MC5 likely improved the syneresis characteristics of yogurt during storage. It has also been reported that milk fermented with EPS-producing bioprotective cultures exhibits enhanced water retention capacity [43].

The water-binding capacity of EPS limits whey separation in yogurt and stabilizes the protein gel structure, resulting in greater cohesion within the yogurt samples. The water-binding capacity of EPS-producing LAB is influenced by factors such as the type, quantity, and distribution of EPS, the interaction between protein networks and EPS, and the duration of yogurt fermentation [44].

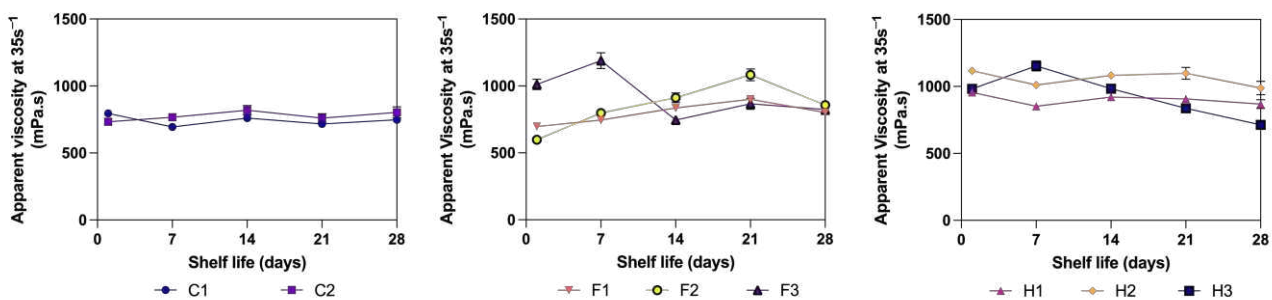
According to Ziarno et al. [43], WRC values are influenced by the microbial composition of the starter culture, likely due to the acidifying properties of the bacteria used. In their study, lower WRC values were recorded for samples fermented exclusively with propionic bacteria (PAB) cultures, while a mixture of initial yogurt bacteria and propionic

cultures produced WRC values comparable to those found in samples fermented solely with initial yogurt cultures.

Furthermore, in the study by Fayyaz et al. [18], for all yogurts with LAB added, WRC significantly increased over time ( $p < 0.05$ ), while for the control yogurt sample, the change was not significant ( $p > 0.05$ ). These results are similar to those found in the present research, and according to the authors, interactions occur during storage periods in terms of acid production due to culture growth, causing casein particles to retain water molecules more efficiently, resulting in decreased syneresis [45]. The increase in protein WRC due to pH decrease parallel to LAB growth leads to increased yogurt curd stability [45].

### 3.4. Effect of Bioprotective Cultures on Yogurt's Apparent Viscosity

Figure 4 presents the results for apparent viscosity at a shear rate of  $35 \text{ s}^{-1}$  during the shelf life period. The apparent viscosity of all yogurt samples exhibited notable fluctuations throughout the storage period, indicating complex biochemical and microbial interactions within the yogurt matrix. Initially, the C1 samples presented higher viscosity values than C2, suggesting a variance in the matrix's stability or response to the storage conditions. Interestingly, by Day 7, C2 samples surpassed C1 in viscosity, highlighting a potential difference in the stabilization or breakdown processes occurring within these samples.



**Figure 4.** Effect of storage at  $7 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  on the apparent viscosity at  $35 \text{ s}^{-1}$  of yogurt with or without the addition of chemical preservatives/bioprotective cultures.

Samples inoculated with bioprotective cultures (H1, H2, H3, F1, F2, F3) demonstrated significant variations in viscosity, underscoring the profound impact of these cultures on yogurt's rheological properties. The H series, in particular, showed a marked increase in viscosity from Day 1 to Day 7, with H2 reaching the highest viscosity among all tested samples. This trend suggests that the synergistic effect of *L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* within the H series may contribute to enhanced network formation or stability within the yogurt matrix, potentially through the production of EPS or other metabolites that influence viscosity.

Conversely, the F series samples exhibited a general decrease in viscosity after Day 7, with notable differences between samples. F2, for instance, showed a dramatic reduction in viscosity, indicating a distinct interaction of F cultures with the yogurt matrix that differs from that of the H cultures. F3 presented an initial increase followed by a significant decrease in viscosity by Day 28, suggesting an early stabilizing effect by the bioprotective culture that diminishes over time.

The production of EPS can substantially explain the marked variance in viscosity among samples treated with bioprotective cultures. These high-molecular-weight polysaccharides, secreted by specific LAB strains during fermentation, are known to augment yogurt's viscosity by enhancing water retention and contributing to a more gel-like structure [46]. The H series, particularly H2, exhibited a pronounced increase in viscosity early in the storage period, which we attribute to EPS production. This suggests that the synergistic effects of *L. rhamnosus* and *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* are conducive to a robust EPS-mediated increase in the matrix's resistance to flow [38].

EPS not only hold water but also interact with milk proteins to strengthen and stabilize the gel network, thereby augmenting the yogurt’s overall viscosity [47]. The interaction between EPS and the milk protein network potentially explains the observed rheological behavior of the H series samples, which displayed a consistently higher viscosity, suggesting a more cohesive and stable gel formation within the yogurt matrix.

Beyond EPS, other metabolites LAB produce, such as organic acids and proteolytic enzymes, play crucial roles in modulating the yogurt’s texture [48]. Organic acids contribute to casein micelle aggregation and gel formation by lowering the milk’s pH, whereas proteolytic enzymes alter the protein network by hydrolyzing milk proteins. These biochemical processes are instrumental in defining the final textural and sensory attributes of yogurt.

### 3.5. Effect of Bioprotective Cultures on Yogurt Texture

Yogurt is a mixture of biopolymers such as proteins, polysaccharides, and fats. The microstructure of milk protein gels and their rheological properties can affect texture, sensory properties, fat globules, and storage stability [49]. The yogurt microstructure is formed by a three-dimensional network of casein micelle aggregates, where the globular shape is observable and interspersed with void zones [50].

According to Table 3, yogurt texture parameters (firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index) significantly increased during storage at  $7 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $p < 0.05$ ), except for C2, H3, and F3 yogurts, which showed no significant variation in these parameters ( $p > 0.05$ ) at 28 days. In experiments containing commercial bioprotective cultures, texture parameters were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in C1 and C2 yogurts during the storage period, except for F3 (F culture at 0.2% *v/v* dosage) and H1 (H culture at 0.1% *v/v* dosage) yogurts.

**Table 3.** Yogurt texture properties during shelf life: firmness (g-force), consistency (g-sec), cohesiveness (g-force), and viscosity index (g-sec) \*.

