

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FERMENTATIVA EM *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, NA PRODUÇÃO DE IOGURTES

AVALIATION OF THE FERMENTATIVE ACTIVITY IN *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, IN PRODUCTION OF YOGURT

¹SOUZA, I.F.; ²FRANCISCO, O.

^{1 e 2} Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Biológicas/FIO

RESUMO

Entende-se por fermentação os processos anaeróbios que tem por função transformar uma substância em outra, produzido a partir de microrganismos, tais como bactérias e fungos, também denominado de culturas lácticas” ou fermentos. Estes microrganismos quando utilizados na fabricação de produtos alimentícios de consumo humano, acabam por ser benéficos à saúde. Neste trabalho foi avaliada a ativação fermentativa de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, utilizados na fabricação de iogurte. Estes microrganismos atacam a lactose (açúcar do leite) que acaba por liberar um ácido, o qual juntamente com a caseína produz a coagulação. Esse processo deve-se a ação conjunta entre eles, quando encontrados em um meio específico, ou seja, quando utilizados em leite pasteurizado que apresente características físico-químicas e microbiológicas adequadas. Verificou-se que quando as culturas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* são ativadas antes do processo inicial, acabam-se por reduzir o tempo da fabricação do iogurte, sem que hajam alterações físicas e químicas que prejudiquem o produto final, portanto podendo gerar mais lucros.

Palavras-chave: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Fermentação Láctica.

ABSTRACT

The fermentation is an anaerobic processes that transform a substance in other, produced in microorganisms cultures, such as bacteria and mushrooms, also called lactic culture or ferments. These microorganisms when used in the production of nutritious products of human consumption, it is beneficial to the health. In this work, it was evaluated the activation of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* to fermentation process, used in the yogurt production. These microorganisms attack the lactose (sugar of the milk), that making an acid, which together with the casein, it produces the coagulation in milk. This process is due to action among the two components of milk culture, when used in pasteurized milk, that presents characteristics physical-chemistries and appropriate microbiologic. It was verified that when the cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* are activated, before to the initial process, they finish for reducing the time of the production of the yogurt, without physical and chemical alterations that harm the final product, therefore could generate more profits.

Keywords: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Lactic Fermentation.

INTRODUÇÃO

De acordo com Tortora *et al.* (2005), durante a glicólise, ocorre a primeira fase da fermentação do ácido láctico. Assim, uma molécula de glicose é oxidada em duas moléculas de ácido pirúvico. Essa oxidação gera energia que é utilizada para

formar as duas moléculas de ATP, sendo que, em seguida as duas moléculas de ácido pirúvico são reduzidas por duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de ácido láctico, portanto, essa fermentação rende somente uma pequena quantidade de energia. Dois importantes gêneros de bactérias do ácido láctico são *Streptococcus* e *Lactobacillos*. Uma vez que esse microrganismo produz somente ácido láctico, eles são referidos como homoláticos. A fermentação do ácido láctico pode resultar na deterioração de alimentos, contudo, o processo pode também produzir iogurte a partir do leite. A fermentação é um processo de obtenção de energia utilizado por algumas bactérias e outros organismos. Ele ocorre com a quebra da glicose em piruvato, que depois é transformado em algum outro produto, como o álcool etílico e lactato, definindo fermentação alcoólica e láctica. Respectivamente o fermento faz aumentar o volume da massa porque reage com o aumento de temperatura, liberando CO₂ (SILVA *et al.*,1997).

Segundo Silva *et al.* (1997), no grupo das bactérias lácticas incluem-se vários gêneros de bactérias acidúricas, as quais são produtoras de ácidos lácticos, gram-positivas, catalase negativa e microaerófilas, sendo estas apresentadas nos seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconoctoc*, *Pediococcus*, *Estreptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Estes são microrganismos importantes encontrados na produção de alimentos lácteos como: (iogurtes, leite fermentados, queijos e outros), em determinado momento estes microrganismos podem ocasionar perdas de certos tipos de alimentos, pois tem a capacidades de realizar o processo de acidificação, ou seja, contribuem com os aumentos dos íons H⁺, ocasionando uma deteriorização desses alimentos.

