

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS DE SORVETE FUNCIONAL À BASE DE ISOLADO PROTÉICO DE SORO DE LEITE FERMENTADO COM KEFIR

P.T. Saito¹, S. Garcia¹

1- Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos – Programa em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, – CEP: 86057-970 – Londrina – PR – Brasil, Telefone: +55 (43) 3371-4080 – e-mail: (paulosaitoh@outlook.com); (sgarcia@uel.br)

RESUMO – A conscientização dos consumidores por benefícios à saúde através de alimentos contendo probióticos e ingredientes funcionais, tem atraído o interesse no desenvolvimento de novos produtos. Pesquisas vêm demonstrando que sorvetes pode ser um veículo adequado para microrganismos probióticos, como o *Kefir*, que possui características funcionais, e substâncias prebióticas, como inulina e oligofrutose. O objetivo deste estudo foi desenvolver um sorvete funcional à base de isolado protéico de soro fermentado com *Kefir*, avaliar a viabilidade de bactérias ácido-láticas no sorvete fermentado durante 90 dias de armazenamento. Foram desenvolvidas três formulações de sorvete contendo diferentes fibras; inulina, polidextrose e maltodextrina, além da amostra padrão. A contagem de microrganismos vivos com potencial probiótico atingiu valores mínimos de 10^8 UFC/g nas três formulações de sorvete. As fibras podem ter desempenhado atividade protetora para os potenciais probióticos, mantendo os índices finais de sobrevivência, enquanto que a amostra controle apresentou diminuição dos valores após 60 dias.

ABSTRACT – Consumer awareness of probiotics and functional ingredients for health benefits has attracted interest in the development and commercialization of products, such as kefir, which has functional characteristics. Research has shown that ice cream can be a suitable vehicle for probiotic microorganisms and prebiotic substances, such as inulin and oligofructose. The aim of this study was to develop a functional ice cream based on whey protein isolate fermented with kefir, to evaluate the viability of lactic acid bacteria in the fermented ice cream during 90 days of storage. Three ice cream formulations were developed containing different fibers: inulin, polydextrose and maltodextrin, and standard sample. The counts of viable and potentially probiotic microorganisms showed minimum average of 10^8 CFU/g in the three ice cream formulations. The fibers may have played a protective role for potential probiotics, maintaining the final survival rates, while the control sample showed decreased values after 60 days.

PALAVRAS-CHAVE: Gelados comestíveis; potencial probiótico; funcional

KEYWORDS: Edible ice cream; probiotic potential; functional

1. INTRODUÇÃO

O interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento da produção de produtos alimentícios tem aumentado nos últimos anos devido à conscientização dos consumidores sobre os diversos benefícios à saúde promovidos por produtos contendo probióticos, funcionais, como o *Kefir*, e algumas substâncias prebióticas (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2002; Menrad, 2003; Cruz et al., 2009).

Os grãos de *Kefir* possuem formas irregulares, massa gelatinosa, cujo tamanho pode variar de 1 a 6 mm de diâmetro, tendo coloração variando de branco a amarelo, lembrando pequenas couve-flores ou pipoca (Otlés e Cagindi, 2003). Contém bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

ácido-acéticas (*Acetobacter*) e leveduras, misturadas com caseína e açúcares complexos presos a uma matriz de polissacarídeos, descrita como uma associação simbiótica. Hill et al. (2014) chamam produtos como o *Kefir*, que possui uma população diversificada e não identificada completamente de “produtos com microrganismos vivos”.

O padrão para qualquer alimento adicionado de probióticos com alegações de saúde posto à venda é que ele deve conter por grama pelo menos 10^8 a 10^9 UFC de bactérias probióticas viáveis (Hill et al., 2014).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para microrganismos probióticos e para algumas substâncias prebióticas, como inulina e oligofrutose (Cruz et al., 2009). Aliado a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infante-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do consumo interno, estimulam a continuidade de estudos visando o desenvolvimento de sorvetes funcionais (Cruz et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi elaborar um sorvete funcional à base de isolado protéico de soro com fibras, fermentado com cultura de *Kefir* e verificar a viabilidade de bactérias ácido-láticas durante 90 dias de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Para formulação do sorvete e realização das análises foram necessários isolado protéico de soro, inulina, polidextrose, maltodextrina, mistura de monoacilgliceróis (Emustab), liga neutra, saborizante de morango. O isolado protéico de soro foi obtido através da empresa Alibra; inulina e celulose microcristalina fornecidos pela empresa Metachem; sucralose, polidextrose e maltitol doados pela empresa TOVANI, e eritritol doado pela Cargill. A cultura tradicional de *Kefir* foi fornecida pela Prof. Dra. Marly Sayuri Katsuda.

