

## ESTUDO DO EFEITO DAS ALTERAÇÕES DE TEMPERATURA DE ESTOCAGEM NA VIABILIDADE DE PRODUTOS PROBIÓTICOS

Andreza Santos Marnet  
dezzamarnet@gmail.com

**Resumo:** Probióticos são microrganismos vivos que, quando são consumidos agem no trato gastrointestinal do organismo do hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal, a ação desses micro-organismos inclui síntese de substâncias microbianas que resultam na competição por nutriente que estão relacionados com o crescimento de bactérias patogênicas, modificação do pH do meio intestinal, inativação das toxinas produzidas por bactérias patogênicas, aumento da secreção da mucosa e estimulação da fagocitose. Dos micro-organismos utilizados para esta função os que mais se destacam são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Dentre os produtos mais populares, destacamos os leites fermentados e iogurtes adicionados de bactérias lácticas probióticas podem desempenhar importante papel na ingestão desses micro-organismos selecionados. Assim esta pesquisa se propôs a verificar a concentração de células viáveis contidas em leite fermentados e iogurtes com apelo probióticos e estudar os efeitos da alteração de temperatura nesses produtos, essa verificação foi feita através da técnica de contagem *Spread Plate*. Os resultados mostraram que nem todas as marcas analisadas estavam de acordo com a legislação vigente a Instrução Normativa 46 de 23 de outubro de 2007, que estabelece que em temperatura de 1 a 10°C deve conter a concentração mínima de  $10^6$  de células viveis, no enteando foram encontrados valores de células viáveis de  $9,7 \cdot 10^4$  até  $1,4 \cdot 10^8$ .

**Palavras-Chave:** Probióticos, Leite Fermentado e Iogurte.

### INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde e bem-estar tem sido crescente entre a população, que por meio de uma alimentação mais saudável, exercícios físicos e a ingestão reduzida de gorduras e açúcares tenta alcançar uma maior

longevidade, nesse contexto os alimentos funcionais como os probióticos assumem um papel de destaque (Antunes et al., 2007).

Os probióticos são ingredientes que não são digeríveis incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como um substrato seletivo no nível do cólon (Gibson, 1998).

Existem uma série de produtos alimentícios comercializados com apelo de ter propriedades probióticas dentre eles os queijos, kefir, iogurtes leites e coalhadas, este trabalho destaca os chamados leites fermentados, são alimentos com propriedades funcionais que contribuem de maneira positiva na saúde do consumidor devido a existência de bactérias lácteas na sua formulação e, por vezes essas culturas chamadas de probióticas são produtoras de metabólicos durante a fermentação.

Entre os principais efeitos benéficos estão o controle das infecções intestinais, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, e o estímulo do sistema imunológico, pelo estímulo da produção de anticorpos (Sandine et al., 1972; Gilliland, 1989; Speck, 1977; Gilliland, 1983; Sreekumar, Hosono, 2000; Naidu, Clemens, 2000). O uso de culturas probióticas não inclui microrganismos potencialmente patogênicos e é motivador dos mecanismos de defesa do organismo (Puupponen-Pimia et al., 2002). A ação desses micro-organismos incluem a síntese de substâncias microbianas que resultam na competição por nutriente que estão relacionados com o crescimento de

bactérias patogênicas, modificação do pH do meio intestinal, inativação das toxinas produzidas por bactérias patogênicas, aumento da secreção da mucosa e estimulação da fagocitose (Fox, 1988; Madsen, 2001; Gibson, 2004; Pant et al.; 2007).

Um produto para ser classificado como probiótico precisa que sua eficiência e segurança sejam comprovadas por pesquisas e estudos clínicos (Sanders, 2003). Os micro-organismos utilizados na produção de alimentos devem conter a sua classificação com GRAS (Generally Regarded As Safe), que apresente adesão à mucosa intestinal sejam tolerantes aos ácidos e à biliar (DUNNE et al., 2001).

As principais espécies utilizadas pela indústria de alimentos são o *Bifidobacterium Spp*, *L. acidophilus* e o *L. casei*. Por possuir um grande histórico no que se refere à produção de derivados de leite e por estar presente na microbiota intestinal humana os lactobacilos sai na frente dos demais (Shah, 2007).

Diversos estudos comprovam a relação que existe entre a dieta, saúde e saúde intestinal. A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que micro-organismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos patogênicos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos, com consequente infecção bacteriana (Ziemer, Gibson, 1998).

A sobrevivência de bactérias probióticas no produto alimentar é crítica e precisa atingir populações suficientemente altas (acima de  $10^6$  UFC / ml ou g) para ser do consumidor. No entanto, os autores propõem que a importância fisiológica da dose diária mínima da cultura probiótica considerada terapêutica seja de  $10^{-6}$  e  $10^{-9}$  UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto.