Segundo a Instrução Normativa Nº 16, DE 23 DE AGOSTO DE 2005 (MAPA), os produtos lácteos deverão conter uma concentração de bactérias lácticas estáveis e viáveis durante toda a data de validade, a empresa fabricante deverá comprovar a presença desses padrões através de laudos de análises realizados em laboratórios oficializados pela ANVISA.

Produtos como bebidas lácteas fermentadas e leites fermentados devem conter uma quantidade igual ou superior a 10⁶ UFC/g de bactérias lácticas viáveis, já os iogurtes e queijos *petit suisse* esse contagem passa a 10⁷ UFC/g (<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id =7086 - 12/06/2008 -12:37 h>).

De acordo com Laranja (2007), no Brasil a produção de leite vem crescendo de forma acelerada, desde 1910 até 2005 houve um aumento de 70% , sendo que esse crescimento tem atingindo uma porcentagem média de 3,5 % ao ano.

Sendo um alimento de importância significativa na formação corpórea, o leite é um dos alimentos mais importantes e completos presentes na vida do ser humano e considerado um dos alimentos mais nutritivos existente atualmente, sendo rico em muitas vitaminas e proteínas e possuindo 10 aminoácidos essenciais, assim como ácidos graxos, imunoglobulinas e outros micronutrientes (PEREIRA *et al.*, 2001).

A qualidade dos produtos lácteos está relacionado com a higienização do leite ordenhado (SÁ, 2004). No momento da produção é que podem ocorrer os maiores focos de contaminação, caso a sala de ordenhação e utensílios utilizados não estejam corretamente higienizados (SANTOS, 2008).

Conforme Aparecida *et al.* (2001), os microrganismos são seres microscópicos e podem ser encontrados em todos os ambientes, água, ar, plantas, animais e solos. O leite é pode ser considerado um meio de cultura propício para desenvolvimento de certos microrganismos contaminantes como, vírus, leveduras, mofo e coliforme fecal, pois apresenta em sua composição uma porcentagem alta de água e nutrientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas de *Streptococcus thermophilus* Sherman 1937 (*Lactobacillales: Streptococcaceae*) e *Lactobacillus bulgaricus* Llia Metchnikoff 1910 (*Lactobacillales Lactobacillaceae*), foram cultivadas em 1000 ml de leite pasteurizado, 3 amostras e um grupo controle. Para tanto, utilizou-se bequer com capacidade para 1000 ml, pHmetro digital (DM 20), pipeta volumétrica 10 ml, estufa de cultura (modelo 002 CB), Solução Dornic, fenoltaleína à 1% e leite *in natura* pasteurizado. Para esse experimento foram pasteurizados 5000 ml de leite *in natura*, sendo posteriormente transportados para 5 béqueres com capacidade de 1000 ml cada, um grama da cultura láctica, a qual permanecia em freezer com temperatura de -18°C. Foi passada em um dessa amostra, recebendo o nome “solução mãe”. Essa por sua vez, teve a função de realizar a ativação das culturas. Outras 3 amostras foram usadas como testes, recebendo 10 ml da “solução mãe”, sendo que o teste 01 recebeu após 30