2.2 Preparo do *Kefir*

O inóculo foi preparado descongelando-se os grãos de *Kefir*, e a sua reativação foi realizada retirando todos os resíduos presentes nos grãos com água estéril, filtrando-se através de uma peneira, e armazenando os grãos em leite na proporção 1:3. Foram repicados e aplicados períodos curtos de transferência e mais repetitivos para se obter uma recuperação mais rápida no metabolismo dos grãos de *Kefir*. Após a reativação, os grãos foram mantidos imersos em leite integral UHT comercial à temperatura de 20°C para a fermentação, sendo repicado durante o período de 1 a 4 dias até a execução do experimento na produção dos sorvetes.

2.3 Elaboração da formulação do sorvete

Neste estudo, foram utilizados os seguintes ingredientes para a elaboração da formulação base do sorvete: leite desnatado UHT (69,93%); polióis: eritritol (5,6%) e maltitol (5,6%), isolado protéico de soro (WPI) (9,79% em peso), celulose microcristalina (0,6%), Emustab (0,7%), liga neutra (0,7%) e de saborizante (2,1%). Testes preliminares no desenvolvimento da formulação foram realizados através do balanço de massa (Soler e Veiga, 2001).

Com a formulação base preparada, foram desenvolvidas três formulações de sorvete contendo diferentes ingredientes alimentares (fibras dietéticas), inulina (amostra SWI), polidextrose (amostra SWP) e maltodextrina (amostra SWM), na proporção de 5,6%. O sorvete controle (amostra SP) foi elaborado com formulação e ingredientes semelhantes ao sorvete tradicional comercial. A recomendação mínima estabelecida

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



pela ANVISA para alegação de propriedade funcional é de 5g de inulina na porção diária e 2,5g de fibra solúvel (Brasil, 2016).

Os grãos de *Kefir* foram inoculados na proporção de 5 a 10% (m/m) em leite desnatado UHT (para amostras SWI, SWP e SWM) ou leite integral UHT (para SP) e fermentados por um período de 24h e a seguir a bebida fermentada filtrada (após separação dos grãos) foi transferida para a calda do sorvete contendo os ingredientes e suas proporções. Após a fermentação por 16h a 24h adicionais ou até atingir pH 4,5, os grãos foram retirados por peneiragem, lavados e mantidos em leite desnatado até uma nova realização de fermentação.

2.4 Processamento do sorvete

A fermentação do leite desnatado UHT com *Kefir* foi realizada 24h antes da produção do sorvete numa proporção de 10% (m/v) de grãos de *Kefir*. Os ingredientes da calda, exceto o Emustab e o saborizante foram homogeneizados em liquidificador semi-industrial, sendo agitados por 5 minutos e a mistura foi pasteurizada à 80°C/5 minutos. A calda foi resfriada até 20°C e recebeu a proporção de 40% (m/m) de leite fermentado com *Kefir*, sendo fermentada por 24h na a 20 °C. A calda fermentada foi maturada à temperatura de 4°C por 24h com a finalidade estabilizar a fermentação. Após o período de estabilização homogeneizou-se o Emustab e o saborizante de morango na calda em batedeira planetária por 5 minutos para a incorporação de ar (overrun) e posteriormente congelou-se a calda à - 20°C na sorveteira (R. Camargo). Os sorvetes foram então acondicionados em embalagens plásticas próprias com capacidade para dois litros e estocados à temperatura de - 25°C em freezer horizontal para o endurecimento do produto.

2.5 Viabilidade das bactérias ácido-láticas

A contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) totais foi realizada segundo Garrote et al. (2001) com modificação. A contagem foi feita em meio MRS ágar com incubação a 37°C por 72h sob aerobiose.

A contagem de possível presença de *Lactococcus lactis spp* foi realizada segundo Irigoyen et al (2005) com algumas modificações. As diluições foram semeadas em placas contendo agar M17 (pH 7,2 ± 0,2), suplementado com nistatina (40.000 UI) (Magalhães-Guedes et al., 2011). Realizou-se semeadura em profundidade (pour plate) e as placas foram incubadas a 30°C por 48h, em anaerobiose. Para este experimento as contagens foram feitas em triplicata. O resultado foi expresso em log UFC.g-1 do produto.