Days	Firmness (g-force)							
	C1	C2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	22.8 ± 0.6 <sup>bBC</sup>	24.0 ± 0.2 <sup>aAB</sup>	22.8 ± 0.2 <sup>cBC</sup>	21.9 ± 0.4 <sup>cCD</sup>	22.9 ± 0.7 <sup>bBC</sup>	21.2 ± 0.2 <sup>cD</sup>	22.6 ± 0.4 <sup>bCD</sup>	24.7 ± 0.4 <sup>bA</sup>
7	25.1 ± 0.7 <sup>aB</sup>	24.5 ± 0.6 <sup>aB</sup>	24.4 ± 0.7 <sup>bB</sup>	23.0 ± 0.6 <sup>bcCD</sup>	23.9 ± 0.6 <sup>abBC</sup>	22.2 ± 0.5 <sup>bcD</sup>	22.1 ± 0.1 <sup>bD</sup>	26.9 ± 0.5 <sup>aA</sup>
14	25.2 ± 0.3 <sup>aAB</sup>	24.8 ± 0.5 <sup>aAB</sup>	26.1 ± 0.5 <sup>aA</sup>	24.7 ± 0.7 <sup>aAB</sup>	24.2 ± 0.3 <sup>abC</sup>	23.2 ± 0.4 <sup>bC</sup>	23.3 ± 0.3 <sup>abC</sup>	25.1 ± 0.4 <sup>bAB</sup>
21	25.3 ± 0.4 <sup>aAB</sup>	24.7 ± 0.4 <sup>aABC</sup>	26.0 ± 0.5 <sup>aA</sup>	23.9 ± 0.3 <sup>abC</sup>	24.3 ± 0.3 <sup>abC</sup>	24.7 ± 1.7 <sup>aABC</sup>	24.2 ± 0.3 <sup>abC</sup>	25.2 ± 0.5 <sup>bABC</sup>
28	25.7 ± 0.4 <sup>aA</sup>	24.7 ± 0.5 <sup>aAB</sup>	25.2 ± 0.5 <sup>abAB</sup>	24.0 ± 0.7 <sup>abBC</sup>	23.9 ± 1.2 <sup>abBC</sup>	22.6 ± 0.4 <sup>bC</sup>	22.7 ± 0.2 <sup>bC</sup>	25.1 ± 0.4 <sup>bAB</sup>
Days	Consistency (g-sec)							
	C1	C2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	475.1 ± 7.2 <sup>cCD</sup>	499.4 ± 7.0 <sup>bAB</sup>	474.5 ± 10.3 <sup>cCD</sup>	460.5 ± 3.8 <sup>cDE</sup>	485.6 ± 11.7 <sup>cBC</sup>	449.3 ± 3.8 <sup>cE</sup>	461.3 ± 10.9 <sup>dDE</sup>	518.0 ± 11.5 <sup>cA</sup>
7	526.9 ± 11.6 <sup>bB</sup>	516.8 ± 5.0 <sup>abB</sup>	522.0 ± 7.3 <sup>bB</sup>	492.7 ± 6.3 <sup>bCD</sup>	505.7 ± 4.7 <sup>abBC</sup>	475.1 ± 7.4 <sup>abDE</sup>	463.8 ± 5.4 <sup>cdE</sup>	575.6 ± 14.0 <sup>aA</sup>
14	541.5 ± 10.2 <sup>abAB</sup>	531.3 ± 3.8 <sup>abC</sup>	560.8 ± 13.4 <sup>aA</sup>	524.4 ± 6.7 <sup>aBC</sup>	512.4 ± 5.5 <sup>aC</sup>	486.6 ± 4.8 <sup>abD</sup>	488.3 ± 7.3 <sup>bD</sup>	537.6 ± 5.8 <sup>bB</sup>
21	553.0 ± 9.3 <sup>aA</sup>	523.4 ± 9.1 <sup>aB</sup>	559.1 ± 8.5 <sup>aA</sup>	520.2 ± 10.9 <sup>aB</sup>	511.3 ± 8.5 <sup>abBC</sup>	491.3 ± 14.5 <sup>aC</sup>	510.9 ± 8.4 <sup>abC</sup>	545.2 ± 11.0 <sup>bA</sup>
28	549.2 ± 9.9 <sup>aA</sup>	527.4 ± 6.4 <sup>aBC</sup>	559.6 ± 2.6 <sup>aA</sup>	511.6 ± 3.2 <sup>abCD</sup>	492.9 ± 12.1 <sup>bcDE</sup>	470.3 ± 8.9 <sup>bF</sup>	480.8 ± 4.2 <sup>bcEF</sup>	541.3 ± 7.9 <sup>bAB</sup>
Days	Cohesiveness (g-force)							
	C1	C2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	16.8 ± 0.4 <sup>cAB</sup>	17.5 ± 0.7 <sup>abA</sup>	16.9 ± 0.3 <sup>cAB</sup>	16.1 ± 0.1 <sup>cBC</sup>	16.6 ± 0.6 <sup>bABC</sup>	15.5 ± 0.7 <sup>bC</sup>	17.0 ± 0.6 <sup>aAB</sup>	17.3 ± 0.4 <sup>bA</sup>
7	17.5 ± 0.7 <sup>bcBC</sup>	17.4 ± 0.2 <sup>bBCD</sup>	17.9 ± 0.8 <sup>bcAB</sup>	16.3 ± 0.2 <sup>bcD</sup>	17.2 ± 0.3 <sup>abBCD</sup>	16.5 ± 0.6 <sup>abCD</sup>	16.8 ± 0.2 <sup>abCD</sup>	19.0 ± 0.5 <sup>aA</sup>
14	18.1 ± 0.5 <sup>abAB</sup>	17.7 ± 0.7 <sup>abB</sup>	19.0 ± 0.2 <sup>aA</sup>	17.5 ± 0.5 <sup>aBC</sup>	17.8 ± 0.4 <sup>aAB</sup>	16.5 ± 0.3 <sup>aC</sup>	17.2 ± 0.7 <sup>abC</sup>	18.2 ± 0.3 <sup>abAB</sup>
21	19.0 ± 0.5 <sup>aA</sup>	18.5 ± 0.7 <sup>aAB</sup>	18.5 ± 0.4 <sup>abAB</sup>	16.8 ± 0.5 <sup>abC</sup>	17.4 ± 0.3 <sup>abBC</sup>	16.7 ± 0.4 <sup>aC</sup>	17.6 ± 0.4 <sup>abC</sup>	18.0 ± 0.5 <sup>abAB</sup>
28	18.3 ± 0.3 <sup>abAB</sup>	18.1 ± 0.7 <sup>abAB</sup>	18.8 ± 0.4 <sup>abA</sup>	17.1 ± 0.1 <sup>abBC</sup>	17.4 ± 0.4 <sup>abBC</sup>	16.3 ± 0.2 <sup>abC</sup>	17.6 ± 0.7 <sup>aB</sup>	18.0 ± 0.6 <sup>abAB</sup>
Days	Viscosity index (g-sec)							
	C1	C2	H1	F1	H2	F2	H3	F3
1	6.5 ± 0.8 <sup>cAB</sup>	7.6 ± 0.8 <sup>aA</sup>	5.7 ± 0.6 <sup>cABC</sup>	3.8 ± 0.5 <sup>bC</sup>	5.9 ± 0.6 <sup>aABC</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>aBC</sup>	5.5 ± 0.9 <sup>abABC</sup>	6.7 ± 1.0 <sup>cAB</sup>
7	9.6 ± 0.9 <sup>bB</sup>	7.6 ± 0.8 <sup>aBCD</sup>	8.1 ± 1.0 <sup>bBC</sup>	5.8 ± 1.6 <sup>abDE</sup>	6.7 ± 1.2 <sup>aCDE</sup>	4.5 ± 0.5 <sup>aE</sup>	4.5 ± 0.3 <sup>bE</sup>	12.4 ± 1.1 <sup>aA</sup>
14	11.6 ± 0.5 <sup>abA</sup>	8.0 ± 1.6 <sup>aB</sup>	13.2 ± 1.3 <sup>aA</sup>	7.3 ± 0.2 <sup>aBC</sup>	7.7 ± 0.7 <sup>aB</sup>	5.0 ± 0.8 <sup>aC</sup>	5.3 ± 0.5 <sup>bC</sup>	9.1 ± 0.6 <sup>bB</sup>
21	12.5 ± 1.3 <sup>aA</sup>	8.9 ± 0.9 <sup>aB</sup>	12.9 ± 1.3 <sup>aA</sup>	6.8 ± 0.1 <sup>aBC</sup>	7.4 ± 0.6 <sup>aBC</sup>	5.6 ± 0.6 <sup>aC</sup>	7.5 ± 0.7 <sup>aBC</sup>	7.6 ± 1.4 <sup>b<sup>2</sup>BC</sup>
28	10.6 ± 1.9 <sup>abB</sup>	8.4 ± 1.3 <sup>aBCD</sup>	13.5 ± 0.2 <sup>aA</sup>	7.7 ± 1.5 <sup>aCDE</sup>	6.2 ± 1.3 <sup>aDE</sup>	3.6 ± 0.7 <sup>aF</sup>	6.0 ± 0.6 <sup>abE</sup>	9.3 ± 1.5 <sup>b<sup>2</sup>BC</sup>

\* Note: a, b, c—Significant differences between the means of each line ( $p < 0.05$ ). A, B, C, D, E, F—Significant differences between the means of each column ( $p < 0.05$ ).

It can also be observed in Table 3 that when the dosage of the F bioprotective culture was doubled to 0.2% *v/v* (yogurt F3), there were significant increases in firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index ( $p < 0.05$ ) during storage time compared to yogurts using the same culture at a dosage of 0.1% *v/v* (yogurts F1 and F2). The opposite

behavior was observed when the dosage of the culture was doubled to 0.2% *v/v* (yogurt H3); i.e., there was a significant decrease in these parameters ( $p < 0.05$ ) during storage time compared to yogurts using the same culture at a dosage of 0.1% *v/v* (yogurts H1 and H2), with the exception of cohesiveness and viscosity index from Day 21 onwards.

These results are in accordance with the study by Zhao and Liang [17], who observed that the firmness of yogurts containing the bioprotective culture *L. Plantarum MC5* was lower than that of control yogurt S. Therefore, the addition of *L. Plantarum MC5* significantly reduced the firmness of yogurt samples. According to these authors, similar results were reported by Bancalari et al. [51], where it was observed that the firmness of yogurts made with EPS-producing cultures was generally lower than that of a control yogurt made without initial cultures producing EPS. EPS can affect the texture properties of a yogurt clot by reducing its firmness [52].

In the study by Zhao and Liang [17], the firmness of samples from control yogurt S also gradually increased during storage time, while those with *L. plantarum MC5* remained reasonably constant, which did not occur in the present study with other bioprotective cultures. According to the authors, this observation may be due to the difference in EPS production and post-acidification of yogurt during storage. Yildiz and Ozcan [53] also reported that firmness and consistency were affected by syneresis, pH decrease, and increased casein hydration in yogurts with long storage times. The study by Zhao and Liang [17] also found that the interaction between the proportion of *L. plantarum MC5* addition and storage time of yogurt samples had a significant effect on yogurt firmness, consistency, and cohesiveness ( $p < 0.01$ ).

In the study by Ziarno et al. [43], an increase in yogurt hardness or firmness during refrigeration was also found in almost all stored samples; these changes were already statistically significant after 7 or 14 days of refrigerated storage. The magnitude of the changes depended on the bacterial culture used to ferment the yogurt. In this study, the greatest changes were observed when a propionic acid bacterium (PAB) starter was used, where a decrease in hardness compared to control yogurt was observed only with the initial cultures. This result is in line with that found in the present research, where it was observed that increasing the dosage of culture H containing the propionic bacterium (PAB) to 0.2% *v/v* further decreased the firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index of yogurt compared to control yogurts.

The texture (both hardness and adhesiveness) of yogurt products depends on the composition of the raw material, the type of bacterial culture used, the fermentation method, and texturizing additives, among other factors [54]. In contrast, Vinderola et al. [55] found that the rheological properties of fermented dairy products depend on titratable acidity (higher titratable acidity correlates with greater hardness). The composition of proteins present in yogurt is extremely important [56]. The acidifying properties of propionic bacteria, which are weaker than those of yogurt starter culture, did not improve the texture characteristics of these yogurt samples. During storage of yogurt samples, a statistically significant increase in adhesiveness was observed, except for yogurts with propionic culture added, whose adhesiveness decreased by 21 days. The acidifying properties of propionic bacteria, which are weaker than those of starter cultures, did not improve the adhesion values of yogurt samples [43]. The results of this study are consistent with the present research; as previously reported, the cohesiveness of yogurts also showed a trend to increase with storage days at  $7 \pm 1$  °C.

#### 4. Conclusions

In conclusion, this study highlights the potential of commercial bioprotective cultures as effective natural alternatives to chemical preservatives in yogurt production. The addition of these cultures led to a significant increase in titratable acidity (%) compared to the control yogurt (C2), which contained only starter cultures without any preservatives. This increase in acidity, coupled with a progressive rise during storage, underscores the active



role of bioprotective cultures in enhancing the yogurt's safety by creating an environment less favorable to spoilage organisms.