minutos, teste 02 após 01:00 hora e teste 03 após 01:30 horas, já a amostra controle permaneceu somente com o leite pasteurizado para certificar-se de que a pasteurização teria sido eficaz, a cada 01:00 hora foram tomadas as medidas do pH, acidez dornic e Quantidade de ácido láctico produzido. A análise estatística foi realizada no Programa Estatístico Minitab for Windows (Release 11.13).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se, de acordo com os resultados obtidos que, as bactérias utilizadas nos ensaios, quando são ativadas antes de serem utilizadas na fermentação do leite, acabam por ser mais ativas, quanto à fermentação, fato que determina uma acidificação mais rápida do leite, produzindo maior quantidade de ácido láctico, reduzindo o pH em menor tempo. Os resultados mostraram que o tempo de fermentação diminui, quanto maior for o tempo em que as bactérias já se encontram em atividade fermentativa (atividade fermentativa inversamente proporcional ao tempo em que a bactéria encontra-se em atividade). Todos os 03 testes atingiram o pH desejado para a produção de iogurte de 4,50, obtendo-se os seguintes resultados: Ensaio 01 (Solução mãe); Ensaio 02 - 320 min.; Ensaio 03 - 300 minutos e Ensaio 04 em apenas 250 minutos. Tais resultados mostraram que em culturas com maior tempo de ativação fermentativa, foi menor o tempo de fermentação, enquanto que o teste controle permaneceu com o mesmo pH do início ao fim dos testes.

O ensaio realizado para obtenção da “solução-mãe” do fermento, obtido da associação de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, atingiu o ponto de fermentação ideal, com pH de 4,5 após 120 minutos de incubação, conforme pode ser verificada na Tabela 1 e comparada na Figura 1.

Tabela 1 – Obtenção da “solução mãe” a partir de 1000 ml de leite pasteurizado, com 1 grama de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* associados, incubados em faixa de 36°C.

Tempo de fermentação (em minutos)	Variação de pH	Variação de acidez Dornic em (°C)	Variação da % Ácido lácticos / litro	Temperaturas da Fermentação em (°C)
(Início)	6,60	12,5	1,25	36,0
60	6,90	26,0	2,60	36,0
180	5,06	37,0	3,70	36,2
240	4,78	48,0	4,80	36,1
Término: 120	4,50	55,0	5,50	36,0

Posteriormente foi passado 10 ml da solução mãe para 1 litro de leite, sendo obtido resultados conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Variação de pH obtida na Fermentação de 1 litro de leite, incubada com 10 ml da “solução-mãe”, após 30 minutos de ativação, obtendo a solução 01.

Tempo de fermentação (em minutos)	Variação de pH	Variação de acidez Dornic em (°C)	Variação da % Ácido lácticos / litro	Temperaturas da Fermentação em (°C)
(Início)	6,60	14,0	1,40	36,0
60	6,53	16,0	1,60	36,0
120	6,40	19,5	1,95	36,2
180	6,01	32,0	3,20	36,1
240	4,92	42,0	4,20	36,0
320	4,55	46,0	4,60	36,0
Término: 320	4,50	50,0	5,00	36,0

Quando foi passado 10 ml da “solução mãe”, obteve-se a Solução 02, onde foram observados os valores apresentados conforme Tabela 3, sendo que aos 300 minutos de ativação do fermento, foi obtido o pH de 4,5.

Tabela 3 – Variação de pH obtida na Fermentação de 1 litro de leite, incubada com 10 ml da “solução mãe”, após 60 minutos de ativação, obtendo-se a solução 02.

Tempo de fermentação (em minutos)	Variação de pH	Variação de acidez Dornic em (°C)	Variação da % Ácido lácticos / litro	Temperaturas da Fermentação em (°C)
(Início)	6,60	14,5	1,45	36,0
60	6,50	17,0	1,70	36,0
120	6,27	21,5	2,15	36,2
180	5,25	39,0	3,90	36,1
240	4,75	55,0	5,50	36,0
330	4,50	59,0	5,90	36,0
Término: 300	4,50	59,0	5,90	36,0

Após 90 minutos de incubação, obteve-se os resultados conforme podem ser verificados na Tabela 4, onde observou-se que a emulsão do leite + fermento, atingiu pH ideal para produção de iogurte (pH igual a 4,5), após 250 minutos de ativação, solução 03.

Tabela 4 - Variação de pH obtida na Fermentação de 1 litro de leite, incubada com 10 ml da “solução mãe”, após 90 minutos de ativação, obtendo-se a solução 03.