A enumeração seletiva de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) e *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) foi realizada segundo Tabasco et al. (2007) com modificações. Para obter um meio seletivo diferencial para estas espécies foi misturado o caldo base MRS isento de glicose enriquecido com 0,2% de Tween 80 e suplementado com 1% de maltose, 0,05% de cisteína, 1,5% de agar (MRS-maltose), e suplementado com nistatina (40.000 UI). As placas foram semeadas por pour-plate com sobrecamada de ágar (sobreposição de camadas) e incubadas a 37°C sob anaerobiose durante 72h.

A enumeração de *L. acidophilus* foi realizada segundo Van de Castele et al. (2006). O meio MRS foi suplementado com 0,5 ppm de Clindamicina esterilizado por membrana filtrante com 0,22µm de porosidade (MRS-clindamicina), foram semeadas por pour-plate e incubadas a 37°C sob anaerobiose por 72h.

As avaliações das contagens realizadas quinzenalmente até período de 90 dias de estocagem para verificar a viabilidade de espécies de *Lactobacillus spp* durante este período de armazenamento dos produtos. Os dados foram tratados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de média de Tukey com nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Viabilidade de bactérias ácido-láticas

Os resultados do número de BAL e potenciais probióticos viáveis nas amostras de sorvete estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Contagem de bactérias ácido-láticas nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C

Meios	Tempo (Dias)	Formulações				Média
		SWI	SWP	SWM	SP	
M17	1	8,45 ± 0,05 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{aAB}	8,40 ± 0,01 ^{aAB}	8,10 ± 0,14 ^{aB}	8,32 ^a
	15	8,45 ± 0,01 ^{aA}	8,45 ± 0,12 ^{aA}	8,39 ± 0,06 ^{aA}	8,13 ± 0,13 ^{aA}	8,36 ^a
	30	8,49 ± 0,03 ^{aA}	8,35 ± 0,11 ^{aA}	8,40 ± 0,03 ^{aA}	8,08 ± 0,20 ^{aA}	8,29 ^a
	45	8,47 ± 0,03 ^{aA}	8,29 ± 0,21 ^{aAB}	8,31 ± 0,15 ^{aAB}	7,80 ± 0,28 ^{abB}	8,24 ^a
	60	8,43 ± 0,02 ^{aA}	8,42 ± 0,11 ^{aA}	8,35 ± 0,01 ^{aA}	7,30 ± 0,30 ^{bB}	8,21 ^a
	75	8,41 ± 0,07 ^{aA}	8,45 ± 0,17 ^{aA}	8,37 ± 0,01 ^{aA}	7,45 ± 0,02 ^{bB}	8,15 ^a
	90	8,40 ± 0,06 ^{aA}	8,34 ± 0,02 ^{aA}	8,39 ± 0,02 ^{aA}	7,32 ± 0,03 ^{bB}	8,12 ^a
Média		8,444 ^a	8,372 ^a	8,375 ^a	7,784 ^b	
MRS	1	8,46 ± 0,02 ^{aA}	8,40 ± 0,04 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{aA}	8,33 ± 0,04 ^{aA}	8,38 ^a
	15	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,40 ± 0,08 ^{aA}	8,38 ± 0,02 ^{aA}	8,33 ± 0,07 ^{aA}	8,38 ^a
	30	8,40 ± 0,04 ^{aA}	8,40 ± 0,06 ^{aA}	8,39 ± 0,02 ^{aA}	8,29 ± 0,09 ^{aA}	8,37 ^a
	45	8,39 ± 0,07 ^{aA}	8,35 ± 0,07 ^{aA}	8,36 ± 0,08 ^{aA}	8,35 ± 0,07 ^{aA}	8,36 ^a
	60	8,45 ± 0,00 ^{aA}	8,43 ± 0,07 ^{aA}	8,41 ± 0,01 ^{aA}	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,42 ^a
	75	8,34 ± 0,03 ^{aA}	8,34 ± 0,05 ^{aA}	8,37 ± 0,13 ^{aA}	8,37 ± 0,10 ^{aA}	8,35 ^a
	90	8,40 ± 0,02 ^{aA}	8,35 ± 0,04 ^{aA}	8,40 ± 0,08 ^{aA}	8,30 ± 0,03 ^{aA}	8,36 ^a
Média		8,406 ^a	8,383 ^{ab}	8,375 ^{ab}	8,340 ^b	