Particularly noteworthy is the fungal inhibition achieved with a 0.2% *v/v* dosage of bioprotective cultures, even without potassium sorbate. The results demonstrated that these cultures, especially *L. rhamnosus* (commercial culture F), performed comparably to the chemical preservative control (C1) in preventing fungal growth over the 28-day storage period. This finding is promising for future applications at both pilot and industrial scales, suggesting that bioprotective cultures could effectively replace or reduce the reliance on chemical preservatives in yogurt. Additionally, this study observed a reduction in syneresis across all experiments, with texture parameters improving over time. Although the use of bioprotective cultures resulted in lower values for firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index compared to C1 and C2, these differences are not necessarily detrimental. It is important to consider that no thickening agents or powdered milk were used in this study, commonly added to enhance texture and reduce syneresis in commercial yogurt products.

Overall, incorporating bioprotective cultures in yogurt production offers a promising avenue for improving product safety and shelf life while meeting consumer demand for cleaner labels. Future research and formulation adjustments could further optimize the texture and sensory properties, making these natural bioprotective agents a viable option for large-scale yogurt manufacturing.

**Author Contributions:** Investigation: E.D.d.M.; support in the analyses: P.I.S.e.S., S.F.d.O., A.P.S.N. and J.M.P.; formal analysis: R.P.d.G.; writing—original draft: E.D.d.M.; validation, methodology: R.D.A.; conceptualization, supervision: T.A.S.d.G.; supervision: K.B.F.; writing—review and editing: H.M.L.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The authors declare that the data supporting the conclusions of this study are available within the article. If any raw data files are needed in another format, they will be made available from the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Morais, R.; Soares, P.I.; Morais, S.K.; Oriente, S.; Nascimento, A.; Melo, M.O.; Sousa, F.M.; Cavalcanti-Mata, M.; Lisboa, H.M.; Gusmão, R.P.; et al. Development and Characterization of Symbiotic Buffalo Petit Suisse Cheese Utilizing Whey Retention and Inulin Incorporation. *Foods* **2023**, *12*, 4343. [[CrossRef](#)]
2. Rashwan, A.K.; Karim, N.; Xu, Y.; Cui, H.; Fang, J.; Cheng, K.; Mo, J.; Chen, W. Chemical composition, quality attributes and antioxidant activity of stirred-type yogurt enriched with *Melastoma dodecandrum* Lour fruit powder. *Food Funct.* **2022**, *13*, 1579–1592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Silva, P.I.S.; Silva Ramos, N.J.; Souza Gusmão, T.A.; Gusmão, R.P.; Bittencourt Pasquali, M.A. Iogurte caprino potencial probiótico—uma revisão. *Res. Soc. Dev.* **2023**, *12*, e13712541584.
4. Rashwan, A.K.; Osman, A.I.; Chen, W. Natural nutraceuticals for enhancing yogurt properties: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2023**, *21*, 1907–1931. [[CrossRef](#)]
5. Silva, M.M.; Lidon, F. Food preservatives—An overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric.* **2016**, *28*, 366–373. [[CrossRef](#)]
6. Fuselli, F.; Guarino, C.; La Mantia, A.; Longo, L.; Faberi, A.; Marianella, R.M. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2012**, *906*, 9–18. [[CrossRef](#)]
7. Das, S.; Singh, V.K.; Dwivedy, A.K.; Chaudhari, A.K.; Dubey, N.K. Nanostructured *Pimpinella anisum* essential oil as novel green food preservative against fungal infestation, aflatoxin B1 contamination and deterioration of nutritional qualities. *Food Chem.* **2021**, *344*, 128574. [[CrossRef](#)]
8. Delavenne, E.; Ismail, R.; Pawtowski, A.; Mounier, J.; Barbier, G.; Le Blay, G. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* **2013**, *30*, 206–213. [[CrossRef](#)]
9. Shi, C.; Maktabdar, M. Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products—A review. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 819684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Bukhari, S.A.; Salman, M.; Numan, M.; Javed, M.R.; Zubair, M.; Mustafa, G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 1871–1881. [[CrossRef](#)]
11. Salas, M.L.; Mounier, J.; Valence, F.; Coton, M.; Thierry, A.; Coton, E. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* **2017**, *5*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yerlikaya, O.; Akpinar, A.; Saygili, D.; Karagozlu, N. Incorporation of *Propionibacterium shermanii* subsp. *freudenreichii* in probiotic dairy drink production: Physicochemical, rheological, microbiological and sensorial Properties. *Int. J. Dairy Technol.* **2020**, *73*, 392–402.
13. Pradhan, D.; Kadyan, S. Antifungal Lactic Acid Bacteria (LAB): Potential Use in Food Systems. In *Novel Strategies to Improve Shelf-Life and Quality of Foods*; Mishra, S.K., Goyal, M.R., Eds.; Apple Academic Press: Palm Bay, FL, USA, 2020; pp. 73–95.
14. Paseephol, T.; Small, D.M.; Sherkat, F. Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *J. Texture Stud.* **2008**, *39*, 617–634. [[CrossRef](#)]
15. Strassburger, A.H.; Caye, V.A.H.; Costella, M.F.; Dalcanton, F. Análise da variação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado: Uma revisão sistemática da literatura. *Rev. Laticínios Cândido Tostes* **2019**, *74*, 60–72. [[CrossRef](#)]
16. Viljoen, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *69*, 37–44. [[CrossRef](#)]
17. Zhao, X.; Liang, Q. EPS-Producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a compound starter improves rheology, texture, and antioxidant activity of yogurt during storage. *Foods* **2022**, *11*, 1660. [[CrossRef](#)]
18. Fayyaz, N.; Shahidi, F.; Roshanak, S. Evaluation of the bioprotectivity of *Lactobacillus* binary/ternary cultures in yogurt. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 5036–5047. [[CrossRef](#)]
19. Li, H.; Liu, L.; Zhang, S.; Uluko, H.; Cui, W.; Lv, J. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control.* **2013**, *34*, 675–680. [[CrossRef](#)]
20. Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Of. Da República Fed. Do Bras.* **2006**.
21. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite fermentado. *Diário Of. Da República Fed. Do Bras.* **2007**.
22. Jauregui, C.A.; Regenstein, J.M.; Baker, R.C. A Simple Centrifugal Method for Measuring Expressible Moisture, A Water-Binding Property of Muscle Foods. *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 1271. [[CrossRef](#)]
23. Beuschel, B.C.; Culbertson, J.D.; Partridge, J.A.; Smith, D.M. Gelation and Emulsification Properties of Partially Insolubilized Whey Protein Concentrates. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 605–609. [[CrossRef](#)]
24. Mitschka, P. Simple conversion of Brookfield RVT readings into viscosity functions. *Rheol. Acta* **1982**, *21*, 207–209. [[CrossRef](#)]
25. Dantas, D.; Pasquali, M.A.; Cavalcanti-Mata, M.; Duarte, M.E.; Lisboa, H.M. Influence of spray drying conditions on the properties of avocado powder drink. *Food Chem.* **2018**, *266*, 284–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ribeiro, S.; Nascimento, A.; Lima, J.; Lima, L.; Almeida, R.; Lisboa, H. Modulation of rheological and textural properties in avocado pulp: Impact of maltodextrin concentration and temperature. *Food Mater. Res.* **2024**, *4*, 1–7. [[CrossRef](#)]
27. Farhadi, S.; Darani, K.; Mashayekh, M.; Mortazavian, M.A.; Mohammad, A.; Shahraz, A.F. Production of propionic acid in a fermented dairy beverage. *Int. J. Dairy Technol.* **2013**, *66*, 127–134. [[CrossRef](#)]
28. Khan-Mohammadi, S.; Fadaei, V.; Mirdamadi, S. Characterization of yoghurt supplemented with *Lactocaseibacillus rhamnosus* as a bioprotective antifungal culture. *Mljekarstvo* **2023**, *73*, 59–72. [[CrossRef](#)]
29. Ashna, T.; Abdulqader, R.; Qader, S.; Sebo, N.H. The Effect of Soymilk Addition on Chemical, Physical and Sensorial Properties of Cow Milk Yogurt. *Polytech. J.* **2022**, *12*, 30–39.
30. Arena, M.P.; Silvain, A.; Normanno, G.; Grieco, F.; Drider, D.; Spano, G. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 464. [[CrossRef](#)]
31. Garnier, L.; Penland, M.; Thierry, A.; Maillard, M.B.; Jardin, J.; Coton, M. Antifungal activity of fermented dairy ingredients: Identification of antifungal compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *322*, 108574. [[CrossRef](#)]
32. Lassois, L.; De Lapeyre De Bellaire, L.; Jijakli, M.H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain. *Biol. Control* **2008**, *45*, 410–418. [[CrossRef](#)]
33. Kariyawasam, K.M.M.M.; Lee, N.; Paik, H. Effect of set-type yoghurt supplemented with the novel probiotic *Lantiplantibacillus plantarum* 200655 on physicochemical properties and the modulation of oxidative stress-induced damage. *Food Sci. Biotechnol.* **2023**, *32*, 353–360. [[CrossRef](#)]
34. Siedler, S.; Rau, M.H.; Bidstrup, S.; Vento, J.M.; Aunsbjerg, S.D.; Bosma, E.F. Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, 2312–2319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shi, C.; Knöchel, S. Susceptibility of dairy associated molds towards microbial metabolites with focus on the response to diacetyl. *Food Control* **2021**, *121*, 107573. [[CrossRef](#)]
36. Peng, Q.; Yang, J.; Wang, Q.; Suo, H.; Hamdy, A.M.; Song, J. Antifungal Effect of Metabolites from a New Strain *Lactiplantibacillus Plantarum* LPP703 Isolated from Naturally Fermented Yak Yogurt. *Foods* **2023**, *12*, 181. [[CrossRef](#)]
37. Cao, H.; Meng, D.; Zhang, W.; Ye, T.; Yuan, M.; Yu, J.; Wu, X.; Li, Y.; Yin, F.; Fu, C. Growth inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification by lactic acid bacteria and their application in sourdough bread. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2021**, *56*, 2304–2314. [[CrossRef](#)]