Tempo de fermentação (em minutos)	Variação de pH	Variação de acidez Dornic em (°C)	Variação da % Ácido lácticos / litro	Temperaturas da Fermentação em (°C)
(Início)	6,60	15,5	1,55	36,0
60	6,48	16,5	1,65	36,0

120	6,37	22,0	2,20	36,2
180	5,33	40,0	4,00	36,1
240	4,54	50,0	5,00	36,0
270	4,50	58,0	5,80	36,0
Término: 250	4,50	58,0	5,80	36,0

Foi também retirado o grupo controle do leite pesquisado no presente trabalho, onde foi verificado que a emulsão encontrava-se estéril, pois não alterou o pH, indicando a ausência de microorganismos fermentadores, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Ensaio para grupo controle (sem adição do fermento), em amostra retirada do leite pasteurizado utilizado nos experimentos.

Tempo de fermentação (em minutos)	Variação de pH	Variação de acidez Dornic em (°C)	Variação da % Ácido lácticos / litro	Temperaturas da Fermentação em (°C)
(Início)	6,60	15,0	1,50	36,0
60	6,60	15,0	1,50	36,0
120	6,62	15,0	1,50	36,2
180	6,61	15,0	1,50	36,1
240	6,60	15,0	1,50	36,0
270	6,60	15,0	1,50	36,0
Término: 340	6,60	15,0	1,50	36,0

O experimento conduzido em emulsão de leite, o qual recebeu 10 ml de solução mãe (leite associado ao fermento *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, mostrou resultados diretamente proporcionais de pH em relação ao tempo, pois quando analisados em Regressão Polinomial de 3 fatores, verificou-se um valores estatisticamente significativos para o devido teste (com $F=87,63$; $P<0,02$; $r^2 = 0,99$), conforme pode ser verificado na Figura 1.