*Resultados expressos em log UFC g-1. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não são diferentes estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais, na linha, para cada formulação, não são diferentes estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Ágar MRS suplementado com nistatina, incubado a 37 °C sob aerobiose = contagem de BAL, ágar M17 suplementado com nistatina, incubado a 30 °C sob anaerobiose = seletivo para *Lactococcus spp*; médias de 3 partidas de cada amostra. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, é possível observar ao longo de 90 dias de armazenamento que as formulações com inulina (SWI), polidextrose (SWP) e maltodextrina (SWM) não apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na contagem das células viáveis de BAL e contagens em M17. Porém, houve diferença significativa na formulação do sorvete padrão (SP) para M17, onde ocorreu uma redução da ordem de menos que um ciclo logarítmico ao longo do período após 45 dias de estocagem, na contagem de células viáveis. Entretanto apesar dessa redução, a contagem ainda esteve próxima a 10^7 UFC/g, e se o consumo fosse de apenas 10g do sorvete, a contagem de células viáveis estaria em $6,3 \times 10^8$ UFC/g.

Nas contagens de bactérias ácido-láticas em MRS, em todas as formulações de sorvete não houve diminuição significativa na viabilidade a nível de 5 % durante os 90 dias, garantindo que os sorvetes desenvolvidos possuam quantidade suficiente de bactérias ácido-láticas para ser considerado como um produto contendo microrganismos vivos com potencial probiótico e funcional.

As contagens em meio seletivo para *L. acidophilus* e *L. paracasei* em meio MRS-maltose, e para *L. acidophilus* em meio seletivo MRS-clindamicina estão apresentadas na Tabela 2.



Neste estudo, a contagem diferencial para possíveis presenças de *Lactobacillus acidophilus* e *L. paracasei* apontou presença de colônias na ordem logarítmica de 8 ciclos nas formulações dos sorvetes e manutenção dos números após o congelamento. A contagem em MRS-clindamicina também apresentou o mesmo comportamento, exceto para amostra SP, onde houve diminuição significativa na ordem logarítmica de 1 ciclo após 90 dias de armazenamento.

Tabela 2 – Contagem em MRS-maltose e MRS-clindamicina nas diferentes formulações de sorvetes funcionais ao longo de 90 dias de estocagem a -18°C

Meios	Tempo (Dias)	Formulações				
		SWI	SWP	SWM	SP	Média
MRS- Maltose	1	8,80 ± 0,03 ^{abA}	8,77 ± 0,02 ^{aa}	8,75 ± 0,02 ^{aA}	8,69 ± 0,03 ^{aB}	8,75
	30	8,81 ± 0,01 ^{aa}	8,76 ± 0,01 ^{aAB}	8,73 ± 0,01 ^{aBC}	8,71 ± 0,03 ^{aC}	8,75
	60	8,77 ± 0,02 ^{ba}	8,75 ± 0,05 ^{aa}	8,73 ± 0,04 ^{aA}	8,43 ± 0,04 ^{bb}	8,67
	90	8,77 ± 0,00 ^{ba}	8,76 ± 0,01 ^{aa}	8,74 ± 0,11 ^{aA}	8,31 ± 0,04 ^{cB}	8,64
Média		8,79	8,76	8,74	8,53	
MRS- clindami- cina	1	8,93 ± 0,02 ^{aa}	8,92 ± 0,02 ^{aa}	8,88 ± 0,02 ^{aAB}	8,77 ± 0,10 ^{aB}	8,87
	30	8,92 ± 0,02 ^{aa}	8,90 ± 0,04 ^{aa}	8,87 ± 0,03 ^{aA}	8,75 ± 0,05 ^{aB}	8,86
	60	8,82 ± 0,04 ^{abA}	8,83 ± 0,03 ^{abA}	8,61 ± 0,13 ^{bb}	8,35 ± 0,03 ^{bc}	8,65
	90	8,74 ± 0,11 ^{ba}	8,76 ± 0,05 ^{ba}	8,57 ± 0,09 ^{ba}	7,47 ± 0,27 ^{cB}	8,38
Média		8,85	8,87	8,74	8,34	

