

RODNEY VEGA VIZCARRA

**BIOFERMENTAÇÃO LÁCTICA DE EXTRATO AQUOSO  
DE SOJA E SORO DE LEITE POR *Lactobacillus casei*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL

CURITIBA  
1995

**BIOFERMENTAÇÃO LÁCTICA DE EXTRATO AQUOSO DE SOJA E SORO DE  
LEITE POR *Lactobacillus casei*.**

por

**RODNEY VEGA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL.  
Setor de Tecnologia Química, UFPR

Prof. Dr. José Luis Parada.  
Universidad de Buenos aires-Argentina.

Prof. Dr. Gerard Chuzel.  
Universidade Estadual de São Paulo-UNESP.

Curitiba, 11 de Abril de 1995.

A Alcides y Betsabé por toda  
una vida de amor, cariño,  
esperanza y ejemplo de lucha  
por un futuro mejor.

A Yanet y Ayesha por todo el  
amor, la esperanza y la  
paciencia

A Guido, Eloisa,  
Obdulia, Ada, Violeta,  
Matilde, Rolando y  
Alberto, por el cariño,  
apoyo e incentivo  
constantes.

A Adita, Enrique y  
Moshi Lynda por el  
incentivo constante y el  
apoyo inapreciable e  
incondicional.

*In memoriam*

A América: Te fuiste a  
vivir a una estrella, pero  
también vives en nuestro  
corazón.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho de Aperfeiçoamento da Pesquisa e Ensino Superior-CAPES, pela bolsa de estudos outorgada.

A Cooperativa de Laticínios Curitiba Ltda.-CLAC, pelo soro de leite.

Ao laboratório de microfotografia da Genética do setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Ao centro de fotografia eletrónica da UFPR, pelo auxilio nas micro fotografias.

Aos meus amigos e colegas , Chris, Cinthya, Estela, Eunice, Luis, Marcia, Maria Cristina, Maria de Lourdes, Mônica, Neoli, Rita, Sônia, Tania, pelo companheirismo e auxilio constante.

A Dorothy, pelas ampliações referentes as analises bioquímicas e pela colaboração na correção ortográfica.

A Maria de Lourdes e Mônica pela ajuda na correção ortográfica.

Ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos-CEPPA, pelas analises microbiologicas;

Ao Dr. Fontana e Dra. Barón do laboratório de Química de Carboidratos do setor de Biologia da UFPR, pela ajuda nos analises de Cromatografia TLC.

A Maria Cristina, pela sua ajuda nas analises microbiologicas.

A professora Maylu-Lu-Pen, pelo incentivo e criticas construtivas.

Ao professor Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL, orientador desta tese, pela acertada orientação, criticas construtivas, valorização do meu trabalho e incentivos constantes na minha superação científica.

A todos vocês, que de alguma forma colaboraram para a culminação deste trabalho, muito obrigado.

## SUMARIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS .....</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	ix
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS .....</b>	xi
<b>RESUMO .....</b>	xii
<b>ABSTRACT .....</b>	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	3
2.1. O leite na alimentação humana .....	3
2.2. O leite .....	3
2.2.1. Composição química do leite .....	4
2.2.2. Produtos lácteos .....	5
2.2.3. Produção láctea .....	6
2.3. O soro de leite .....	8
2.3.1. Composição química do soro de leite .....	8
2.3.2. Produção e custos do soro de leite .....	9
2.3.3. Utilização do soro de leite .....	10
2.4. A soja .....	12
2.4.1. Composição química da soja .....	13
2.4.2. Utilidades da soja .....	14
2.4.3. Fatores antinutricionais da soja .....	14
2.4.4. Extrato aquoso de soja .....	17
2.4.5. Principais usos do extrato aquoso de soja .....	20
2.5. Fermentação .....	22

2.5.1.	Vias de fermentação .....	23
2.5.2.	Microrganismos e as fermentações .....	27
2.5.3.	Tipos de fermentações .....	28
2.5.4.	Fermentação láctica .....	30
2.5.4.1.	Bactérias lácticas .....	31
2.5.4.2.	<i>Lactobacillus casei</i> .....	32
2.5.5.	Produção de ácido láctico .....	36
2.5.6.	Produtos da fermentação láctica do leite .....	39
2.5.7.	Produtos que utilizam leite de vaca, extrato aquoso de soja e soro de leite para fermentação .....	42
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.</b> .....	45
3.1.	Materiais .....	45
3.1.1.	Equipamentos .....	45
3.1.2.	Reagentes .....	45
3.1.3.	Matérias primas .....	46
3.2.	Métodos .....	47
3.2.1.	Preparo do inóculo .....	47
3.2.2.	Preparo do meio de fermentação .....	48
3.2.3.	Fotografia de transmissão de luz .....	49
3.2.4.	Produção do extrato aquoso de soja .....	49
3.2.5.	Obtenção de soro de leite desproteinizado .....	49
3.2.6.	Obtenção da bebida láctea fermentada .....	50
3.2.7.	Contagem padrão em placas .....	51
3.2.8.	Determinação da densidade ótica .....	51
3.2.9.	Controle do pH .....	52
3.2.10.	Determinação de açúcares totais .....	53

3.2.11. Determinação de ácido láctico .....	53
3.2.12. Determinação de Proteínas .....	53
3.2.13. Aromatização e coloração .....	54
3.2.14. Controle microbiológico .....	54
3.2.15. Análise sensorial .....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.</b> .....	<b>56</b>
4.1. Preparo de inóculo .....	56
4.2. Obtenção da bebida láctea fermentada .....	59
4.2.1. Composição físico-química dos diferentes componentes utilizados na elaboração da bebida láctea fermentada .....	59
4.2.2. Fermentação em shaker .....	61
4.2.3. Fermentação em biorreator .....	69
4.3. Determinações fisico-químicas da bebida láctea fermentada.....	73
4.3.1. Umidade .....	73
4.3.2. Cinzas .....	73
4.3.3. Extrato seco .....	74
4.3.4. Açúcares totais .....	74
4.3.5. Produção de ácido láctico .....	75
4.3.6. Proteínas .....	76
4.3.7. Lipídios .....	78
4.3.8. Cromatografia de camada delgada .....	80
4.3.9. Análise microbiológica .....	83
4.3.10. Avaliação sensorial .....	84
4.3.11. Tempo de prateleira .....	86
<b>5. CONCLUSÃO.</b> .....	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXOS.</b> .....	<b>95</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

<b>AOAC</b>	Association of Official Agricultural Chemists.
<b>ADP</b>	Di fosfato de adenosina.
<b>ATP</b>	Tri fosfato de adenosina.
<b>Cal.</b>	Calorias.
<b>°D</b>	Graus Dornic.
<b>EMATER</b>	Empresa Paranaense de Assistencia Técnica e Extensão Rural.
<b>et al.</b>	E outros.
<b>FAO</b>	Food and Agricultural Organization.
<b>h</b>	Hora.
<b>kg</b>	Kilograma.
<b>kt</b>	Kilotoneladas.
<b>μ</b>	Micron
<b>nm</b>	Nanómetro.
<b>N</b>	Normalidade.
<b>NAD ou NAD+</b>	Forma oxidada do nucleotideo de nicotinamida-adenina.
<b>NADH<sub>2</sub></b>	Forma reduzida do nucleotideo de nicotinamida-adenina.
<b>NADP</b>	Forma oxidada de nucleotideo de nicotinamida-adenina-fosfato.
<b>FAD</b>	Forma oxidada do nucleotideo de flavina-adenina.
<b>P</b>	Radical ortofosfato.
<b>Pi</b>	Ortofosfato.
<b>PPi</b>	Pirofosfato.
<b>~</b>	Radical rico em energia.
<b>Acetyl~S.CoA</b>	Acetyl coenzima A ou acetato ativo.