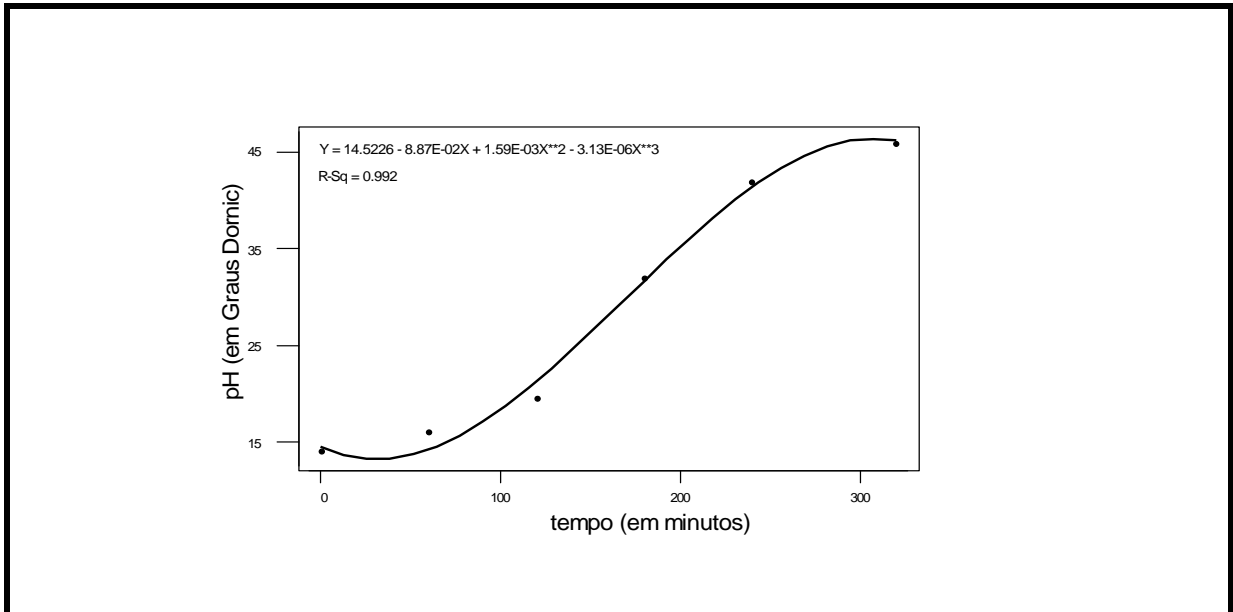


Figura 1 – Verificação da alteração de pH (em Graus Dornic - °D), conforme tempo de fermentação do leite, a partir de 10 ml da “solução mãe” de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, incubados em 36 °C (± 1 °C)

Valores semelhantes também foram obtidos no segundo experimento, onde a solução recebeu 10 ml da solução mãe, após 30 minutos de ativação do fermento, sendo verificado o valor do teste de regressão com valor altamente significativo ($F = 67.99$; $P < 0,02$; $r^2 = 0,99$), conforme verifica-se na Figura 2.

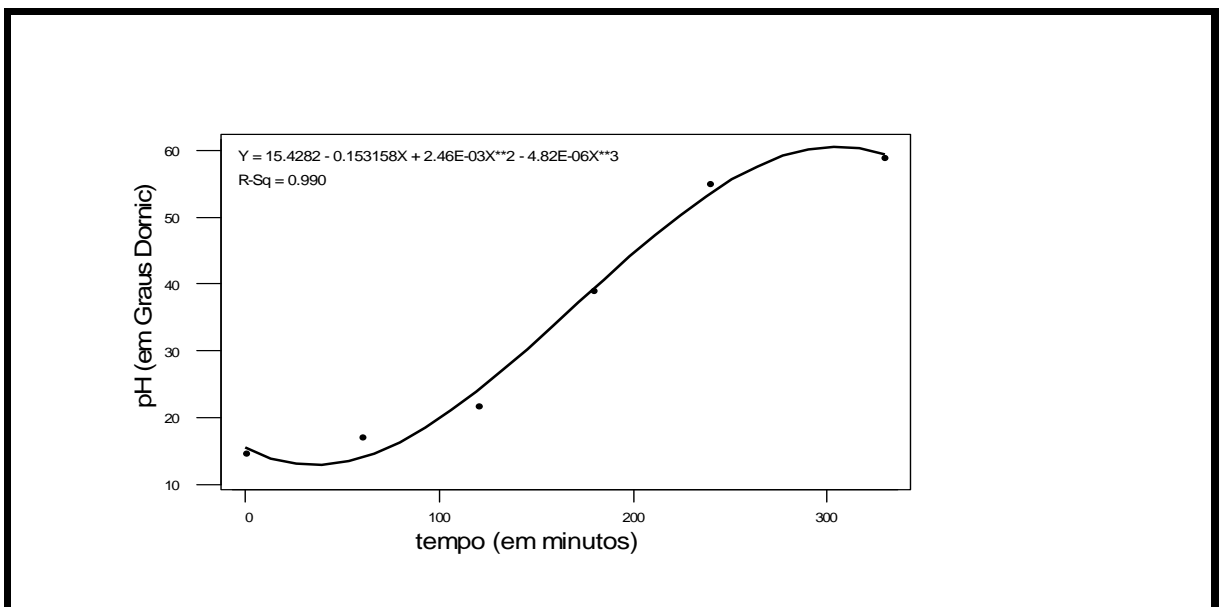


Figura 2 – Verificação da alteração de pH (em Graus Dornic - °D), conforme tempo de fermentação do leite, a partir de 10 ml da “solução mãe” de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, incubados em 36 °C (± 1 °C).

O terceiro ensaio também mostrou valores semelhantes para análise de Regressão, a qual recebeu 10 ml da solução mãe, após 60 minutos de ativação do fermento, podendo ser verificado que o valor do teste de regressão apresentou valor

altamente significativo ($F = 76;67$ $P < 0,02$; $r^2 = 0,99$), conforme pode ser verificado na Figura 3.