*Resultados expressos em log UFC g-1. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras minúsculas iguais, na coluna, não são diferentes estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Médias ± desvio padrão acompanhadas de letras maiúsculas iguais, na linha, para cada formulação, não são diferentes estatisticamente, no nível de $p \leq 0,05$. Ágar MRS suplementado com nistatina, incubado a 37 °C sob aerobiose = contagem de BAL, ágar M17 suplementado com nistatina, incubado a 30 °C sob anaerobiose = seletivo para *Lactococcus spp*; médias de 3 partidas de cada amostra. SP = Sorvete Padrão; SWI = Sorvete com Inulina; SWP = Sorvete com Polidextrose; SWM = Sorvete com Maltodextrina

A maior ou menor resistência ao congelamento e armazenamento é uma característica própria do microrganismo, que varia com o gênero e espécie do mesmo, porém também depende da matriz e das condições de processo (Miguel e Rossi, 2003; Pinto et al., 2000).

As condições de armazenamento de sorvete de iogurte não são consideradas ideais para a sobrevivências de bactérias lácticas. O processo de congelamento dos produtos pode causar a redução de ½ a 1 ciclo logarítmico na contagem das células viáveis segundo Davidson et al. (2000). Uma possível justificativa para essa diminuição de células viáveis na amostra padrão (SP), é que a adição de inulina e fibras em produtos lácteos, pode auxiliar na sobrevivência e estabilidade de microrganismos probióticos empregados devido às suas propriedades crioprotetoras, auxiliando na redução da formação de cristais de gelo durante as possíveis oscilações de temperatura que podem ocorrer durante o armazenamento dos produtos (Akalin e Erisir, 2008).

Para Van de Castele et al. (2006), na prática, a enumeração diferencial de bactérias probióticas em conjunto com cultura starter ou outras cepas probióticas é muitas vezes difícil de alcançar devido à presença de múltiplas espécies de BAL intimamente relacionadas em produtos como iogurtes e queijos fermentados, e neste caso grãos de *Kefir*, uma microbiota muito mais complexa.

4. CONCLUSÃO

Os produtos fermentados e formulados apresentaram quantidade mínima necessária de microrganismos benéficos (UFC/g) segundo padrões internacionais para que os produtos lácteos sejam considerados como potenciais probióticos e contendo microrganismos vivos.



5. AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo à pesquisa brasileira através da bolsa de estudos.

Agradecimentos ao Departamento Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), e agradecimentos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Londrina (UTFPR) pela assistência técnica para a execução do trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akalin, A.S. & Erisir, D. (2008) Effects of inulin and oligofrutose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. *Journal of Food Sci.*, v.73, n.4, p.184-188, 2008.
- Brasil. Ministério da Saúde (2016). Alegações de propriedade funcional e de saúde. Atualizado em março de 2016. Disponível em;<<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wwr>>.
- Cruz A.G., Antunes, A.E.C., Sousa, A.L.O.P., Faria, J.A.F., Saad, S.M.I. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, v. 42, p. 1233-1239.
- Cruz A.G., Faria, J.A.F. (2011). *Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas*. São Paulo: Livraria Varela, cap 15, p. 359-388.
- Davidson, R.H., Duncan, E., Hackney, C.R., Eigel, W.N., Boling, J.W. (2000). Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *J. Dairy Sci.*, v.83, n.4, p.666-673.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of Kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 639-652.
- Hill, C., Guarner, F., ReidShow, G., Sanders, M.L. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.
- Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C. (2002). Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy Journal*, v. 11, p. 1-17.
- Magalhães-Guedes, K.T., Pereira, G.V.de.M., Campos, C.R., Dragone, G. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, p.693-702.
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *J.of Food Eng.*, v. 56, p. 181-188
- Miguel, D. & Rossi, E. (2003) Viabilidade de bactérias ácido lácticas em sorvete de iogurte durante o período de estocagem. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v.14, n.1, p. 93-96.
- Otles, S. & Cagindi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Food Engineering Department*, v.2, p.54-59.
- Pinto, M.F., Ponsano, E.H.G., Delbem, A.C.B. Lara, J.A.F. (2000). Condições higiênico-sanitária de sorvetes fabricados por indústrias artesanais no município de Araçatuba - SP. *Higiene Alimentar*, v.14, n.72, p. 50-52.
- Soler, M.P. & Veiga, PG. (2001). *Sorvetes*. Campinas: ITAL/CIAL, 2001. 68p.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Int. Dairy J.*, v. 17, p. 1107–1114
- Van Castele, S., Vanheuverzwijn, T., Ruysen, T., Van Assche, P., Swings, J., Huys, G. (2006). Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *Int Dairy J.* v.16, p.1470-1476