## LISTA DE FIGURAS

1.	Fluxograma de produção do leite vital.....	21
2.	Etapas da glicólise.....	26
3.	Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas.....	27
4.	Bactérias homofermentadoras e heterofermentadoras.....	35
5.	Vias de metabolismo do acetaldeido.....	37
6.	Diagrama de produção do leite de soja.....	50
7.	Diagrama de produção da bebida láctica biofermentada.....	52
8.	Curva de crescimento e variação do pH de <i>Lactobacillus casei</i> em caldo MRS.....	57
9.	Variação da D.O. da cultura de <i>Lactobacillus casei</i> em caldo MRS.....	58
10.	Microfotografia de transmissão de luz, de colónias de <i>Lactobacillus casei</i> em meio de cultura MRS.....	59
11.	Microfotografia de transmissão de luz, de colónias de <i>Lactobacillus casei</i> em meio de fermentação.....	59
12.	Evolução da D.O. durante a fermentação para as diferentes formulações.....	63
13.	Evolução do log(cel/ml) do crescimento bacilar para as diferentes formulações fermentadas.....	63
14.	Evolução do pH das diferentes formulações.....	65
15.	Evolução comparativa dos valores de D.O. e pH das formulações B e C.....	66
16.	Evolução dos diferentes parâmetros da fermentação em "shaker" para a formulação C.....	68
17.	Evolução dos valores de pH nas diferentes rotações a 37,5 °C, na biofermentação da mistura láctea, em bioreator Marubishi de 8,0 l.....	70

18. Evolução da D.O. da fermentação em bioreator Marubishi de 8,0 l à temperatura de 37,5°C e agitação de 125 rpm .....	71
19. Evolução de pH e população bacteriana na fermentação em bioreator a 37,5°C e 125 rpm. ....	72
20. Variação dos açucares totais e ácido láctico durante a fermentação no bioreator. ....	76
21. Variação das proteínas durante a fermentação no bioreator. ....	77
22. Biofermentação do composto lácteo (leite desnatado, doro de leite desproteinizado e leite de soja) por <i>Lactobacillus casei</i> LPB-93 em bioreator Marubishi. ....	78
23. Vista ampliada da agitação e formação de espuma durante a fermentação da bebida láctea no fermentador. ....	79
24. Desenvolvimento da cromatografia TLC das amostras da bebida láctea durante a fermentação. ....	81
25. Cromatografia TLC da fermentação da bebida láctea durante a fermentação. ....	82

## **LISTA DE QUADROS**

1.	Principais componentes do leite de vaca .....	5
2.	Principais usos do soro de leite .....	11
3.	Composição química dos grãos maduros de soja .....	14
4.	Principais utilidades da soja .....	15
5.	Composição química comparativa do leite de soja .....	19

## **LISTA DE TABELAS**

1.	Produção e disponibilidade do leite de vaca no Paraná e no Brasil .....	7
2.	Composição química do soro de leite .....	9
3.	Produção de soja no Paraná e no Brasil .....	13
4.	Composição química do leite de soja .....	20
5.	Principais constituintes dos componentes da mistura a fermentar .....	48
6.	Determinações fisico-químicas dos diferentes componentes utilizados na produção da bebida láctea fermentada .....	60
7.	Formulações com leite desnatado, extrato aquoso de soja e soro de leite desproteinizado .....	62
8.	Composição centesimal do substrato e da bebida láctea fermentada .....	73
9.	Resultados da análise microbiológica da bebida láctea fermentada aos 2 e 20 dias de armazenamento .....	83
10.	Análise de variância .....	84

## **RESUMO**

Uma bebida láctica fermentada foi desenvolvida com leite de vaca desnatado, soro de leite desproteinizado e extrato aquoso de soja ou "leite de soja", por fermentação líquida, utilizando uma cepa de *Lactobacillus casei*. Durante a fermentação foram feitas determinações de pH, densidade ótica (crescimento celular), produção de ácido láctico, consumo de carboidratos e conteúdo protéico. A primeira etapa da fermentação foi realizada em incubador "shaker", e a etapa definitiva, em um biofermentador de 8 l de capacidade. Os estudos mostram que existe alto nível de utilização de carboidratos, sendo que a lactose foi a mais consumida. A bebida láctica fermentada, com as melhores características organolépticas, foi obtida após 16 horas a 37,5 °C e 125 rpm em biofermentador. Os dados das análises microbiológicas indicam, que a bebida apresenta excelentes condições sanitárias. Os testes sensoriais realizados por provadores, também apresentaram resultados considerados muito satisfatórios.

**Palavras chave:** Fermentação ácido láctica, *Lactobacillus casei*, bebida láctica fermentada.

## **ABSTRACT**

A fermented lactic acid beverage was produced using skim milk, disproteinized milk whey and soy milk by liquid state fermentation using a strain of *Lactobacillus casei*. During fermentation process, pH, Optical Density, Lactic Acid production, Carbohydrates utilization and Protein content were determined. Preliminar lactic acid beverage productions were carried out in Shaker, and the principal and optimized production was processed in a biofermentor of 8 liters capacity. The studies show that exist a good level of Carbohydrates utilization and Lactose the most consumed. The fermented lactic acid beverage with the best organoleptic characteristics was obtained after 16 hours of fermentation at 37,5°C and 125 rpm in the fermentor. Microbiologic analysis show that this beverage has exelent sanitary conditions. Otherwise, sensory tests present very satisfactory results.

**Key words :** Lactic acid fermentation, *Lactobacillus casei*, Lactic acid fermented beverage.

## **1. INTRODUÇÃO.**

O leite é um dos produtos naturais mais importantes na alimentação humana, assim como para os filhotes da maioria dos mamíferos, mas apesar disto, é um produto que deteriora-se facilmente em poucas horas se não for bem acondicionado ou processado.

Uma das formas de preservação é a fermentação visando a produção de bebidas lácteas fermentadas, propiciando a conservação do leite até por várias semanas. A fermentação é uma tecnologia tradicional de conservação e transformação de produtos alimentícios conduzida por bactérias, leveduras ou fungos. A fermentação é utilizada em numerosas áreas, principalmente na conservação do leite e produtos lácticos como queijos, iogurte, leites fermentados, etc. Além disso é utilizada na área de embutidos e conservas vegetais. A fermentação pode ser espontânea ou controlada através de fermentos selecionados.

A origem da fermentação láctea, especialmente dos leites fermentados, relaciona-se ao iogurte que é o leite fermentado mais difundido no mundo, seguido por outros como o leite acidófilo, kefir, koumiss, yakult e outros de menor importância. Estes produtos são o resultado da atividade fermentativa de microrganismos como o *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus casei* entre outros, sobre o substrato que pode ser o leite integral, desnatado ou modificado, para obter produtos específicos.

O problema desses produtos é o alto custo para o consumidor, devido também ao elevado custo do leite de vaca e aos processos utilizados que os tornam inacessíveis à maioria da população. Por outro lado, a produção de leite de vaca tem crescido muito pouco nos últimos anos, sendo necessárias importações habituais em forma de leite em pó.

Assim mesmo, o extrato aquoso de soja que é um produto muito útil especialmente na alimentação infantil e também para pessoas que não podem utilizar o leite de vaca como

alimento por não tolerar bem a lactose, que lhes causa alterações digestivas, custa três vezes menos que o leite de vaca não pasteurizado. Temos também o problema do soro de leite, que despejado nos rios é um forte poluente sendo que para fins de reaproveitamento como matéria prima tem custo praticamente zero.

O objetivo do presente trabalho é a produção de uma bebida láctica fermentada com substituição parcial do leite de vaca por extrato aquoso de soja e soro de leite, utilizando lactobacilos e a obtenção posterior de um produto "probiótico", que também teria a função de regulador digestivo porque acredita-se que a ingestão de lactobacilos ajuda na correção de distúrbios estomacais e na regeneração da flora intestinal.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1. O leite na alimentação.

O uso do leite na alimentação dos mamíferos é muito importante no processo de sobrevivência. O uso do leite pela espécie humana, segundo ALAIS (1984), iniciou-se nos primeiras etapas da civilização humana em que lograram domesticar os animais produtores de leite, os que, por serem herbívoros e mais dóceis, favoreceram a sua criação.

O consumo de leite varia com o clima e a latitude, sendo que os países de clima temperado, produzem mais leite do que os outros, sendo também os maiores consumidores; mas em alguns lugares o leite não é consumido por motivos religiosos ou métodos deficientes de criação, dificultando a luta contra a fome e a desnutrição, segundo ALAIS (1984).