## OBJETIVOS

### Geral

Quantificar a população de micro-organismos em leites fermentados e iogurtes ditos conter probióticos comerciais.

### Específicos

Avaliar se os produtos contêm o número de micro-organismos estabelecidos pela Instrução Normativa 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Observar o impacto causado nas células contidas nos leites fermentados e iogurtes quando são submetidos a temperaturas diferentes da recomendada pelo fabricante.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Probióticos

Segundo Saad (2006), Sanders (2009) probióticos são micro-organismos vivos que proporciona benefícios à saúde do hospedeiro se utilizados com a dosagem e frequência recomendada, as culturas devem ter os efeitos benéficos comprovados. O uso de probióticos teve seu início no Oriente Médio onde eram usados com objetivo terapêutico para tratar infecções gastrointestinais (Carli, 2006). O primeiro leite fermentado foi produzido por acidente através do armazenamento de leite em sacolas feitas de estômago de animais, o clima árido e seco favoreceu a multiplicação das bactérias presentes no leite e no recipiente que por sua vez modificou a estrutura do alimento, as características sensoriais e também foi um meio de conservação para o leite (Haenlein, 2007; Yildiz, 2010).

Os primeiros estudos sobre leite fermentado surgiram com Elia Metchnikof no início do século XX. Elia estudou os benefícios do leite

fermentado e foi responsável pela teoria que o consumo diário de leite fermentado contribuía para o prolongamento da vida de camponeses residentes na Bulgária. (Lerayer et al; 2002)

Em Barcelona no ano de 1971, Isaac Carosso iniciou a produção industrial de leite fermentado. Foi a primeira vez que houve o consumo em massa desse alimento (Saccaro, 2008). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define que; “Entende-se por leite fermentado produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite ou reconstituídos, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes micro-organismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o seu prazo de validade (Brasil, 2007).

Para Sanders, 1998, produtos probióticos como os leites fermentados e iogurtes favorecem à nutrição básica, promovem a saúde e não à cura de doenças. O homem possui uma espécie de ecossistema formado por micro-organismos que interferem positivamente nas funções fisiológicas do hospedeiro desde que as bactérias patogênicas não dominem. Para o equilíbrio da microbiota intestinal e seu funcionamento correto a suplementação com probióticos é uma proposta viável (Bielecha, Biedrzyck, Maykowska, 2002).

Segundo a ANVISA um micro-organismo ser considerado como probiótico ele deve passar por estudos clínicos de linhagem, avaliação de autoridades regulamentadoras, evidência dos efeitos benéficos da espécie, opinião de organizações científicas independentes, estudos “in vitro” e estudos “in vivo”. No ano de 2017 a ANVISA divulgou uma lista de linhagens de micro-organismos validados e autorizados para o uso como probióticos. As linhagens escolhidas foram: *Bacillus coagulans* GBI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium lactis*

BL-04, *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Os dois gêneros mais estudados no que se refere a bactérias com propriedades probióticas são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* por sua concentração elevada na microbiota intestinal, pois sua taxa de sobrevivência é estimada entre 20% a 40%, ou seja, alimentos formulados com essas bactérias oferecem melhoras nas funções intestinais (Ferreira, 2012).

Bactérias lácteas fazem parte do grupo de micro-organismos Gram-positivo, não formadores de esporos, estritamente fermentativos e anaeróbicos (Klein et al., 1998). Para a legislação brasileira leite fermentado poder ser: Leite cultivado, iogurte, kefir, leite acidófilo ou acidofilado, kumys e coalhada, o principal fator de diferenciação é o tipo de micro-organismo utilizado para inoculação. (Brasil, 2007).

No mercado mundial existem vários produtos tanto de origem farmacêutica como de origem alimentícia. A indústria de laticínios tem acrescentado culturas probióticas para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. Lactobacilos e bifidobactérias, pertencentes ao grupo de bactérias benéficas, estão sendo utilizados como probióticos para a recuperação e para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal (Ferreira, 2012).

Entre os principais efeitos benéficos estão o controle das infecções intestinais, a melhor absorção de determinados nutrientes, a melhor utilização de lactose e o alívio dos sintomas de intolerância a esse açúcar, a diminuição dos níveis de colesterol, e o estímulo do sistema imunológico, pelo estímulo da produção de anticorpos (Sandine et al., 1972; Gilliland, Speck, 1977; Kim, Gilliland, 1989; Fuller, 1989; Sreekumar, Hosono, 2000; Naidu, Clemens, 2000). Os produtos fermentados probióticos sofrem influência das culturas

usadas na formulação do produto, interferindo nos atributos sensoriais dele. (Mattila Sandholm et al.; 2002). A incorporação de probióticos como adjunto em produtos lácteos intensifica as propriedades funcionais, resultando no maior consumo. (Kristo; Biliaderisi; Tzanetakis, 2003).