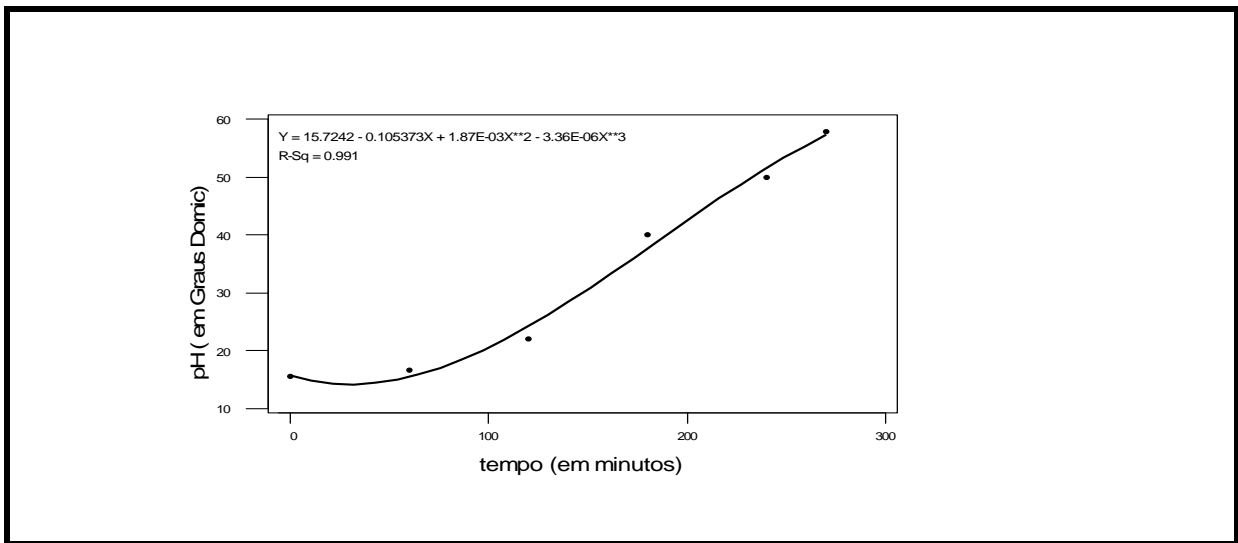


Figura 3 – Verificação da alteração de pH (em Graus Dornic - °D), em regressão polinomial, conforme tempo de fermentação do leite, a partir de 10 ml da “solução mãe” de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, incubados em 36 °C (± 1 °C)

Resultado muito interessante, foi verificado quando os dados obtidos nos três experimentos foram analisados em Regressão Linear, indicando alta correlação negativa (Correlação de Pearson = -0,996), indicando que o valor para o tempo de fermentação torna-se menor, conforme aumenta-se o tempo de ativação das bactérias fermentadoras (valores inversamente proporcionais). O valor observado para a Regressão Linear mostrou valores estatisticamente significativos para a análise de Regressão Linear ($F = 120,33$; $P < 0,05$), conforme pode ser observado na Figura 4.