38. Deutsch, S.-M.; Falentin, H.; Dols-Lafargue, M.; LaPointe, G.; Roy, D. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *125*, 252–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Guyomarc'h, F.; Francius, G.; Parayre, S.; Madec, M.-N.; Deutsch, S.-M. Surface properties associated with the production of polysaccharides in the food bacteria *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Microbiol.* **2020**, *92*, 103579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Oleksy-Sobczak, M.; Klewicka, E.; Piekarska-Radzic, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains—Optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT* **2020**, *122*, 109055. [[CrossRef](#)]
41. Bibi, A.; Xiong, Y.; Rajoka, M.S.R.; Mehwish, H.M.; Radicetti, E.; Umair, M.; Shoukat, M.; Khan, M.K.I.; Aadil, R.M. Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry: A Review. *Sustainability* **2021**, *13*, 12429. [[CrossRef](#)]
42. Badel, S.; Bernardi, T.; Michaud, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 54–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ziarno, M.; Zareba, D.; Dryzek, W.; Hassaliu, R.; Florowski, T. Effect of the Addition of Soy Beverage and Propionic Bacteria on Selected Quality Characteristics of Cow's Milk Yoghurt Products. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12603. [[CrossRef](#)]
44. Han, X.; Yang, Z.; Jing, X.; Yu, P.; Zhang, Y.; Yi, H.; Zhang, L. Improvement of the Texture of Yogurt by Use of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 7945675. [[CrossRef](#)]
45. Öztürk, B.A.; Öner, M.D. Production and Evaluation of Yogurt with Concentrated Grape Juice. *J. Food Sci.* **1999**, *64*, 530–532. [[CrossRef](#)]
46. Li, C.; Li, W.; Chen, X.; Feng, M.; Rui, X.; Jiang, M.; Dong, M. Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. *LWT—Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 477–485. [[CrossRef](#)]
47. Ripari, V. Techno-functional role of exopolysaccharides in cereal-based, yogurt-like beverages. *Beverages* **2019**, *5*, 16. [[CrossRef](#)]
48. Sharma, H.; Ozogul, F.; Bartkiene, E.; Rocha, J.M. Impact of lactic acid bacteria and their metabolites on the techno-functional properties and health benefits of fermented dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 4819–4841. [[CrossRef](#)]
49. Wang, L.; Wu, T.; Zhang, Y.; Yang, K.; He, Y.; Deng, K.; Liang, C.; Gu, Y. Comparative studies on the nutritional and physicochemical properties of yoghurts from cows', goats', and camels' milk powder. *Int. Dairy J.* **2023**, *138*, 105542. [[CrossRef](#)]
50. Gilbert, A.; Turgeon, S.L. Studying stirred yogurt microstructure and its correlation to physical properties: A review. *Food Hydrocoll.* **2021**, *121*, 106970. [[CrossRef](#)]
51. Bancalari, E.; Alinovi, M.; Bottari, B.; Caligiani, A.; Mucchetti, G.; Gatti, M. Ability of a Wild *Weissella* Strain to Modify Viscosity of Fermented Milk. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 3086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhao, J.-L.; Ma, C.-M.; Zhao, X.-H.; Zhang, Q. Effects of yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) juice on fermentation and textural attributes of set-style skimmed yoghurt. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 2220–2230. [[CrossRef](#)]
53. Yildiz, E.; Ozcan, T. Functional and textural properties of vegetable-fibre enriched yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* **2019**, *72*, 199–207. [[CrossRef](#)]
54. Lu, Y.; Mao, L.; Zheng, H.; Chen, H.; Gao, Y. Characterization of  $\beta$ -carotene loaded emulsion gels containing denatured and native whey protein. *Food Hydrocoll.* **2020**, *102*, 105600. [[CrossRef](#)]
55. Vinderola, G.; Prosello, W.; Molinari, F.; Ghiberto, D.; Reinheimer, J. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *135*, 171–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sebo, N.H.; Abdulqadr, A.T.; Qader, R.S. The Effect of soymilk addition with different concentrations on some properties of cow milk yogurt. *Polytech. J.* **2022**, *12*, 5.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



**Desempenho de culturas bioprotetoras comerciais na inibição fúngica e propriedades físico-químicas e texturais de iogurtes contaminados artificialmente**

**Performance of commercial bioprotective cultures in fungal inhibition and physicochemical and textural properties of artificially contaminated yogurts**

**Desempeño de cultivos bioprotectores comerciales en la inhibición fúngica y propiedades fisicoquímicas y texturales de yogures contaminados artificialmente**

DOI: 10.55905/oelv22n11-050

Receipt of originals: 10/04/2024

Acceptance for publication: 10/30/2024

**Elói Duarte de Mélo**

Mestre em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: eloi19melo@yahoo.com.br

**Renata Duarte Almeida**

Doutora em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: renata.duarte@tecnico.ufcg.edu.br

**Rafaela Duarte Almeida**

Doutora em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: rafaeladual@gmail.com

**Tháisa Abrantes Souza Gusmão**

Doutora em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: thaisa.abrantes@professor.ufcg.edu.br

### Kepler Borges França

Doutor em Engenharia Química

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande

Endereço: Campina Grande, Paraíba, Brasil

E-mail: kepler123@gmail.com

#### RESUMO

Este estudo examina o impacto dos bioconservantes comerciais F (*Lactobacillus rhamnosus*) e H (*Lactobacillus rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) nos atributos do iogurte (acidez titulável, textura e inibição fúngica) durante 28 dias a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . A investigação visa explorar esses bioconservantes como potenciais substitutos do sorbato de potássio na preservação do iogurte. Foi realizada uma análise comparativa para investigar a eficácia do bioconservante, durante a fermentação. O método potenciométrico foi usado para a determinação dos níveis de acidez titulável. A textura instrumental dos iogurtes foi determinada usando o TA.XT Plus. Com dosagem de 0,2% v/v, os bioconservantes foram submetidos a um teste de desafio nos iogurtes intencionalmente contaminados com  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de fungos e leveduras. Controle-1 (iogurte com 0,03% de sorbato de potássio) e Controle-2 (iogurte desprovido de agente antifúngico) foram utilizados para comparação. O Controle-2 apresentou menor acidez titulável em comparação aos iogurtes contendo bioconservantes ( $p < 0,05$ ). Os parâmetros de textura (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) em iogurtes com bioconservantes H e F foram menores ( $p < 0,05$ ) do que aqueles do Controle-2. Eles não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para o Controle-1 após 28 dias de armazenamento. Ao final da análise, o iogurte contendo bioconservante H demonstrou inibição fúngica completa.

**Palavras-chave:** *L. rhamnosus*, *P. freudenreichii*, Acidez, Contaminação Fúngica.

#### ABSTRACT

This study examines the impact of commercial biopreservatives F (*Lactobacillus rhamnosus*) and H (*Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) on yogurt attributes (titratable acidity, texture, and fungal inhibition) over 28 days at  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . The investigation aims to explore these biopreservatives as potential substitutes for potassium sorbate in yogurt preservation. A comparative analysis was conducted to investigate the efficacy of the biopreservatives during fermentation. The potentiometric method was used to determine titratable acidity levels. The instrumental texture of the yogurts was determined using the TA.XT Plus. At a 0.2% v/v dosage, the biopreservatives were subjected to a challenge test in yogurts intentionally contaminated with  $1.2 \times 10^1$  CFU/g of fungi and yeasts. Control-1 (yogurt with 0.03% potassium sorbate) and Control-2 (yogurt devoid of any antifungal agent) were used for comparison. Control-2 showed lower titratable acidity compared to yogurts containing biopreservatives ( $p < 0.05$ ). The texture parameters (firmness, consistency, cohesiveness, and viscosity index) in yogurts with biopreservatives H and F were lower ( $p < 0.05$ ) than those in Control-2. They showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) from Control-1 after

28 days of storage. At the end of the analysis, yogurt containing biopreservative H demonstrated complete fungal inhibition.

**Keywords:** *L. rhamnosus*, *P. freudenreichii*, Acidity, Fungal Contamination.

## RESUMEN

Este estudio examina el impacto de los bioconservantes comerciales F (*Lactobacillus rhamnosus*) y H (*Lactobacillus rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*) en los atributos del yogur (acidez titulable, textura e inhibición fúngica) durante 28 días a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ . La investigación tiene como objetivo explorar estos bioconservantes como posibles sustitutos del sorbato de potasio en la preservación del yogur. Se realizó un análisis comparativo para investigar la eficacia de los bioconservantes durante la fermentación. Se empleó el método potenciométrico para la determinación de los niveles de acidez titulable. La textura instrumental de los yogures fue determinada utilizando el TA.XT Plus. Con una dosificación del 0,2% v/v, los bioconservantes fueron sometidos a una prueba de desafío en yogures contaminados intencionalmente con  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de hongos y levaduras. El Control-1 (yogur con 0,03% de sorbato de potasio) y el Control-2 (yogur sin agente antifúngico) fueron utilizados para la comparación. El Control-2 mostró una acidez titulable más baja en comparación con los yogures que contienen bioconservantes ( $p < 0,05$ ). Los parámetros de textura (firmeza, consistencia, cohesividad e índice de viscosidad) en los yogures con bioconservantes H y F fueron menores ( $p < 0,05$ ) que los del Control-2. No mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con respecto al Control-1 después de 28 días de almacenamiento. Al final del análisis, el yogur que contenía bioconservante H demostró una inhibición fúngica completa.

**Palabras clave:** *L. rhamnosus*, *P. freudenreichii*, Acidez, Contaminación Fúngica.

## 1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais interessados em alimentos e seus ingredientes, particularmente alimentos funcionais que estão recebendo mais atenção, pois mostram potenciais benefícios à saúde, melhorias na função físico-química e alto valor nutricional. Estudos recentes, conforme indicado por Rashwan *et al.* (2022), destacaram uma demanda crescente por esses produtos naturais vantajosos.