O leite de vaca é um alimento de grande valor nutritivo para o homem, oferecendo mais substâncias alimentícias que qualquer outro alimento natural, e sendo um dos mais econômicos cuja importância reside principalmente nas proteínas, cálcio e vitaminas A, B1 e B2, é considerado um alimento protetor ou de segurança, pelo qual organismos como o Instituto Científico de Higiene da Alimentação Francesa, recomenda a ingestão de 0,5 l de leite por crianças, adolescentes e velhos e 0,25 l pelos adultos como consumo diário, ALAIS (1984).

### 2.2. O leite.

Segundo ALAIS (1984), o leite é um líquido branco opaco, de sabor doce, composição complexa, reação iônica (pH) perto da neutralidade, segregado pelas glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos após o nascimento dos filhotes.

A função natural do leite é ser um alimento exclusivo dos mamíferos jovens nas primeiras etapas da vida , quando o desenvolvimento é rápido e não pode ser substituído por outros alimentos.

Fisicamente, indica ALAIS (1984), o leite é uma emulsão de glóbulos de gordura num líquido similar ao plasma do sangue. Consiste numa suspensão de matérias proteicas numa solução verdadeira de soro, que contem principalmente lactose e sais minerais. O leite contem gorduras, proteínas (caseína e albuminóides), lactose e sais minerais, lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleotídeos, gases dissolvidos e outros em quantidades pequenas.

A composição do leite varia durante o ciclo de lactação, sendo que durante o nascimento é secretado o colostro que se diferencia do leite no conteúdo de proteínas e sais, o estado de saúde e as espécies dos animais também geram variação na composição dos leites. O leite, continua o autor, apresenta uma débil e passageira proteção natural, razão pela qual altera-se facilmente, especialmente pela ação do calor que influencia no desenvolvimento de variados microrganismos, especialmente aqueles que degradam a lactose produzindo ácido láctico e até a floculação de parte das proteínas, pelo qual é preciso conservá-la para o seu consumo e/ou transformações industriais.

BEHEMER (1975), indica que o tratamento obrigatório para o seu consumo é o aquecimento do leite de 72 a 74 °C, em camadas delgadas durante 15 a 16 segundos em pasteurizador de placas ou aquecido de 63 a 65 °C, por 30 minutos, que é conhecido como o sistema de pasteurização americano.

O leite dos rumiantes mais comuns são os únicos que foram analisados com frequência como para estabelecer uma composição média verdadeira.

### **2.2.1. Composição química do leite.**

O leite é uma mistura física e química em estado de equilíbrio, coexistindo também os estados de emulsão, suspensão e solução. Ele contem substâncias como lactose, glicerídeos de ácidos graxos, caseínas, albuminas e sais segundo ALAIS (1984).

O leite na temperatura ambiente e por ação dos microrganismos, separa-se progressivamente em três partes:

- O creme: camada de glóbulos de gordura unidos por causa da gravidade.

- A coalhada: caseína coagulada pela ação dos microrganismos.
- O soro: contém os produtos solúveis e separa-se da coalhada.

No quadro 1., BEHMER (1975), citando a FLEISHMAN, apresenta a composição média do leite de vaca.

**Quadro 1. Principais componentes do leite de vaca.**

Componente	Quantidade (%)
Água	87,5
Matéria gorda	3,6
Caseína	3,0
Albumina	0,6
Lactose (açúcar)	4,6
Sais minerais (cinzas)	0,7

Fonte: Behmer (1975).

### **2.2.2. Produtos lácteos.**

Antigamente existiam poucos produtos lácteos tais como leite integral, leite desnatado, manteiga e queijos, por desconhecimento dos métodos para o uso total dos componentes do leite. Mas atualmente segundo GRANDI (1990), graças à tecnologia avançada, a lista de produtos lácteos e os seus derivados incrementa-se dia a dia, tendo por exemplo:

- a) Leites de consumo não modificados.
  - Leite cru.
  - Leite pasteurizado ou esterilizado.

- b) Leites concentrados (condensados ou evaporados) pela ação do calor e excepcionalmente por liofilização.
- c) Leites modificados.
  - Leites medicamentosos.
  - Leites aromatizados esterilizados.
  - Leites fermentados ou acidificados como iogurte, leite ácidofilo, yakult, etc.
- d) Creme.
- e) Manteiga.
- f) Queijo.
- g) Sub produtos obtidos do soro.

#### **2.2.3. Produção láctea.**

A produção láctea, segundo informação da Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural-EMATER (1994) até 1992 por estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (SUDAM), foi aproximadamente 1% inferior ao do ano anterior, equivalente à 4,5 bilhões de litros de leite.

Contrariamente, a produção brasileira de leite de vaca, atingiu a quantidade de 15,3 bilhões de litros, 3,4% superior ao do ano anterior. A oferta cresceu a partir da liberação dos preços do leite em novembro de 1991, incentivando os investimentos e reativando antigos centros de produção. Mas, este incremento de produção, encontrou uma economia estagnada, causando sérios problemas à indústria leiteira, as quais esperam recuperar-se em base à economia de mercado e livre competência. A tabela 1., mostra a produção nacional e do estado do Paraná .

Tabela 1. Produção e disponibilidade de leite de vaca no Paraná e no Brasil.

ANO	PARANÁ		BRASIL	
	Produção x 10 <sup>3</sup> l.	Disponibilidade l/hab./ano	Produção x 10 <sup>6</sup> l	Disponibilidade l/hab./ano
1982	896.775	113	11.461	90,0
1983	905.608	112	11.463	88,0
1984	940.160	113	11.933	90,0
1985	979.564	115	12.078	89,0
1986	1.003.000	118	12.492	90,0
1987	1.060.000	121	12.996	92,0
1988	1.125.335	122	13.522	94,0
1989	1.160.000	127	13.600	92,0
1990	1.194.000	125	13.600	92,5
1991	1.240.185	125	-	-
1992	1.200.000	127	15.300	100,2
1993	1.320.000	132	-	-

Fonte: FINGE(Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)SEAB/DERAL.

(-) : Valor não indicado.

Observa-se na tabela que ao longo de mais de 10 anos, o estado do Paraná, experimenta um maior incremento na produção e na disponibilidade por habitante/ano de leite, do que a produção total do Brasil, especialmente no ano de 1993 que apresenta-se com maior disponibilidade de leite por habitante/ano. Mas embora este incremento, existe um grande setor da população especialmente crianças e jovens que não tem acesso ao leite e produtos lácteos.

## **2. 3. Soro de leite.**

Segundo SPREER (1991), o soro de leite ou lactosoro é um líquido obtido da coagulação do leite na elaboração dos queijos, logo após separar a coalhada (caseína) e a gordura. É um líquido pobre em extrato seco, com aproximadamente 5 a 6,5%, e altera-se facilmente pela ação de várias microrganismos.

Comummente, segundo o método utilizado para fabricar queijos, existem dois tipos de soros:

### **a) Lactosoro doce.**

Resulta, segundo ALAIS (1984), da coagulação de leites não ácidos pela ação do coalho. A sua acidez varia de 15 a 25 graus Dornic ( $^{\circ}$ D) segundo os procedimentos. Na coagulação do leite por ação do coalho, o complexo caseína-cálcio, desdobra-se em paracaseinato de cálcio e proteínas do soro, ficando o cálcio unido às proteínas coaguladas segundo SPREER (1991).

### **b) Lactosoro ácido.**

SPREER (1991) cita, que este soro ácido é obtido da fabricação de queijos frescos ou de pasta branca, ou também da fabricação de caseína láctica. Pode ter uma acidez de 120  $^{\circ}$ D. Se a coagulação é totalmente ácida (uso de ácido láctico), o cálcio abandona o complexo caseína-cálcio, formando-se lactato de cálcio e a caseína sem a proteção do cálcio precipita. O lactosoro ácido assim formado contém lactato de cálcio.

Um outro tipo de lactosoro industrial é obtido coagulando as proteínas do leite pelo emprego de outros ácidos como ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido acético.