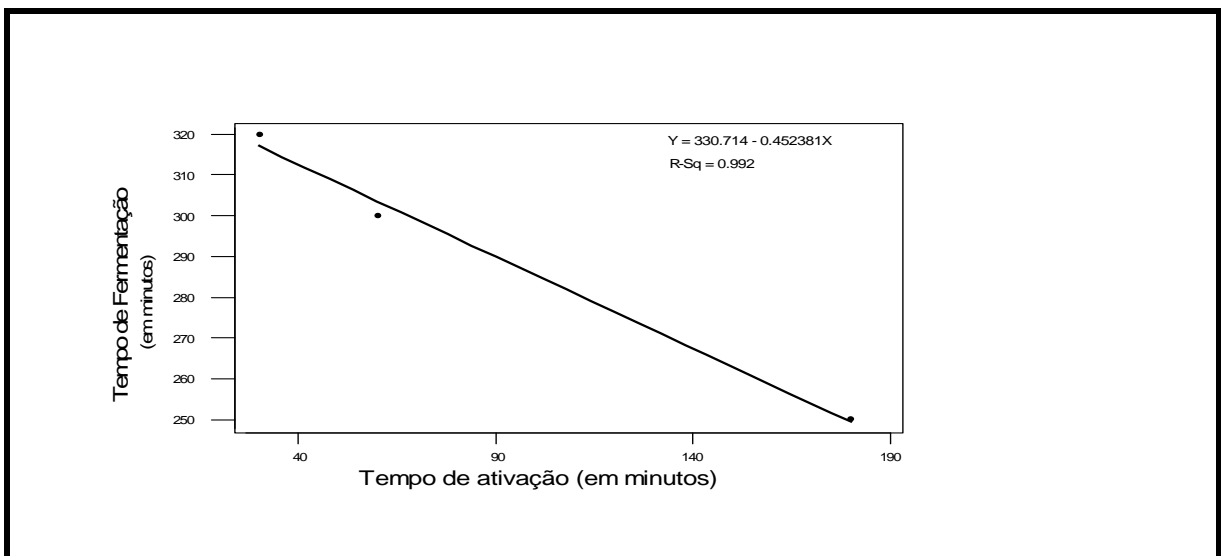


Figura 4 – Verificação da alteração de pH (em Graus Dornic - °D), em regressão polinomial, conforme tempo de fermentação do leite, com ausência de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, incubados em 36 °C (± 1 °C)

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, conforme ensaios realizados mostraram que o tempo de fermentação diminuiu gradativamente, tendo um desenvolvimento mais rápido nas culturas, reduzindo o pH em menor tempo, se utilizadas bactérias lácticas já ativadas previamente. No entanto, foi observado também, durante os três ensaios, que os padrões físicos e químicos mostraram variações de acidez *Dornic* e % de ácido láctico do produto final insignificante, consistindo este, um importante fator a ser considerado na produção de iogurtes, pois verifica-se que tal fator é responsável por manter a qualidade do sabor, aroma, textura e viscosidade ao término da fabricação dos iogurtes, lembrando que durante o processo da fermentação a produção também necessita de um menor tempo de exposição a determinados tipos de contaminações microbiológicas, considerando que possam estar presentes no ambiente. Assim o produto poderá ser disponibilizado no mercado com maior tempo na prateleira, atendendo assim, uma maior demanda no mercado, gerando maior lucratividade, sem que o produto perda as suas qualidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LARANJA, F, L. Geografia do leite. **Balde branco**. Nº. 515.82p; 15-24. 2007
- PAIVA, M, A, V.: BRITO J, R, F. A contaminação microbiana do leite afeta sobremaneira a sua qualidade. **Balde branco**. 98:66-68.2001
- PEREIRA, D.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA-JUNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA,L.L. **Físico-químico do leite e derivados**. 2ªed. Editora: Varela. Juiz de Fora, MG. 233p. 2001
- SÁ, E. Análises realizadas para o controle da qualidade de leite *in natura* de acordo com os parâmetros legais. **Leite e Derivado**. Nº. 81. 82p. 2004
- SANTOS, j. Focos de contaminação, um perigo constante. **Balde Branco** Nº. 542. 98p. 2008
- SILVA. N.; JUNQUEIRA, V.C.A. SILVEIRA. N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos**. Ed. Varela. São Paulo, SP 295p. 1997.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE,C.L. **Microbiologia**. ArtMed, 2005.894p.
- Sites consultados:
www.engetecno.com.br/legislacao/leiteleblacteos.htm - acesso em 27/05/2008 10:00 h.
www.agricultura.gov.br acesso em 12/06/2008 –12:37 h.