Neste contexto, o iogurte é um dos produtos lácteos fermentados mais populares, desenvolvido pela combinação de leite pasteurizado com bactérias do ácido láctico, especificamente *S. salivarius* ssp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, sob

condições controladas. Diferentes formulações de iogurte são projetadas para melhorar seu perfil nutricional, qualidade geral e atributos de saúde, impulsionadas pela crescente demanda do consumidor por tais produtos (Rashwan *et al.*, 2022). Notavelmente, ingredientes funcionais demonstraram melhorar significativamente os efeitos biológicos do iogurte, incluindo suas propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, antibacterianas e anticancerígenas (Rashwan *et al.*, 2023).

A prevenção da deterioração por mofo e levedura em alimentos depende atualmente de vários métodos, incluindo medidas preventivas como a implementação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), tecnologias de barreira (por exemplo, tratamentos térmicos, remoção de água, embalagem em atmosfera modificada, salga, fermentação) e a utilização de conservantes químicos como benzoato, propionato, sorbato, nitrato e sulfitos (Silva e Lidon, 2016). A indústria agroalimentar emprega predominantemente conservantes químicos para mitigar a contaminação microbiana e prolongar a vida útil do produto. No entanto, há uma crescente demanda social por alimentos minimamente processados e sem conservantes, levando à evolução contínua nas regulamentações de aditivos para restringir seu uso (Fuselli *et al.*, 2012).

É imperativo explorar métodos alternativos para prevenir a deterioração fúngica, ao mesmo tempo em que se estende a vida útil dos alimentos quando aplicável (Delavenne *et al.*, 2013). Atualmente, a biopreservação por meio da ação de bactérias do ácido láctico (BAL) se destaca como a alternativa mais promissora aos conservantes químicos na indústria de laticínios. O efeito inibitório sobre fungos e leveduras atribuído às BAL está intimamente ligado à ampla gama de produção de metabólitos bioativos, incluindo substâncias proteicas, dipeptídeos cíclicos, ácidos orgânicos, ácidos graxos e peróxido de hidrogênio (Bukhari *et al.*, 2020). Propriedades antifúngicas de propionibactérias lácticas (PAB) também foram relatadas anteriormente por Leyva Salas *et al.* (2017).

Numerosos estudos na literatura examinaram os efeitos de culturas bioprotetoras nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e reológicos do leite fermentado. No entanto, a maioria dessas pesquisas foi conduzida em países desenvolvidos, onde as matérias-primas usadas para a produção de leite fermentado são de qualidade microbiológica significativamente maior do que aquelas normalmente disponíveis no Nordeste brasileiro.

Nessa região, a pesquisa sobre culturas bioprotetoras é escassa ou inexistente. Portanto, as conclusões extraídas de estudos conduzidos em outros países requerem investigação adicional para avaliar a eficácia de bactérias lácticas comerciais (BAL) como antifúngicos sob as condições higiênicas e sanitárias específicas, temperaturas ambientes e processos de aquisição de matéria-prima prevalentes no Nordeste brasileiro durante a produção, processamento e preservação de iogurte. Além disso, a maioria dos fabricantes comerciais de culturas bioprotetoras atualmente recomenda seu uso em conjunto com conservantes químicos, principalmente sorbato de potássio, como uma medida adicional de segurança alimentar.

O setor lácteo brasileiro vem enfrentando problemas de qualidade com suas matérias-primas, repetindo erros que demonstram a necessidade de melhorias nas etapas de manuseio, resfriamento e coleta, mas principalmente uma mudança cultural de todos os envolvidos (Strassburger *et al.*, 2019), junto a isso considera-se que a bacia leiteira do Nordeste brasileiro é composta majoritariamente por pequenos produtores. Todos esses problemas relatados influenciam diretamente na qualidade microbiológica do iogurte elaborado com essa matéria-prima, visto que, segundo Viljoen (2001), vários fatores tornam o ambiente de produção propício ao desenvolvimento de bolores e leveduras em produtos lácteos, dentre eles, destaca-se a qualidade da matéria-prima.

Em vista dos desafios associados à aquisição de matéria-prima no Nordeste brasileiro e da crescente preferência do consumidor por produtos livres de conservantes químicos, este estudo teve como objetivo investigar o impacto dos bioconservantes comerciais FRESHQ-11 (F) e HOLDBAC YM-B (H) em vários parâmetros de iogurte contaminado artificialmente (acidez titulável, propriedades texturais e inibição fúngica) e, dessa forma, explorar novas formulações baseadas em diferentes concentrações desses bioconservantes como potenciais alternativas aos conservantes químicos.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 FERMENTAÇÃO LÁCTEA, ACIDEZ TITULÁVEL E pH DO IOGURTE

De um modo geral, a fermentação láctea é um processo em que a lactose é transformada em ácido láctico por ação dos microrganismos. É um processo anaeróbico, de baixo rendimento energético e sem liberação de CO<sub>2</sub>. As bactérias do gênero *Lactobacilos* promovem o desdobramento da lactose em ácido láctico. O acúmulo desse ácido no leite torna-o “azedo”, indicando uma redução do pH. Esse fato provoca a precipitação das proteínas do leite, formando o coalho. A fermentação láctea compreende a conversão de lactose em ácido láctico. Os processos de fermentação utilizados na produção de produtos lácteos são bem conhecidos, sendo preciso selecionar as condições de processo adequadas, como temperatura, oxigênio, quantidade e características do(s) microrganismo(s) e tempo de processo (Hornbaek *et al.*, 2015).

### 2.2 TEXTURA DO IOGURTE

A importância da textura vem se revelando nos últimos anos como um parâmetro essencial na qualidade de um produto e, pode ser determinante para a aceitabilidade deste por parte do consumidor, que vem se tornando cada vez mais sofisticado.

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a textura pode ser definida como o conjunto de propriedades do alimento, compostas por características físicas perceptíveis pelo tato e que se relacionam com a deformação, desintegração e fluxo do alimento, sob a aplicação de uma força. A textura é uma combinação de sensações derivadas dos lábios, língua, mucosa bucal, dentes e do ouvido. Cada área é sensível a pequenas diferenças de pressão e apresenta diferenças para cada atributo ou característica do produto. O conjunto de impressões obtidas na mastigação é responsável pela aceitação ou rejeição do produto.

## 2.3 CULTURAS COM PROPRIEDADES BIOPROTETORAS

A biopreservação também chamado de biocontrole, refere-se à extensão da vida útil dos alimentos e aumento da segurança alimentar usando microbiota natural ou adicionada e/ou seus compostos antimicrobianos (Holzapfel *et al.*, 1995). As culturas bioprotetoras de alimentos podem, assim, ser definidas como cepas bacterianas ou fúngicas de grau alimentício que foram selecionadas por suas propriedades antimicrobianas. Eles diferem das culturas iniciadoras ou adjuntas que são usadas principalmente por suas funções tecnológicas (produção de ácido e aroma, papel na textura, cor, etc.), apresentam-se eficazes no controle da deterioração causada por bolores e leveduras.

As culturas bioprotetoras selecionadas não devem ter impacto negativo nas propriedades de qualidade dos alimentos e na saúde humana, exibir e manter-se ativas durante a fabricação e armazenamento de alimentos (Holzapfel *et al.*, 1995). Os principais requisitos desejáveis das culturas bioprotetoras em produtos alimentícios incluem: (1) As culturas devem ser GRAS (“geralmente reconhecidos como seguros”); (2) Permanecer ativo com o menor inóculo possível durante a fabricação e distribuição do produto para reduzir o custo; (3) Ser resistente ao antibiótico, liofilização ou congelamento; (4) Nenhuma produção de quaisquer substâncias nocivas para o ser humano, tais como a amina biogénica; e (5) Nenhum efeito sobre as propriedades sensoriais intrínsecas, como sabor e textura (Shi e Maktabdar, 2022).

### 2.3.1 Bactérias ácido lácticas (LAB)

As bactérias ácido lácticas (LAB) constituem um grupo de microrganismos que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas comuns. Entretanto, não apresentam uma definição única; sendo, portanto, descritas amplamente como microrganismos gram-positivos, não esporulantes, quase sempre catalase negativa, anaeróbios, aerotolerantes, ácido tolerantes e com metabolismo estritamente

fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação de carboidratos (Pfeiler e Klaenhammer, 2007).

As LAB encontram-se sob as formas de cocos ou bacilos e estão associadas a ambientes nutricionalmente ricos e complexos como vegetais, leite, carne e trato gastrointestinal humano e animal. A fonte de energia é proveniente de matérias orgânicas, em especial os carboidratos e por isso são denominados quimiorganotróficos. Classificam-se como mesófilos ou termófilos, apresentando temperatura ótima de crescimento variando de 30 a 37 °C e de 45 a 50 °C respectivamente (Ferreira, 2003).

### 2.3.2 Propionibactérias lácteas (PAB)

Salas e colaboradores (2017) também relatam que as propionibactérias lácteas (PAB) são consideradas como antifúngicas. O gênero *Propionibacterium*, pertencente à classe *Actinobacteria*, é uma bactéria Gram-positiva, de alto teor de GC, dividida em propionibactérias "cutâneas" e "clássicas" (também conhecidas como "lácteas") com base em seus principais biótopos de isolamento (Stackebrandt *et al.*, 2006). A PAB e a taxonomia das espécies relacionadas foram recentemente reconsideradas, com, em particular, o PAB "lácteo" separado no gênero *Propionibacterium*, composto por *P. freudenreichii*, as principais espécies utilizadas na fabricação de queijo e outras três espécies, e um novo gênero - *Acidipropionibacterium* - que engloba as espécies anteriores *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii* e outras três espécies (Scholz e Kilian, 2016).

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 CULTURAS BIOPROTETORAS

As culturas bioprotetoras utilizadas neste estudo incluíram a cultura comercial HOLDBAC YM-B LYO 100 DCU fornecido por IFF Health & Biosciences, França (compreendendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp.