### **2.3.1. Composição química do soro de leite.**

A tabela 2., apresenta a composição do lactosoro fresco, segundo SPREER (1991) e ALAIS (1984).

Tabela 2. Composição química do soro de leite.

Componentes (%)	Segundo Spreer		Segundo Alais	
	Soro doce	Soro ácido	Soro doce	Soro ácido
Água	93 - 94	94 - 95	93,5	93,5
Extrato seco	6 - 7	5 - 6	-	-
Lactosa	4,5 - 5,0	3,8 - 4,2	4,5	4,0
Ácido láctico	Traços	Até 8,0	0,2	0,6 - 1,0
Proteínas	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0	0,9	1,0
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8	-	-
pH	6,45	Perto de 5	-	-
Gorduras	-	-	0,3	0,1
$\rho(20^\circ\text{C}, \text{P Atm.})$	1,025-1,020	1,027	-	-

(-) : valor não indicado.

A tabela 2 mostra que o soro de leite ainda contém boa quantidade de proteínas e apreciável quantidade de lactose e tem especial importância nos processos fermentativos, nos quais é utilizada como fonte de carbono de baixo custo.

### 2.3.2. Produção e custos do soro de leite.

Antigamente, segundo SPREER (1991), o lactosoro era considerado como um produto residual que não tinha outra utilidade a não ser ração para animais; mas sendo um sub produto rico em componentes valiosos, o seu aproveitamento é importante economicamente para o país, especialmente nos seguintes aspectos:

- a) Aproveitamento completo e efetivo como matéria prima.

- b) Obtenção dos componentes lácteos de alto valor para serem utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e como alimento para o gado.
- c) Redução das concentrações de soro nas águas residuais, para diminuir o DBO<sub>5</sub>; sendo que o DBO<sub>5</sub> do lactosoro é de 30.000 a 60.000 mg. de oxigênio por litro de água residual.

Como exemplo, SPREER (1991), cita que na República Federal da Alemanha, produzem-se anualmente quase 1.600 kt (quilo toneladas) de soro doce e ácido, que contém aproximadamente 74 kt de lactose, 12 kt de proteínas séricas, 10 kt de sais do leite e 7 kt de gordura. Portanto, estão sendo realizados vários estudos em muitos países para obter um melhor aproveitamento do lactosoro. Além disso, o custo de produção em si do lactosoro é praticamente nulo, porque, sendo um subproduto invariavelmente presente nas indústrias de laticínios, em lugar de ser jogado nos esgotos e transformar-se num forte poluente, pode ter seus custos aumentados e ser valorizado economicamente.

### **2.3.3. Utilização do soro de leite.**

Na atualidade, o soro de leite ou lactosoro é utilizado nas mais variadas indústrias, mas ainda em pequena escala. O quadro 2., apresenta, segundo ALAIS (2), as utilizações mais comuns do lactosoro, que vai desde o uso como alimento animal até em fermentações com bactérias lácticas para produção de ácido láctico, que é utilizado na indústria alimentícia, têxtil e de curtumes e com bactérias acéticas para produzir vinagre de soro.

Quadro 2. Principais usos do soro de leite.

1. Desnatado, extração do creme = manteiga de soro.
2. Lactosoro líquido.
  - a) Alimentação animal. (Especialmente suíños)
  - b) Alimentação humana. (Muito limitada)
    - Em bebidas fermentadas ou aromatizadas.
    - No preparo de biscoitos, sorvetes, etc.
3. Lactosoro concentrado ou dessecado = xarope, pasta e lactosoro em pó.
  - a) Alimentação animal.
  - b) Biscoitos, padaria, confeitaria.
  - c) Fabricação de lactose pelo procedimento do álcool (a partir de pó).
  - d) Fabricação de queijos fundidos.
4. Aquecimento à 95 C°.
  - = proteínas precipitadas.
  - a) Produtos para alimentação humana: "Serac", Lactoalbumina;
  - b) Produtos para alimentação animal: Proteínas dessecadas, hidrolizados de proteína.
  - = Águas mães que por concentração e cristalização produzem lactose.
  - a) Para alimentação infantil, farmácia.
  - b) Para indústria da Penicilina.
5. Concentração e cristalização.
  - = Lactose.
  - = Lactosoro sem uma parte de lactose.
  - a) Extração de proteínas.
  - b) Lactosoro em pasta (após a concentração), rico em proteínas e vitaminas.
6. Fermentações.
  - + bactérias lácticas = ácido láctico:
    - a) Alimentação (conservas).
    - b) Indústria têxtil, curtumes, etc.
  - + Clostrídios (fermentos butíricos) = ácido butírico, para a indústria química.
  - + Leveduras = Álcool:
    - a) Bebidas alcoólicas, "cerveja de soro", etc.
    - b) Solvente industrial, indústria química.
    - c) Fermentação por bactérias acéticas = vinagre de soro.
7. Lactosoro fermentado por cultivo com leveduras de padaria.
  - = Produto concentrado ou dessecado para alimentação animal.
8. Obtenção de Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina), extraída de diversas águas mães.

Fonte: Alais (1984).

## 2.4. A soja.

Segundo BONETTI (1981), a soja, *Glycine max L.*, é a mais importante oleaginosa em produção sob cultivo intensivo, e produz mais proteína por hectare que qualquer outra planta em cultivo.

Todos os autores concordam que esta leguminosa originou-se na região centro-oeste asiático há mais de 7.000 anos; sendo mencionada no herbário PEN TS'AO KUNG MU, escrito pelo imperador SHEN NUNG, fazendo também parte do grupo dos cinco grãos sagrados junto ao arroz, trigo, cevada e sorgo.

BONETTI (1981) e GOMEZ (1988), citam que a difusão desta planta no resto do mundo foi lenta até chegar aos Estados Unidos da América do Norte, onde cresceu em importância a partir de 1922, como indicam SMITH & CIRCLE (1978).

Os principais países sul americanos produtores de soja, segundo BONETTI (1981), são: Brasil, Argentina, Paraguai, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru e Chile.

A tabela 3., apresenta a produção de soja no Brasil e no Paraná, onde mostra que durante mais de 10 anos, a produção nacional, em termos gerais experimentou um crescimento significativo, mas a produção no estado de Paraná permaneceu quase constante, experimentando uma diminuição de 29,59% em 1983 a 21,26% em 1994, o que significa quase 10% de diminuição com relação à produção nacional.

Os caracteres botânicos da soja, indicam que é uma planta herbácea, da família Leguminaceae, subfamília Papilionacea, tribo Faseolacea. É uma planta geralmente anual e poucas vezes perene.

KOBAYASHI et al.(1992) indicam que o consumo de proteína de soja como ingrediente nos alimentos, cresceu bastante por ser um alimento económico e de alta qualidade nutricional, mas que o seu sabor a feijão cru, impede um uso mais generalizado.

**Tabela 3. Produção de Soja no estado do Paraná e no País.**

ANOS	BRASIL		PARANÁ		PRODUÇÃO
	Área (ha)	Produção (t)	Área (ha)	Produção (t)	
1983	8.137.112	14.582.347	2.022.000	4.315.000	29,59
1984	9.421.202	15.540.792	2.177.900	4.121.000	26,52
1985	10.153.405	18.278.585	2.196.370	4.413.000	24,14
1986	9.181.587	13.330.225	1.745.000	2.600.000	19,50
1987	9.134.291	16.968.827	1.718.000	3.810.000	22,45
1988	10.519.972	18.016.170	2.123.379	4.771.264	26,48
1989	12.211.208	24.071.360	2.399.993	5.031.297	20,90
1990	11.487.303	19.897.804	2.267.638	4.649.752	23,37
1991	9.618.313	14.938.113	1.972.538	3.531.216	23,64
1992	9.412.154	19.150.198	1.794.000	3.417.000	17,84
1993	10.717.000	23.042.000	2.076.000	4.867.000	21,43
1994*	11.458.100	25.081.600	2.106.044	5.333.496	21,26

Fonte: MA/SUPLAN-EAGRI, IBGE, DERAL/SEAB.