Segundo Sivieri & Oliveira (2002) a vida de prateleira de bebidas lácteas é de 28 dias, essa vida útil de prateleira de um produto probiótico vai desde a data de produção e embalagem até o prazo de validade.

## METODOLOGIA

### Avaliação de viabilidade da cultura existente em bebida láctea

Para as análises foram adquiridas seis amostras de seis marcas diferentes de leite fermentado e iogurtes com propriedades probióticas que mais se repetiam nos supermercados no município de Aracaju-SE, foram selecionadas a partir da verificação de embalagens da data de fabricação, data de vencimento e numeração de lote assim garantindo a integridade do produto e a não utilização de amostras violadas que possam alterar o produto.

Os produtos foram levados em embalagens térmicas para que não houvesse a mudança de temperatura para serem analisadas no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de Sergipe - Campus São Cristóvão.

A verificação das células viáveis foi feita dentro do prazo de validade, a técnica utilizada foi a *Spread Plate* que consiste em: Separar amostras com 25 ml por meio de pipetas estéreis em ambiente asséptico e transferidas para Erlenmeyers de 250 ml contendo 225 ml de água peptonada à 0,1%, após uma homogeneização por agitação manual é retirada a primeira alíquota (refrigerada T1) para inoculação de 0,1 ml para uma placa de Petri com Ágar específico para *Lactobacillus*, homogeneizada com alça de

drigalski, identificada com o nome da marca e nas diluições  $10^{-1}$  até  $10^{-4}$  que também foram feitas usando a amostra inicial.

A segunda dupla (T2) de amostras só foi inoculada nas placas após ficarem em temperatura de 37°C por uma hora e foram inoculadas com as mesmas diluições das anteriores, a última dupla de amostra (T3) foi coletada após ser mantida em temperatura de 37°C por três horas repetindo as diluições anteriores.

Todas amostras foram encaminhadas para uma estufa bacteriológica em uma temperatura de 37°C por 48 horas e por fim todas as placas foram retiradas para a contagem manual de colônias. A determinação do tempo e temperaturas escolhidas pela metodologia acima foi baseado em pesquisas anteriores feitas por Tamime & Robinson, 1991 informando que a temperatura de incubação da cultura BAL deve estar na faixa de 40 a 45°C por um período que pode variar entre 2,5 a 5 horas, que é uma condição ótima de crescimento para esses micro-organismos. A contagem de colônias das placas foi feita por meio do cálculo manual pelo contador de colônias. Obteve-se resultados multiplicando-se o número de colônias enumeradas por 10 e pelo inverso da diluição selecionada para contagem. Todos os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de colônia (UFC) por mililitro do produto (BRASIL, 2007).

### Resultados e Discussão

Os resultados apontam que a maioria das amostras estão de acordo com os padrões da legislação vigente a Instrução Normativa 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece a concentração de micro-organismos mínima de  $1 \times 10^6$  durante sua vida de prateleira como podemos observar na tabela 1 abaixo:

**Tabela 1** - Tabela com a contagem de células viváveis de leites fermentados e iogurtes

CONTAGEM DE PLACAS			
	T1	T2	T3
AMOSTRAS	Refrigerada ±10°C	60min	180 min
A - Leite	$2,7 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^7$
B - Iogurte	$1,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^5$
C1 - Leite	$1,6 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^7$
C2 - Leite	$9,0 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$
D - Leite	$9,7 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$
I - Iogurte	$1,0 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$
Y - Leite	$7,6 \cdot 10^6$	$9,9 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^6$

Apenas duas das amostras tiveram sua contagem inicial refrigerada inferior a exigida pela legislação com valores de  $1,0 \cdot 10^5$  a  $9,7 \cdot 10^5$ , cinco amostras atingiram o valor mínimo estabelecido pela legislação com resultados de  $1,6 \cdot 10^7$  até  $1,0 \cdot 10^8$  mas, todas as amostras se mostraram suscetíveis a temperatura, tendo sua contagem modificada em relação a quantidade inicial, essa modificação pode ser atribuída a problemas no transporte até os pontos de venda ou em falhas na refrigeração nos pontos de venda segundo estudos feitos por Castilho et al. (2012), que atribuiu a inconformidade no número de colônias a temperatura inadequada como a razão para ineficácia dos produtos, contribuindo para o baixo valor de unidades formadoras o que também foi observado no estudo de Silva, Ueno (2013) que avaliou quatro marcas de os iogurtes, comprovou que o baixo crescimento das UFC, sendo apontada a temperatura como causa sua da pequena proliferação de colônias.