*shermanii*) designado como "H" e FRESHQ-11 fornecido Novanesi, Dinamarca (consistindo de *Lactobacillus rhamnosus*) designado como "F". Cada cultura foi dissolvida em 1 L de leite pasteurizado, fornecido por um laticínio no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, a uma temperatura de 25 °C. As soluções foram então aliqüotadas em microtubos esterilizados de 1,5 mL e armazenadas a -10 °C por 15 dias. Antes de utilizá-las, as culturas diluídas foram descongeladas por imersão dos microtubos em banho-maria a 45°C até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 4,0 mL (0,2%, o dobro da recomendação do fabricante) da cultura bioprotetora para cada 2 L de leite, mantidos à temperatura de 42±1°C, juntamente com as culturas iniciais do leite (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) fornecido Novanesi, Dinamarca. A mistura foi então agitada suavemente por 5 minutos para garantir a distribuição uniforme das culturas.

### 3.2 DISTRIBUIÇÃO DE EXPERIMENTOS

Para investigar a eficácia do bioconservante e seu impacto no iogurte, uma análise comparativa foi conduzida com o conservante químico sorbato de potássio. Ambas as culturas bioprotetoras comerciais foram utilizadas em uma dosagem de 0,2% (v/v), enquanto o conservante químico foi aplicado em uma concentração de 0,03%, conforme descrito na Tabela 1. Iogurtes de controle, denotados como Controle-1 e Controle-2, foram incluídos para referência juntamente com os iogurtes preparados com as culturas bioconservantes.

Tabela 1. Distribuição dos experimentos utilizados para realização dos testes de bioconservantes

Exp.	% de conservante químico	Culturas Bioprotetoras	Dosagem (v/v)	Denominação
1	0,03%	Ausente	0,0%	Controle-1
2	0%	Ausente	0,0%	Controle-2
3	0%	HOLDBAC YM-B	0,2%	H
4	0%	FRESHQ-11	0,2%	F

Fonte: Elaborado pelos autores

Este estudo baseia-se em metodologias adaptadas de pesquisas anteriores, como aquelas conduzidas por Zhao e Liang (2022), Fayyaz *et al.* (2020) e Li *et al.* (2013), entre outros, em que parâmetros de iogurte incorporando culturas bioprotetoras em várias dosagens foram comparados com formulações de iogurte de controle contendo apenas culturas iniciais.

### 3.3 PREPARAÇÃO DE IOGURTE

No processo de produção do iogurte, 2 L de leite integral pasteurizado, proveniente de um laticínio do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil, serviram como base. Este leite passou por análises e, no experimento 1 da Tabela 1, foi adicionado o conservante químico sorbato de potássio. Em seguida, o leite foi pasteurizado novamente a  $86\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, sendo resfriado ao atingir  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Culturas iniciais, compostas por *S. salivarius ssp. thermophilus* e *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* foram inoculadas. Em seguida, foram adicionados 0,4 mL de bioconservantes conforme especificado nos experimentos 3 e 4 da Tabela 1.

Uma amostra de leite de 250 mL foi segregada em um recipiente esterilizado separado para monitoramento do pH. A mistura foi mantida isotermicamente a  $42\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 5 a 6 horas até que o pH atingisse 4,7. Posteriormente, o iogurte foi resfriado até atingir  $25^{\circ}\text{C}$  e foi intencionalmente contaminado com bolores e leveduras a uma concentração de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g.

Para contaminação do iogurte, foi utilizada uma amostra de 100 mL de um iogurte natural sem conservantes químicos ou bioconservantes, previamente armazenado por 21 dias a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após esse período de armazenamento, a amostra de iogurte foi intencionalmente contaminada em análises reológicas, de sinérese e de textura, envolvendo manuseio frequente com utensílios não esterilizados. Após 21 dias, foi realizada análise microbiológica para determinar o número de UFC/mL de fungos e leveduras. Isso envolveu duas diluições de  $10^{-2}$  da amostra de iogurte em água peptonada, esterilizada em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Posteriormente, 1 mL da amostra diluída foi inoculada em placas CompactDry YM (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd,

Tóquio, Japão) e incubada a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias. As colônias foram então contadas usando o contador de colônias Phoenix CP602 (Phoenix Lufenco LTDA, Araraquara, São Paulo, Brasil), com o resultado para bolores e leveduras registrado em  $2,1 \times 10^4$  UFC/mL na diluição  $10^{-2}$ .

Após a análise microbiológica da amostra contaminada, ela foi congelada até o uso para inoculação de iogurte. Quando necessário, o iogurte contaminado foi descongelado em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$  até atingir a temperatura ambiente. Finalmente, para contaminar o iogurte usado no estudo, após resfriamento a  $25^{\circ}\text{C}$ , 1 mL da amostra de iogurte contaminada com esporos de fungos e leveduras na concentração de  $2,1 \times 10^4$  UFC/mL foi adicionado a 1750 g de iogurte. Essa mistura foi agitada por 5 minutos para garantir uma distribuição uniforme de fungos e leveduras, resultando em uma concentração inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC de fungos e leveduras/g de iogurte.

Os iogurtes contaminados foram então embalados em frascos esterilizados de 100 mL e recipientes de 350 mL, identificados e armazenados a  $7\pm 1^{\circ}\text{C}$  até a análise nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

### 3.4 ANÁLISE DE PH E ACIDEZ TITULÁVEL

Durante toda a fermentação, o pH dos iogurtes foi monitorado usando um medidor de pH (MW150 MAX, Milwaukee Instruments, Rocky Mount, NC, EUA) até atingir um pH de 4,70, anotando o tempo de fermentação. Um método potenciométrico foi usado para a determinação dos níveis de acidez titulável expressos em % de ácido láctico, conduzido em triplicata através de titulação ácido-base, usando fenolftaleína como indicador (Brasil, 2006).

### 3.5 ANÁLISE DE TEXTURA

A textura instrumental dos iogurtes foi determinada usando um analisador de textura TA.XT Plus (Stable Micro Systems<sup>®</sup>, Godalming, Reino Unido). Os parâmetros de firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade foram avaliados usando um

teste de compressão empregando a sonda A/BE com um diâmetro de 40 mm. As amostras foram homogeneizadas e colocadas em um copo de teste de acrílico até atingir um volume de 150 mL (altura de 50 mm). A velocidade do teste foi definida para 1 mm/s com uma distância máxima de 30 mm. A avaliação da amostra foi conduzida em quadruplicata nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 a temperatura de 6,0 a 6,5 °C. Como resultado desses experimentos, curvas de força-tempo foram construídas e analisadas para determinar os parâmetros mecânicos (firmeza, consistência, índice de viscosidade, coesividade).

### 3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para conduzir análises de mofo e levedura nos dias 1, 7, 14, 21 e 28, placas CompactDry YM foram utilizadas em triplicata. CompactDry YM é composto por um meio de cultura seco coberto por uma camada de tecido absorvente, contribuindo para a máxima produtividade e eficiência.

Para cada experimento, as amostras foram diluídas para  $10^{-1}$  em água peptonada esterilizada e autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, 1 mL de cada amostra diluída foi inoculado em placas CompactDry YM e incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 7 dias. Após a incubação, as contagens de colônias foram conduzidas usando o contador de colônias Phoenix CP602. De acordo com a legislação brasileira, o padrão para iogurte estipula uma contagem total máxima de fungos/leveduras de  $2,0 \times 10^2$  UFC/g (Brasil, 2007).

### 3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DE DADOS

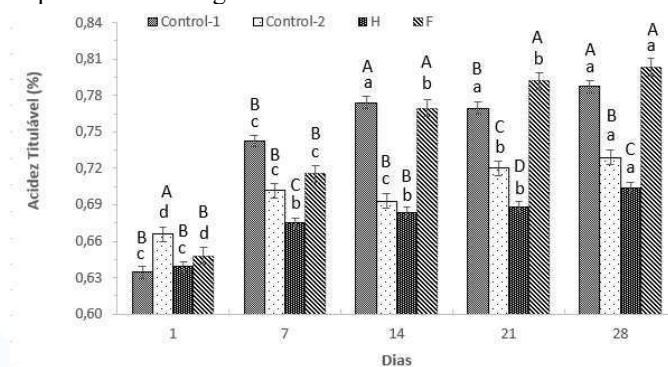
A diferenciação estatística dos dados foi realizada usando análise de variância unidirecional (ANOVA). Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para diferenças entre os grupos de dados. O teste de Tukey foi posteriormente aplicado para avaliar as diferenças médias específicas entre os grupos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CULTURAS BIOPROTETORAS NA ACIDEZ TITULÁVEL

A Figura 1 mostra um aumento significativo da acidez titulável (%) em todas as amostras de iogurte durante o armazenamento ( $p < 0,05$ ). Notavelmente, o iogurte Controle-1 exibiu acidez titulável significativamente maior em comparação ao iogurte H, sem diferença significativa observada em relação ao iogurte F ( $p > 0,05$ ).

Figura 1. Variação da acidez titulável (%) ao longo dos 28 dias. Controle-1: 0,03% de conservante químico; Controle-2: 0% de conservante químico e culturas comerciais de bioconservantes; H: 0,2% HOLD-BAC YM-B; F: 0,2% FRESHQ-11. a, b, c, d — Diferenças significativas entre as médias dependendo dos dias de armazenamento de um dado iogurte ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D — Diferenças significativas entre as médias dependendo dos iogurtes em um dado dia de armazenamento ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pelos autores

O iogurte H apresentou acidez titulável significativamente menor ( $p < 0,05$ ) durante todo o período estudado. Essa redução pode ser explicada pela conversão do ácido láctico em ácidos propiônico e acético causada por *P. freudenreichii* ssp. *Shermanii*. Por isso, a acidez titulável (%) permaneceu menor durante o período de armazenamento, principalmente porque a dosagem foi dobrada. O ácido láctico, com uma constante de dissociação ácida em água a 25 °C ( $K_a = 1,4 \times 10^{-4}$  e  $pK_a = 3,86$ ), é mais forte que o ácido acético ( $K_a = 1,8 \times 10^{-5}$  e  $pK_a = 4,75$ ) e o ácido propiônico ( $K_a = 1,3 \times 10^{-5}$  e  $pK_a = 4,85$ ).

A partir do dia 14, o iogurte Controle-2 apresentou valores significativamente menores de acidez titulável (%) em comparação ao Controle-1 e ao iogurte F ( $p < 0,05$ ) e valores significativamente maiores que o iogurte H ( $p < 0,05$ ).