NOTA: (\*) Dados preliminares, sujeitos a retificação.

CEPAGRO-Fev/94.

#### **2.4.1. Composição química da soja.**

Segundo Orestes Campese e Meissl & Bocker, em GOMEZ (1988), a composição química dos grãos de soja é mostrada no quadro 3.

Observa-se neste quadro que os grãos de soja tem aproximadamente 40% de proteína e 18,50% de óleo vegetal, tornando-se por estes e pelos demais componentes, um alimento de primeiro ordem no campo nutricional.

Quadro 3. Composição química dos grãos maduros da soja.

Componente (%)	Campese	Meissl & Bocker
Água	9,50	10,00
Caseína solúvel	30,00	30,00
Caseína insolúvel	7,50	7,50
Albumina	0,50	0,50
Óleo	18,50	18,00
Lecitina	1,50	-
Colesterina, resina, cera	0,50	2,0 (inclui lecitina)
Dextrina	10,00	10,00
Amido	4,00	5,00
Celulose	6,00	5,00
Cinzas	5,00	-

(-) Valor não indicado.

Fonte: Gomez (1988)

#### 2.4.2. Utilidades da soja.

As principais utilidades da soja estão resumidas no quadro 4, onde observa-se a grande variedade de subprodutos que são obtidos das sementes, principalmente a partir da farinha, óleo, sementes verdes e sementes secas.

#### 2.4.3. Fatores antinutricionais da soja.

O valor da soja e os seus subprodutos depende principalmente de suas propriedades proteicas, sendo que tem um alto teor de proteínas de fácil digestão e contém numerosos aminoácidos essenciais; constituindo-se num bom substituto do leite e da carne.

Mas apesar de tudo isto, não ocupou ainda o lugar preferido na alimentação, por causa do sabor a feijão verde ou cru, também conhecido como sabor "beany" e segundo SILVEIRA et al.(1989) pela presença de fatores antinutricionais que depreciam grandemente o seu valor alimentício; mas sendo estes agentes termolábeis, são inativados pelo calor e mais ainda pelo calor úmido.

Quadro 4. Principais utilidades da soja.

	Farinha	Adubo Sucedâneo de celulóide Alimentação para o homem Goma Caseína vegetal Tintas a água Alimento para o gado
Sementes	Óleo	Glicerina Esmaltes Azeite culinário Verniz Lacas Linóleo Artigos impermeáveis Tintas Sabão Celulóide Sucedâneo da borracha Tintas de impressão Óleo e graxa lubrificante Óleo combustível Velas Lecitinas Azeite de iluminação Oleados Desinfetantes Óleo margarina
	Semente verde	Verdura Conserva enlatada Salada
	Semente seca	Alimento para o gado Torradas, cozidas Bebidas Sopas, molho de soja Leite vegetal

Fonte: Gomez (1988).

Destes fatores antinutricionais, os mais conhecidos são:

a) Fator antitripsina.

Segundo ANTUNES & SGARBIERI (1981), é o mais conhecido e mais estudado dos inibidores. Chamado antitripsina ou inibidor da tripsina porque tem a capacidade de interferir com a capacidade proteolítica da enzima digestiva chamada tripsina in "vitro" e no trato intestinal do homem e dos animais.

BOWMAN & HAN-SANDSTED, citados pelos mesmos autores, indicam que no extrato de soja não tratada termicamente, existia uma substância que "in vitro" que inibia a ação da tripsina sobre a caseína; logo depois, KUNITZ, também citado pelos autores, demonstrou a sua forte afinidade pela tripsina e menor afinidade pela quimiotripsina. Este produto foi chamado de "inibidor da tripsina" e catalogado como uma proteína termolábil, de peso molecular aproximado de 24.000, espectro de absorção máxima a 280 nm. e ponto isoelétrico em pH = 4,5.

Assim mesmo, WESTFALL & HAUGE, citados pelos mesmos autores, observaram que a eficiência das proteínas da farinha de soja aumenta proporcionalmente à diminuição do fator antitripsina, verificando também que a autoclavagem à 120 °C, durante 10 minutos, eleva ao máximo o valor biológico das proteínas da soja, podendo diminuir com o excesso de tratamento térmico.

b) Hemaglutinina.

As hemaglutininas são glicoproteínas amplamente distribuídas no reino vegetal, especialmente nas leguminosas como a soja. Tem a capacidade de aglutinar "in vitro" os glóbulos vermelhos do sangue de várias espécies de animais e até do homem, como indicam ANTUNES & ESGARBIERI (1981).

Os mesmos autores indicam que os quatro tipos desta proteína tóxica da soja, não tem atividade antitriptica. Os pesos moleculares destas proteínas são próximos à 110.000, mas são rapidamente inativadas pelo calor seco e úmido.

c) Saponinas.

Foram isoladas do extrato de soja sem tratamento térmico, conforme indicam ANTUNEZ & ESGARBIERI (1981), substâncias que "in vitro" causam a ruptura dos eritrócitos; sendo possível inativar estas substâncias por fervura ou hidrólise com solução ácida.

d) Agentes bocigênicos.

Existem dados que produtos de soja não submetidos a adequados tratamentos térmicos, produzem um aumento de tamanho na glândula tireóide em ratos e pintos. Este problema, segundo explicam ANTUNEZ & ESGARBIERI (1981), pode ser eliminado com adequado suprimento de iodo ou tratamento térmico adequado nos produtos de soja; mesmo assim nenhum agente bocigênico foi isolado da soja.

e) Atividade ureásica.

A enzima urease, como indicam ANTUNEZ & ESGARBIERI (1981), está presente na soja em grandes quantidades, mas não é considerado agente antinutricional, sendo apenas importante a sua inativação nos alimentos fortificados com uréia; porque a urease catalisa o desdobramento e transformação da uréia em  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$ , produzindo sabor desagradável nos alimentos. A determinação da atividade ureásica da soja é importante porque constitui um teste rápido e simples na avaliação da eficiência do processo de tostagem do farelo.

#### **2.4.4. Extrato aquoso de soja.**

O extrato aquoso de soja (EAS), comumente chamado "leite de soja", é um produto líquido, de aspecto semelhante ao leite de vaca e de grande valor nutritivo, segundo COSTA (1981) e SILVEIRA et al.(1989).

O leite de soja ou EAS, foi utilizado na China desde antes da era Cristã, e citada pelo filósofo WHI NAIN TSE, que acredita-se desenvolveu o Tofu, porque a separação do leite de soja é o primeiro passo para a produção do Tofu e Yuba.

O leite de soja tradicional, como indicam SMITH & CIRCLE (1978) e CABRAL & MODESTA (1981), é produzido por submersão dos grãos de soja em água durante a noite, moagem deles, aquecimento da massa molhada para incrementar o valor nutritivo e o flavour do produto, após filtrado e engarrafado para o seu comércio. Outro procedimento segundo GOMEZ (1988), para produção de EAS, foi desenvolvido pela fábrica de Caseo-Sojaina, perto de Paris-França, para obter um EAS livre de impurezas e microrganismos. Tal procedimento consistia na limpeza dos grãos com água potável e filtrada, deixar os grãos de molho nela, logo realizada a moagem e filtração num filtro prensa e a posterior esterilização; produzindo um leite altamente higiênico.

A grande maioria dos autores afirmam que o leite de soja é muito similar ao leite de vaca e não deixa depósitos, sendo um líquido muito homogêneo. Assim mesmo, o leite de soja, sobe quando ferve, e se esfriado, produz uma camada delgada ou nata na sua superfície. Tem cheiro de malte, ferve à 101 °C., tem um pH ácido sendo coagulado pelos coalhos (renina), os ácidos e alguns sais, o teor de ácido láctico pode ser elevado por fermentação em até 1%.

A composição química comparativa do leite de soja segundo LI-YU-YING e GRANDVOINNET, citados por GOMEZ (1988) é apresentada no quadro 5. O quadro mostra que o leite de soja tem uma alta concentração de proteínas, quase duas vezes mais do que o leite de vaca, mesmo assim, apresenta um alto conteúdo de cinzas e baixo teor de açúcares.