No T2 ou seja após serem expostas a uma temperatura de 37°C por 60 minutos 90% das amostras apresentaram crescimento na sua população de micro-organismos com valores de  $9,9 \cdot 10^5$  a  $1,4 \cdot 10^8$  após a elevação da temperatura que segundo Lima et al., 2009 as bactérias lácticas são essencialmente

mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de crescer num intervalo de temperaturas de 5 a 45°C justificando seu crescimento na temperatura de 37°C e foi observado no T3 com valor mínimo de  $3,0 \cdot 10^5$  e máximo de  $7,2 \cdot 10^7$  provando que todas as amostras sofreram influência na sua contagem com passar do tempo em temperatura diferente da recomendada pelo fabricante

## CONCLUSÃO

No final do experimento apenas a amostra B se manteve com contagem inferior ao estabelecida pela legislação, as demais amostras de os leites fermentados e iogurtes analisados estão com sua concentração de células viáveis cumprindo o que preconiza a legislação brasileira através da Instrução Normativa 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com concentração de micro-organismos mínima de  $1 \times 10^6$  durante sua vida de prateleira, a pesquisa conclui que a manutenção da temperatura é de extrema importância para o total aproveitamento dos benefícios probióticos desses produtos.

## Referências Bibliográficas

ANTUNES, A. E. C. et al. **Desenvolvimento de buttermilk probiótico. Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**, 2017.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. **Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness**. Food Res. Int., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 outubro 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Resolução nº5, de 13 de novembro de 2000.** Publicada no Diário Oficial da União de 27 de novembro de 2000.

CARLI, E. M. **Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de *Salmonella spp* em frangos de corte.** 2006. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. **In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings.** American Journal of Clinical Nutrition, New York, v. 73, n. 2, p. 386-392, 2001.

FEREIRA, Célia Lucia de Lucas Fortes. **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção.** Rio de Janeiro-RJ. Editora: Rubio. 2012.

FOX, S. M. **Probiotics: intestinal inoculants for production animals.** Veterinary Medicine, Lenexa, v. 83, n. 8, p. 806-830, 1988.

HAENLEIN, G.F.W. **About evolution of goat and sheep milk production.** Small Rum. Res., v.68, p.3-6, 2007.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C. et al. **Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria.** Int. J. Food Microbiol., v.41, p.103-125, 1998.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; TZANETAKIS, N. **Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*.** International Dairy Journal, Barking, v. 13, n. 7, p. 517-528, 2003.

LERAYER, A. L. S.; MIGUEL, A. M. R. de O.; GUEDES, A. L. de A.; CARVALHO, A. F. de; ITAJDENWURCEL, J. R.; FONSECA, L. M. da; MOSQUIM, M. C. A.; NUTTI, M. R.; SIMÃO FILHO, P.; BRANDÃO, S. C. C.; PORFÍRIO, T. de A. **Nova legislação comentada de produtos lácteos : revisada e ampliada.** São Paulo: Revista Indústria de Alimentos, v. 1. 1997.

MADSEN, K. L. **The use of probiotics in a gastrointestinal disease.** Canadian Journal of Gastroenterology, Kingston, v. 15, n. 12, p. 817-822, 2001.

MATILLA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. **Technological challenges for future probiotic foods.** International Dairy Journal, Barking, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

NAIDU, A.S., CLEMENS, R.A. **Probiotics.** In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems.** Boca Raton: CRC, p.431-462. 2000  
PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. **Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus GG* and antibodies.** Microbiology, Edinburgh, v. 7, n. 86, p. 1-9, 2007.

ROBISON, R.K., TAMINE, A.Y. **Types of fermented milks.** In: Tamine, AY. **Fermented milks.** Oxford: Blackwell Science, p. 3-10, 2006.

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

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação textura e viabilidade em leite fermentado.** São Paulo, 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANDERS, M. E. How do we know when something **calles “probiotic is really a probiotic? A guideline for consumers and Health care Professionals.** *Funct. Food Rev.*, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2009.

SANDERS, M.E. **Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria.** *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

SANDINE, W.E., MURALIDHARA, K.S., ELLIKER, P.R., ENGLAND, D.C. **Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and *lactobacilli*.** *J. Milk Food Technol.*, Orange, v.35, n.12, p.691-702, 1972.hosono

SHAH, N. P. **Functional cultures and health benefits.** *Int. Dairy J.*, v.17, p.1262-1277, 2007.

SILVA, A. B. N.; UENO, M. **Evaluation of lactic acid bacteria viability and titratable acidity variation in fruit flavor yogurt.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 390, p. 20-25, 2013.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. **Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com fat replacers.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 1, p.24-31, 2002.

SREEKUMAR, O., HOSONO, A. **Immediate effect of on the intestinal flora and fecal enzymes of rats and the in vitro inhibition of *Escherichia coli* in coculture.** *J. Dairy Sci., Technol.*, Amsterdam, v.13, p.3-11,2002.

YILDIZ, F. **Overview of Yogurt and other fermented dairy products.** In: **Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products.** USA: Ed. CRC Press - Taylor & Francis Group, 454p., 2010.

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