Ao comparar o iogurte Controle-1 com o iogurte Controle-2, observou-se que o iogurte Controle-1, apresentou acidez titulável significativamente maior ( $p < 0,05$ ) a partir dos 7 dias de armazenamento a  $7 \pm 1$  °C. Além das culturas utilizadas, a pós-acidificação do iogurte depende de outros fatores, como a composição da matéria-prima, o processo de fabricação e o tempo de fermentação, que foi 30 minutos a mais para o iogurte Controle-2 do que para o iogurte Controle-1. Numerosos estudos observaram que a composição de bebidas fermentadas desempenha um papel crucial na determinação do valor final do pH e suas alterações durante o armazenamento refrigerado, que são influenciadas pela capacidade tampão da bebida, os níveis de nitrogênio não proteico e vitaminas e a disponibilidade de carboidratos fermentáveis necessários para o crescimento de microrganismos (Ashna *et al.*, 2022). Além disso, certas espécies de fungos e leveduras podem elevar o pH do meio, o que pode explicar a acidez mais baixa do iogurte Controle-2, que apresentou alto nível de contaminação por leveduras. As bactérias do ácido láctico produzem ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, enquanto as leveduras assimilam esses ácidos, formando álcool e CO<sub>2</sub>, aumentando assim o pH (Viljoen, 2001).

O comportamento dos iogurtes contendo a cultura bioprotetora *L. rhamnosus*, apresentando acidez titulável significativamente maior (%) em comparação ao iogurte Controle-2 ao longo de 28 dias, está de acordo com um estudo conduzido por Khan-Mohammadi *et al.* (2023). Em seu estudo, os menores valores de pH foram observados em T1 (iogurte formulado com culturas iniciais contendo 10<sup>6</sup> UFC/mL de *L. rhamnosus*) e T3 (iogurte formulado com culturas iniciais contendo 10<sup>6</sup> UFC/mL de *L. rhamnosus* e 10<sup>5</sup> UFC/mL de *Penicillium expansum*) durante todo o período do estudo. Interpretou-se que isso poderia ser atribuído à presença da bactéria probiótica *L. rhamnosus* em combinação com as culturas iniciais do iogurte. Em seu estudo, o iogurte T0, que é comparável ao iogurte Controle-2 na presente pesquisa, continha apenas as culturas iniciais e exibiu um pH similarmente mais alto do que os iogurtes com culturas bioprotetoras.

Vários outros estudos mostraram que bactérias do ácido láctico (BAL), como F (*L. rhamnosus*), produzem ácido láctico e vários tipos de ácidos orgânicos durante e após

a fermentação, aumentando assim a acidez titulável do iogurte e reduzindo o pH, tornando o ambiente desfavorável ao crescimento de microrganismos indesejáveis, como bactérias patogênicas, leveduras e fungos. Por exemplo, Arena *et al.* (2016) relataram que, entre os ácidos orgânicos produzidos por BAL, os metabólitos mais bem caracterizados e eficazes são o ácido lático e o ácido acético, que são bioativos em sua forma protonada em pH baixo. Garnier *et al.* (2020) também relataram que os ácidos propiônico, lático, acético e butírico foram os produtos de fermentação mais abundantes gerados no leite fermentado produzido com *L. rhamnosus* e *Acidipropionibacterium jensenii*.

#### 4.2 CULTURAS BIOPROTETORAS NA TEXTURA DO IOGURTE

De acordo com a Tabela 2, os parâmetros de textura do iogurte (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) apresentaram comportamento semelhante, onde aumentaram significativamente durante o armazenamento por 28 dias a  $7\pm 1$  °C ( $p < 0,05$ ), exceto para o iogurte H para todos os parâmetros e o iogurte F para os parâmetros de coesividade e índice de viscosidade, que não apresentaram variação significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado o primeiro dia com o dia 28.

Para os iogurtes com culturas bioprotetoras H e F, esses parâmetros foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) do que os observados no iogurte Controle-2, mas não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação ao iogurte Controle-1 com 28 dias de armazenamento. Entretanto, o iogurte H (cultura HOLDBAC-YMB na dosagem de 0,2% v/v) apresentou resultados elevados para esses parâmetros até 7 dias de armazenamento, mas após esse período, apresentou queda acentuada.

Tabela 2. Propriedades de textura do iogurte durante a vida útil, firmeza (força g), consistência (g-seg), coesão (força g) e índice de viscosidade (g-seg). a, b, c, d - Diferenças significativas entre as médias de cada linha ( $p < 0,05$ ). A, B, C, D - Diferenças significativas entre as médias de cada coluna ( $p < 0,05$ )

Firmeza (força g)				
Dias	Controle-1	Controle-2	H	F
1	22,2±0,2 <sup>bb</sup>	25,6±0,5 <sup>da</sup>	24,5±0,5 <sup>ca</sup>	22,5±0,3 <sup>bb</sup>
7	23,1±0,2 <sup>ac</sup>	25,6±0,4 <sup>db</sup>	27,7±0,2 <sup>aa</sup>	24,6±0,7 <sup>ab</sup>
14	23,2±0,4 <sup>ac</sup>	29,6±0,7 <sup>ca</sup>	27,3±0,7 <sup>abB</sup>	24,3±0,1 <sup>ac</sup>
21	22,7±0,6 <sup>bd</sup>	33,3±0,6 <sup>aa</sup>	26,3±0,6 <sup>bb</sup>	24,6±0,6 <sup>ac</sup>
28	25,0±0,7 <sup>ab</sup>	31,4±1,6 <sup>ba</sup>	24,7±0,3 <sup>cb</sup>	24,9±0,6 <sup>ab</sup>
Consistência (g-seg)				
1	461,7±9,0 <sup>ac</sup>	564,5±12,7 <sup>da</sup>	517,3±10,3 <sup>cb</sup>	471,9±6,8 <sup>ac</sup>
7	488,6±10,3 <sup>ac</sup>	544,9±7,6 <sup>db</sup>	612,7±8,4 <sup>aa</sup>	508,0±9,2 <sup>ac</sup>
14	487,2±6,7 <sup>bd</sup>	649,5±21,4 <sup>ca</sup>	578,8±11,1 <sup>bb</sup>	528,3±5,7 <sup>ac</sup>
21	470,4±5,2 <sup>ac</sup>	738,4±25,8 <sup>aa</sup>	545,6±6,9 <sup>cb</sup>	532,5±14,3 <sup>ab</sup>
28	529,4±15,4 <sup>ab</sup>	685,6±24,2 <sup>ba</sup>	524,6±7,3 <sup>cb</sup>	524,4±4,9 <sup>ab</sup>
Coesão (força g)				
1	16,0±0,7 <sup>bb</sup>	18,8±0,7 <sup>ca</sup>	16,9±0,2 <sup>bb</sup>	16,3±0,3 <sup>ab</sup>
7	16,6±0,5 <sup>abB</sup>	17,7±0,3 <sup>cb</sup>	19,7±0,4 <sup>aa</sup>	17,1±0,4 <sup>ab</sup>
14	16,4±0,6 <sup>ac</sup>	21,3±1,2 <sup>ba</sup>	19,4±0,4 <sup>ab</sup>	16,7±0,4 <sup>ac</sup>
21	15,7±0,6 <sup>ac</sup>	23,8±0,5 <sup>aa</sup>	17,8±0,7 <sup>bb</sup>	17,3±0,5 <sup>ab</sup>
28	17,5±0,3 <sup>ac</sup>	21,1±0,7 <sup>ba</sup>	17,1±0,2 <sup>bb</sup>	16,7±0,4 <sup>ab</sup>
Índice de viscosidade (g-seg)				
1	4,4±0,8 <sup>abB</sup>	11,4±2,9 <sup>ca</sup>	6,6±0,9 <sup>cb</sup>	4,7±0,5 <sup>ab</sup>
7	5,2±1,1 <sup>abC</sup>	9,9±0,9 <sup>cb</sup>	18,0±0,7 <sup>aa</sup>	6,7±0,7 <sup>abC</sup>
14	4,6±0,3 <sup>abC</sup>	20,3±1,5 <sup>ba</sup>	13,0±1,8 <sup>bb</sup>	6,6±0,9 <sup>ac</sup>
21	3,2±1,2 <sup>a.c.</sup>	32,1±2,6 <sup>aa</sup>	8,3±1,1 <sup>cb</sup>	7,5±0,6 <sup>ab</sup>
28	7,6±1,2 <sup>ab</sup>	22,1±4,8 <sup>ba</sup>	6,9±0,4 <sup>cb</sup>	5,7±0,6 <sup>ab</sup>

Fonte: Elaborado pelos autores

*L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* são espécies conhecidas por sua capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), que contribuem para as propriedades texturais e reológicas de produtos lácteos fermentados, como iogurte. Embora a produção de EPS possa variar entre diferentes cepas, a literatura fornece evidências substanciais de que cepas de *L. rhamnosus* e *P. freudenreichii* são capazes de produzir quantidades significativas de EPS (Deutsch *et al.*, 2008; Guyomarc'h *et al.*, 2020).

Os valores dos parâmetros de textura dos iogurtes com as culturas bioprotetoras que permaneceram abaixo do iogurte Controle-2 estão de acordo com um estudo de Zhao

e Liang (2022), que observou que a firmeza dos iogurtes contendo a cultura bioprotetora *L. Plantarum* MC5 foi menor que a do iogurte controle S. Portanto, a adição de *L. Plantarum* MC5 reduziu significativamente a firmeza das amostras de iogurte. De acordo com esses autores, resultados semelhantes foram relatados por Bancalari *et al.* (2020), onde foi observado que a firmeza dos iogurtes feitos com culturas produtoras de EPS foi geralmente menor do que a do iogurte controle feito sem culturas iniciadoras produtoras de EPS.