E assim, indica GOMEZ (1988), que a soja está considerada entre os mais ricos em proteína. Na China, é tido como alimento básico para as crianças, onde também os adultos a bebem pela manhã com um pouco de açúcar. As pessoas que não toleram a ingestão de leite de vaca, toleram bem o leite de soja.

Quadro 5. Composição química comparativa do Leite de Soja.

<b>Leites de</b>	<b>Proteínas %</b>	<b>Gorduras %</b>	<b>Açúcares %</b>	<b>Cinzas %</b>
Soja	5,76	2,46	1,40	0,80
Mulher	1,25	2,50	6,00	0,25
Vaca	3,50	4,00	5,25	0,75
Cabra	4,00	4,50	4,00	0,50
Ovelha	5,75	7,25	5,50	1,00
Égua	2,00	1,50	6,00	0,50
Porca	6,00	7,00	6,75	1,00
Jumenta	2,50	1,50	6,25	0,50
Cadela	7,50	8,00	3,00	1,00

Fonte: Gomez (70).

Nos Estados Unidos é ainda utilizada em pães, bolos, pastéis, chocolates e na alimentação de crianças; e ultimamente existem estudos para a produção de coalhadas, iogurtes, kefir, etc., produzidos por fermentação.

No Brasil, é produzido por diversas empresas, como Olvebra S.A., embora na forma de Extrato Hidrossolúvel de Soja (EHS). Assim mesmo, segundo HINOJOSA & HERMINIO (1981) o Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas (ITAL), desenvolveu um leite de soja denominado VITAL, que é adoçado, aromatizado e enriquecido com vitaminas e minerais, sendo bem aceito por crianças na faixa etária de 6 a 14 anos, com uma pontuação de 77 na escala de degustação.

O leite VITAL pode ser embalado em volumes de 200 ml., pasteurizado ou esterilizado para ser destinado ao consumo escolar segundo COSTA (1981). No processo desenvolvido pelo ITAL, continua COSTA (1981), cada 100 kg. de soja, fornecem 750 kg. de extrato de soja simples ou 830 kg. de VITAL, e o extrato seco pode ser utilizado como

farinha no enriquecimento de outros produtos, porque ainda contém 28% de proteína sobre a matéria seca.

Atualmente o custo de leite de soja antes da pasteurização é de 1/3 do custo do leite de vaca antes do mesmo procedimento, sendo que todos os demais procedimentos como pasteurização, esterilização, embalagem, etc., tem custos equivalentes para ambos os produtos. A figura 1., mostra o processo de produção do leite de soja VITAL.

Num outro trabalho WANG et al (1991) preparam leite de soja (EAS), macerando os grãos em água à temperatura ambiente durante 6 horas, depois os grãos foram moídos no liquidificador durante 3 minutos com adição de 1:9 de soja: água. O leite assim preparado, foi separado numa centrifuga e teve a seguinte composição apresentada na tabela 4.

**Tabela 4. Composição química do leite de soja.**

Componente	Teor (%)
Proteína	3,35
Gordura	2,43
Cinzas	0,38
Carboidrato*	0,84
Água**	93,00
<b>Sólidos totais</b>	<b>7,00</b>

Fonte: Wang (1991)

\* Calculado por diferença: (Sólidos totais + Proteína + Gordura + Cinzas)

\*\* Calculado por diferença: (100 - Sólidos totais)

#### **2.4.5. Principais usos do extrato aquoso de soja.**

A escassez de alimentos de origem animal em muitos países, o seu alto custo e a maior rentabilidade econômica na produção de alimentos de origem vegetal, geram o aparecimento de produtos similares ao leite de vaca, sendo entre eles o leite de soja o mais similar.

Segundo SPREER (1991), os usos mais importantes do leite de soja são:

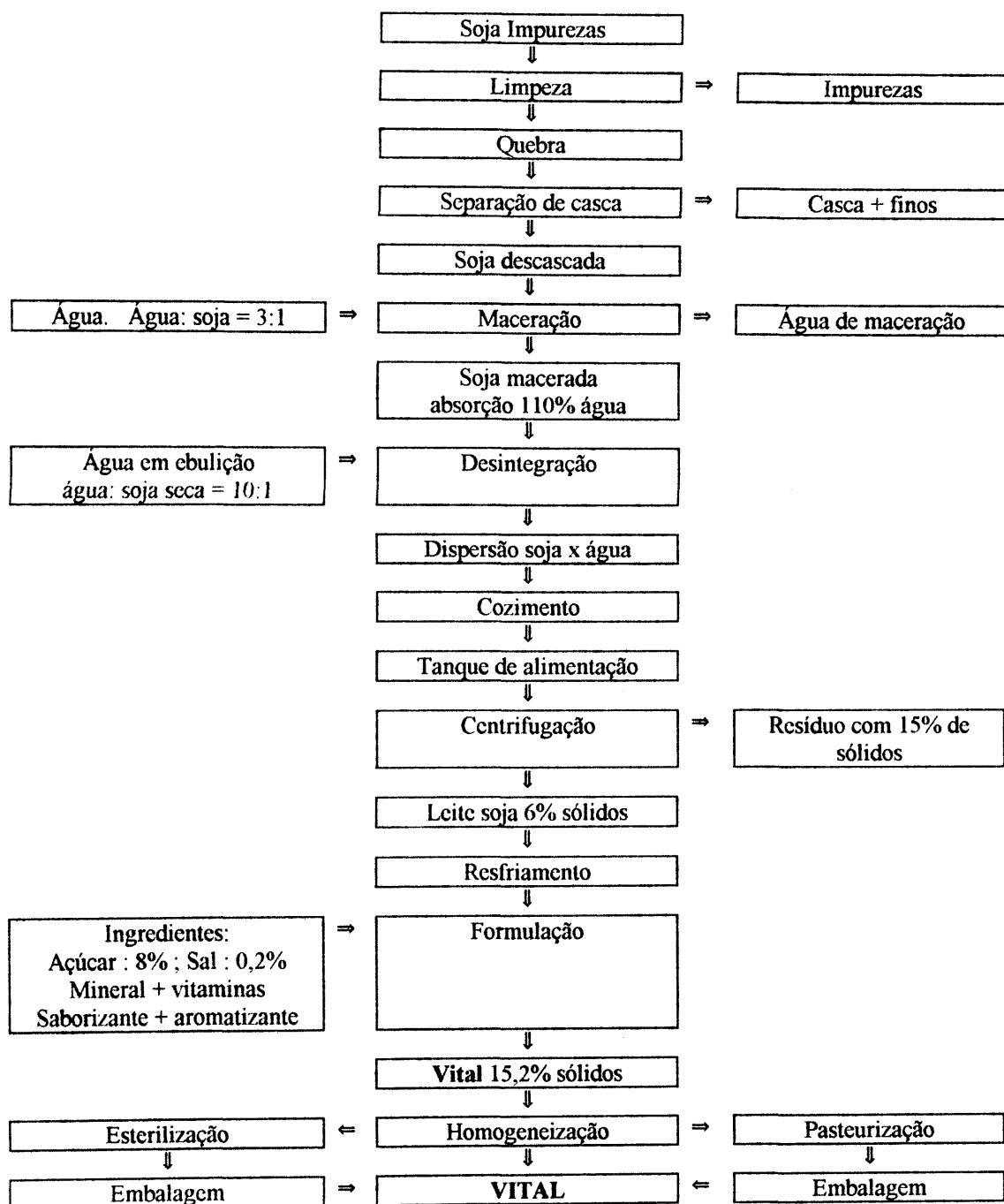


Figura 1. Fluxo grama de produção do leite VITAL.

- a) Leite de soja (Soy milk) integral, similar em composição, aspecto e sabor ao leite de vaca.
- b) Leite de soja aromatizado (Flavored milk): suplementado com frutas, cacau, caramelo ou álcool. Pode ou não ser adoçado.
- c) Produtos fermentados do leite de soja: iogurte, "mazada", coalhada, como produtos intermediários na fabricação de outros produtos.
- d) Alimento para cria de terneiros: como substituto do leite de vaca.
- e) Alimento infantil: substituto parcial do leite de vaca.
- f) Sorvetes e sopas desidratadas.

## **2.5. Fermentação.**

A fermentação, segundo STAINER et al (1976), é um complexo processo metabólico, resultado de sucessões de reações químicas simples, cada uma catalisada por uma enzima específica que pode ser produzida por um determinado tipo de microrganismo, e por outra parte, JAY (1978), indica que a fermentação é um processo pelo qual os glicídios e substâncias similares, oxidam-se liberando energia em ausência de receptores externos de elétrons. Indica também que é um processo pelo qual as alterações químicas produzidas num substrato orgânico, são ocasionadas pelas enzimas elaboradas por estes microrganismos.

MONTES (1977), em concordância com STAINER (1976), indica também que a fermentação é um tipo de reações biológicas de oxidação-redução produtoras de energia, nas quais compostos orgânicos atuam como receptores finais de elétrons; pelo contrário, processos como a respiração aeróbica e anaeróbica, servem para oxidar substâncias orgânicas e as vezes inorgânicas, podendo a oxidação de substâncias inorgânicas, proporcionar energia para a síntese de matérias celulares a partir de CO<sub>2</sub> e outros nutrientes inorgânicos.

Ainda segundo MONTES (1977), na fermentação, tanto o doador como o receptor de elétrons são compostos orgânicos que geralmente são produzidos em base a um único substrato orgânico no decorrer do metabolismo intermediário. Para um composto ser fermentável, precisa ser capaz de produzir intermediários tanto oxidáveis como redutíveis. As substâncias que têm estas características são os glicídios (açúcares), sendo estes os mais fáceis e amplamente metabolizados pelos microrganismos fermentadores; outras substâncias como ácidos orgânicos, aminoácidos, purinas e pirimidinas, podem também ser fermentadas por algumas bactérias.

### **2.5.1. Vias da fermentação.**

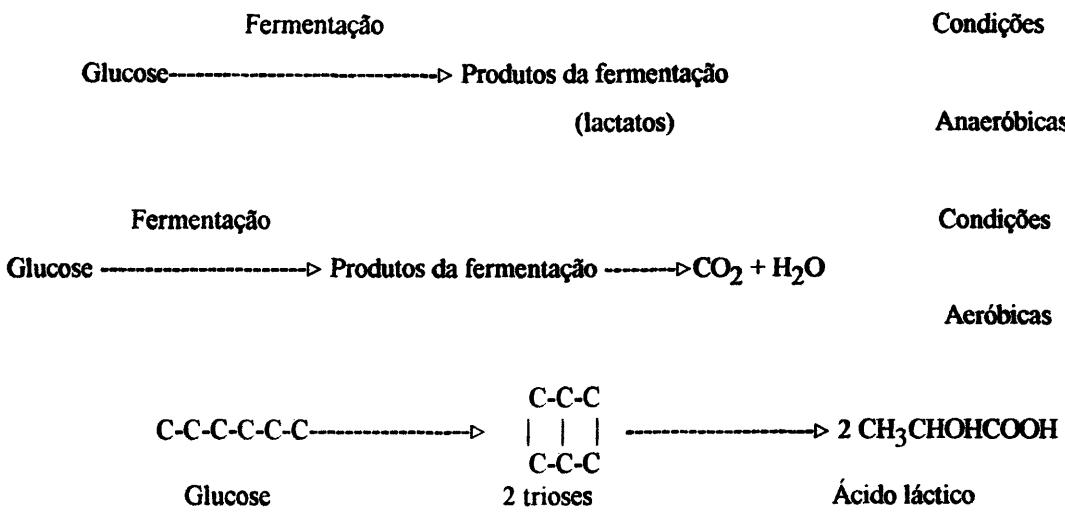
Existem sistemas multienzimáticos que segundo WOOD et al (1977), catalisam a degradação de moléculas combustíveis e a recuperação de parte de sua energia química na forma de trifosfato de adenosina (TPA = ATP Adenosin Tri Phosphate), utilizando por exemplo a glicólise, uma degradação anaeróbica para produzir ácido láctico.

Para LEHNINGER (1976), a glicólise é uma das muitas vias catabólicas genericamente conhecidas como "fermentações anaeróbicas", através das quais, muitos organismos extraem energia química de vários combustíveis orgânicos na ausência de oxigênio molecular.

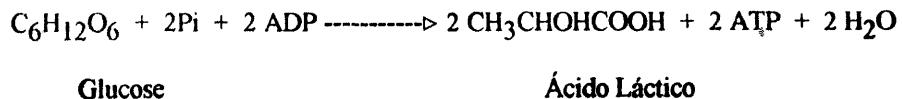
A fermentação anaeróbica é o tipo mais básico de mecanismo biológico para obtenção de energia a partir de moléculas nutrientes, porque a maioria dos organismos superiores conservou a capacidade para a degradação anaeróbica da glucose até lactato, tornando-se uma via preparatória no catabolismo aeróbico da glucose.

Os organismos heterotrofós, continua o autor, obtém sua energia a partir de reações de oxido-redução, nas quais existe transferência de elétrons de um composto doador de elétrons (agente redutor) para um receptor de elétrons (agente oxidante). Da mesma forma os heterotrofós anaeróbicos, obtém a maior parte de sua energia das reações de oxido-redução, sendo que os elétrons passam de um intermediário orgânico do desdobramento do

açúcar ou doador de elétrons, para um outro intermediário orgânico receptor de elétrons do processo de fermentação. Os açúcares, especialmente a D-glucose, são os combustíveis mais comuns da fermentação anaeróbica, e desenvolvem-se segundo o esquema:



sendo que a equação completa da glicólise, incluindo as etapas conservadoras de energia é:



A energia livre padrão ou de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) no desdobramento da glucose até lactato é  $\Delta G^\circ = -47,0 \text{ kCal/mol.}$ , mais do que a necessária para fosforilar duas moléculas de ADP até ATP ( $\Delta G^\circ = +14,6 \text{ kCal/mol}$ ), de onde desprende-se que a eficiência energética da glicólise é maior que 31%.

Assim, a glicólise é uma reação essencialmente "irreversível", predominando o equilíbrio na direção de formação de lactato.

A glicólise anaeróbica tem dois estágios que são catalisados pela ação consecutiva de onze enzimas. No primeiro estágio, a glicólise é preparada para seu catabolismo pela fosforilação e clivada para formar o açúcar de três carbonos, gliceraldeído-3-fosfato.

Este estágio serve como fase preparatória ou coletora, na qual diversas hexoses, após a fosforilação pelo ATP, entram na seqüência glicolítica e são convertidas num produto comum, o gliceraldeído-3-fosfato. Aqui, são gastas duas moléculas de ATP para fosforilar as posições 1 e 6 da hexose.

No segundo estágio, o gliceraldeído-3-fosfato, é convertido a lactato, sendo este estágio via comum para todos os açúcares. Neste estágio ocorrem as reações de oxido-redução e os mecanismos conservadores de energia, com fosforilação de ADP a ATP, formando-se quatro moléculas de ATP, que logo após a subtração de duas ATP, consumidas no primeiro estágio, ainda ficam duas moléculas de ATP por molécula de glucose degradada a lactato. A figura 2., apresenta as duas etapas da glicólise.

Segundo RHODES & FLETCHER (1969), é denominada glicólise a degradação anaeróbica dos hidratos de carbono até piruvato, sendo que a rota metabólica para esta degradação denomina-se via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, na qual o destino posterior do piruvato dependerá em grande medida das condições ambientais.

A glicólise converte cada molécula de glucose em duas de piruvato, enquanto produz a síntese total de duas moléculas de ATP a partir de duas moléculas de fosfato inorgânico e duas moléculas de ADP (Adenosin Di Phosphate). A glicólise, continuam os autores, começa com a fosforilação da hexose por duas moléculas de ATP em duas etapas sucessivas, seguindo o diagrama na figura 3.

Por sua parte PELCZAR et al.(1980) indicam que o ácido pirúvico é considerado um composto chave no metabolismo da glicose e que todas as reações subsequentes são anaeróbicas (fermentativas), com exceção das que ocorrem no ciclo de Krebs.