#### 4.3 CULTURAS BIOPROTETORAS NA INIBIÇÃO DE FUNGOS E LEVEDURAS

Para melhor avaliar o crescimento de fungos e leveduras em iogurtes formulados com e sem culturas bioprotetoras, os iogurtes foram contaminados intencionalmente com fungos e leveduras na concentração de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte após a etapa de resfriamento a 25°C. Os ensaios foram realizados após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento em câmara fria a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . A diluição de  $10^{-1}$  foi usada para todas as amostras de iogurte (fungos e leveduras) cujos resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de fungos/leveduras (UFC/ mL) ao longo dos 28 dias. Controle-1: 0,03% de conservante químico; Controle-2: 0% de conservantes químicos e culturas bioconservantes comerciais; H: 0,2% HOLDBAC YM-B; F: 0,2% FRESHQ-11.

Dias	Controle-1	Controle-2	H	F
1	20	ausente	ausente	20
7	10	660	ausente	30
14	20	11.500	150	50
21	30	18.000	20	1.720
28	30	21.000	ausente	3.600

Fonte: Elaborado pelos autores

Consideráveis contagens de fungos e leveduras foram observadas após 14 dias, particularmente evidentes para o iogurte Controle-2 (sem conservantes químicos e bioconservantes), que apresentou uma contagem de 11.500 UFC/mL, excedendo o padrão da legislação brasileira de 200 UFC/mL. A partir do dia 21 em diante o iogurte Controle-2 apresentou supercrescimento de leveduras, contagens de 18.000 UFC/mL e após 28 dias

de armazenamento (21.000 UFC/mL). No iogurte Controle-1, foi detectada menor formação de fungos ou leveduras ao longo do período de armazenamento de 28 dias a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ .

Após 14 dias de armazenamento a  $7\pm 1^\circ\text{C}$ , os iogurtes contendo as culturas bioprotetoras H e F apresentaram contagens de fungos e leveduras de 150 e 50 UFC/mL, respectivamente, dentro do padrão estabelecido pela legislação brasileira. Dentre os iogurtes contendo culturas bioprotetoras na dosagem de 0,2% v/v, sem conservantes químicos, o iogurte F sofreu contaminação significativa por fungos e leveduras após 21 e 28 dias de armazenamento, contabilizando 1.720 UFC/mL e 3.600 UFC/mL, respectivamente. Entretanto, o iogurte H, que utilizou dosagem dobrada de HOLDBAC-YMB, manteve a presença de fungos e leveduras abaixo do padrão da legislação brasileira para iogurte (200 UFC/mL) ao longo dos 28 dias de armazenamento.

Considerando os resultados obtidos na Tabela 3 ao longo do período de estudo de 28 dias, os experimentos com iogurte contendo as culturas bioprotetoras HOLDBAC-YMB e FRESHQ-11 demonstraram desempenho muito eficaz na inibição de fungos e leveduras, mesmo com contaminação inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g. Isso foi particularmente notável no iogurte H, onde a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC-YMB foi utilizada na dosagem de 0,2% v/v. Portanto, os resultados obtidos usando bioconservantes sem adição de conservantes químicos são altamente significativos para pesquisas futuras em escalas piloto e industrial.

Schwenninger *et al.* (2008) demonstraram que a combinação de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20 e *Propionibacterium jensenii* aumentou a produção de ácido acético e ácido propiônico, mas diminuiu a concentração de lactato. Foi levantada a hipótese de que o lactato foi consumido por ambas as bactérias. Particularmente, as propionibactérias podem estender o período de armazenamento de produtos alimentícios fermentados devido aos seus componentes antimicrobianos. Este resultado está alinhado com a presente pesquisa, considerando que o iogurte H, que utilizou as culturas bioprotetoras *L. rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, apresentou melhor desempenho na inibição de fungos e leveduras em comparação ao F (*L. rhamnosus*) na mesma dosagem de 0,2% v/v.

## 5 CONCLUSÕES

O iogurte H teve uma acidez titulável significativamente menor durante o período estudado. Os parâmetros de textura dos iogurtes contendo culturas bioprotetoras comerciais H e F (firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade) foram significativamente menores do que aqueles observados no iogurte Controle-2 e não diferiram significativamente do iogurte Controle-1 após 28 dias de armazenamento. Os iogurtes contendo culturas bioprotetoras H e F demonstraram excelente desempenho na inibição de fungos e leveduras, apesar da contaminação inicial de  $1,2 \times 10^1$  UFC/g de iogurte, especialmente o iogurte H usando a cultura bioprotetora comercial HOLDBAC-YMB na dosagem de 0,2% v/v. Assim, os resultados obtidos neste estudo usando bioconservantes sem o uso de conservantes químicos são altamente significativos para pesquisas futuras em escalas piloto e industrial.

## REFERÊNCIAS

- ARENA, M. P.; SILVAIN, A.; NORMANNO, G.; GRIECO, F.; DRIDER, D.; SPANO, G. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. **Front. Microbiol**, n. 7, p. 464, 2016.
- ASHNA, T.; ABDULQADER, R.; QADER, S.; SEBO, N. H. The Effect of Soymilk Addition on Chemical, Physical and Sensorial Properties of Cow Milk Yogurt. **Polytechnic Journal**, n. 12, p. 30–39, 2022.
- BANCALARI, E.; ALINOVI, M.; BOTTARI, B.; CALIGIANI, A.; MUCCHETTI, G.; GATTI, M. Ability of a wild Weissella strain to modify viscosity of fermented milk. **Front. Microbiol**, n. 10, p. 3086–3094, 2020.
- Brasil, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa N° 46, de 23 de outubro de 2007.
- BUKHARI, S. A.; SALMAN, M.; NUMAN, M.; JAVED, M. R.; ZUBAIR, M.; MUSTAFA, G. Characterization of antifungal metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus coryniformis* isolated from rice rinsed water. **Molecular Biology Reports**, n. 47, p. 1871–1881, 2020.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio, n. 2, p. 785, 2005.
- DELAVENNE, E.; ISMAIL, R.; PAWTOWSKI, A.; MOUNIER, J.; BARBIER, G.; BLAY, G. L. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. **Food Control**, n. 30, p. 206-213, 2013.
- DEUTSCH, S. M.; FALENTIN, H.; DOLS-LAFARGUE, M.; LAPOINTE, G.; ROY, D. Capsular exopolysaccharide biosynthesis gene of *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 125, p. 252-258, 2008.
- FAYYAZ, N.; SHAHIDI, F.; ROSHANAK, S. Evaluation of the bioprotectivity of *Lactobacillus* binary/ternary cultures in yogurt. **Food Science Nutritional**, n. 8, p. 5036-5047, 2020.
- FERREIRA, C. L. L. F. **Grupo de bactérias lácticas Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas**. In: Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003.
- FUSELLI, F.; GUARINO, C.; LA MANTIA, A.; LONGO, L.; FABERI, A.; MARIANELLA, R. M. Multidetecção de preservativos em queijos por cromatografia–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, n. 906, p. 9–18, 2012.

GARNIER, L., PENLAND, M., THIERRY, A., MAILLARD, M. B., JARDIN, J., COTON, M., *et al.* Antifungal activity of fermented dairy ingredients: identification of antifungal compounds. **International Journal Food Microbiology**, n. 322, p. 108574, 2020.

GUYOMARC'H, F.; FRANCIUS, G.; PARAYRE, S.; MADEC, M-N; DEUTSCH, S.-M. Surface properties associated with the production of polysaccharides in the food bacteria *Propionibacterium freudenreichii*. **Food Microbiology**, n. 92, p. 103579, 2020.

HOLZAPFEL, W. H., R. GEISEN, AND U. SCHILLINGER. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal Food Microbiology**. n. 24, p. 343–362, 1995.

HORNBAEK, T.; BIRKEROED; LISBERG, M.; ESPERGAERDE; KEJ, S. D.; FREDERIKSBERG. Bioprotection using *Lactobacillus paracasei* strains. **Patent Application Publication No.: US 2015/0064152 A1**, United States, p. 3, 2015.

KHAN-MOHAMMADI, S.; FADAEI, V.; MIRDAMADI, S. Characterization of yoghurt supplemented with *Lacticaseibacillus rhamnosus* as a bioprotective antifungal culture. **Mljekarstvo**, n. 73 (1), p. 59-72, 2023.

LEYVA SALAS, M., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., COTON, E. Antifungal microbial agents for food biopreservation — a review. **Microorganisms**, n. 5, p. 37, 2017.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, n. 15(12), p. 546-553, 2007.

RASHWAN, A. K; KARIM N.; XU, Y.; CUI, H.; FANG, J.; CHENG, K.; MO, J.; CHEN, W. Chemical composition, quality attributes and antioxidant activity of stirred-type yogurt enriched with *Melastoma dodecandrum* Lour fruit powder. **Food Funct**, n. 13, p. 1579 – 1592, 2022.

RASHWAN, A. K; OSMAN, A. I.; CHEN, W. Natural nutraceuticals for enhancing yogurt properties: a review. **Environmental Chemistry Letters**, n. 21, p. 1907–1931, 2023.

SCHOLZ, C.F.P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 66, p. 4422–4432, 2016.

SCHWENNINGER, S. M.; LACROIX, C.; TRUTTMANN, S.; JANS, C.; SPÖRNDLI, C.; BIGLER, L.; MEILE, L. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. **Journal Food Protect**, n. 71, p. 2481–2487, 2008.



SHI, C.; MAKTABDAR, M. Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. **Frontiers in microbiology**, n. 12, p. 819684, 2022.

SILVA, M., AND LIDON, F. Food preservatives - an overview on applications and side effects. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, n. 28, p. 366-373, 2016.

STACKEBRANDT, E.; CUMMINS, C. S.; JOHNSON, J. L. **Family Propionibacteriaceae: The genus *Propionibacterium***. In *The Prokaryotes*. Springer: New York, NY, USA; p. 400–418, ISBN 978-0-387-25493-7, 2006.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, n. 69(12), p. 37-44, 2001.

ZHAO, X.; LIANG, Q. EPS-Producing *Lactobacillus plantarum* MC5 as a Compound Starter Improves Rheology, Texture, and Antioxidant Activity of Yogurt during Storage. **Foods**, n. 11, p. 1660, 2022.