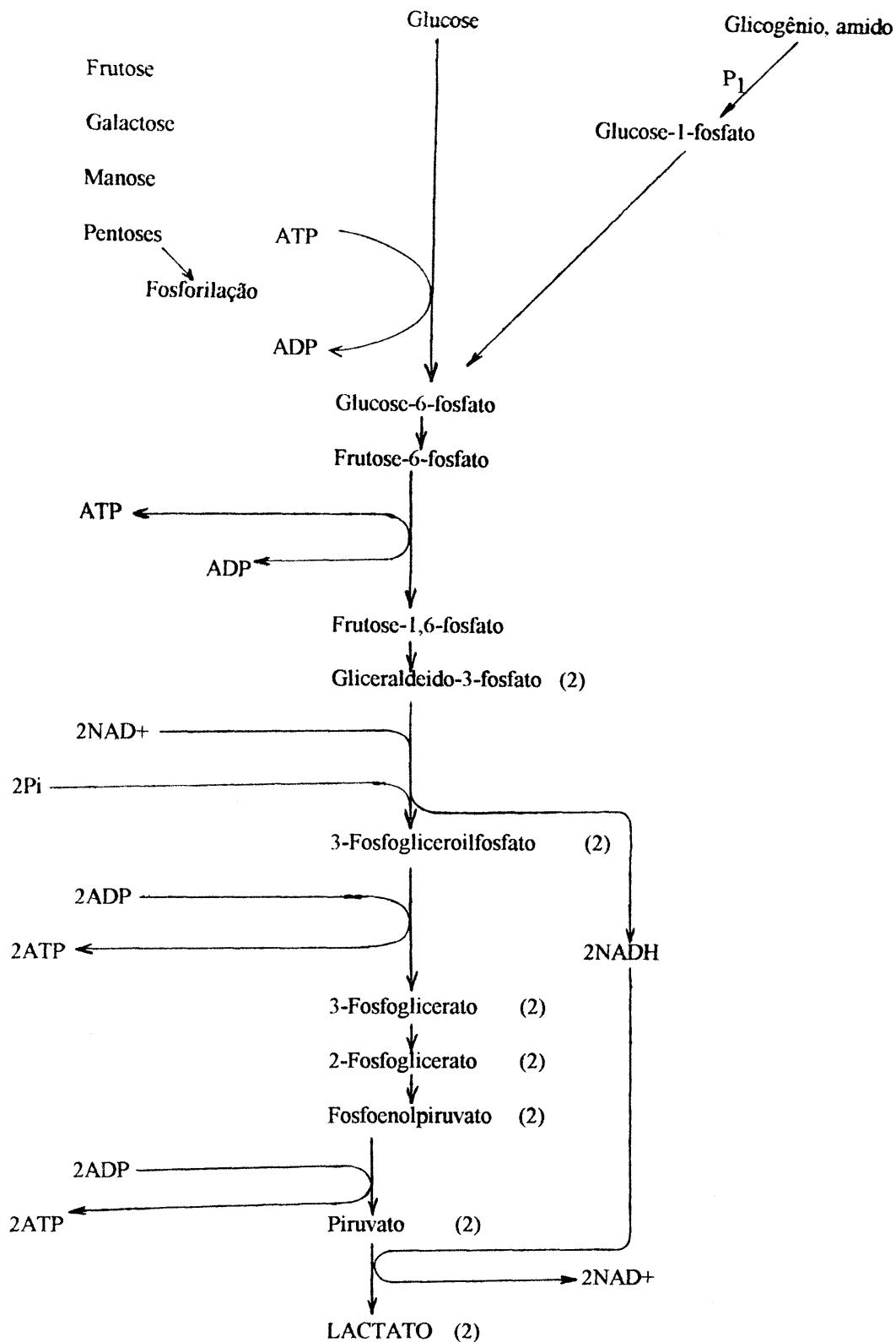


Figura 2. Etapas da glicólise.

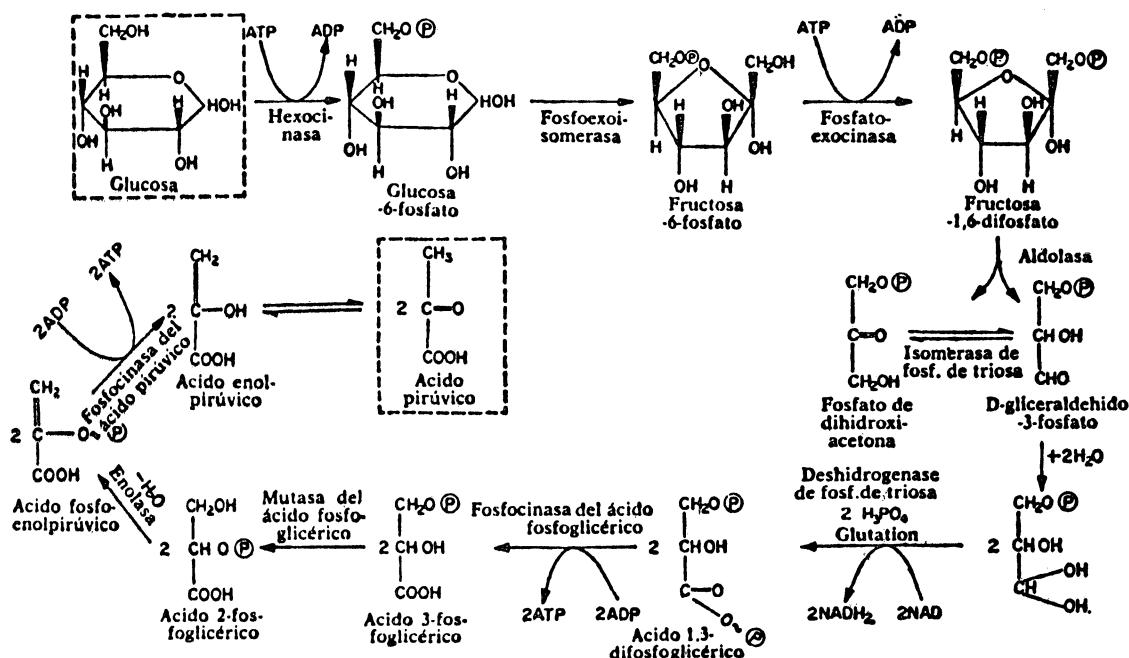


Figura 3. Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas.

### 2.5.2. Microrganismos e as fermentações.

Como as fermentações são produzidas pela ação enzimática dos microrganismos, estas são utilizadas para a produção e conservação de vários tipos de alimentos, e como indica JAY (1978), muitos destes alimentos são produtos conservados com tempo de prateleira maior que de suas matérias primas, e todos tem aromas e sabores característicos, consequência direta ou indireta dos microrganismos das fermentações, como no caso das fermentações alcoólica, propiônica, cítrica, acética, láctica, butírica e outras.

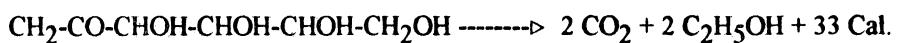
### 2.5.3. Tipos de fermentações.

Os produtos finais das fermentações ou metabólitos, indica MONTES (1977), são determinados pelo tipo de microrganismo que as realiza, de substrato fermentável e fatores ambientais como temperatura e acidez, e segundo CARVALHO LIMA (1990) depende também dos fatores nutricionais dos microrganismos.

Segundo os critérios mencionados, os principais tipos de fermentações são:

#### 2.5.3.1. Fermentação alcoólica.

Esta fermentação é característica dos tecidos das plantas superiores, leveduras, fungos e poucas bactérias. MONTES (1977) e STAINER (1976), concordam que neste processo, o produto intermediário, ácido pirúvico, é descarboxilado produzindo  $\text{CO}_2$  e acetaldeído ( $\text{CH}_3\text{-CHO}$ ), sendo que a redução do acetaldeído a álcool é catalisada pela enzima álcool dehidrogenase, associada à oxidação simultânea da triose-fosfato a ácido fosfoglicérico, admitindo-se também que 1 mol de glucose fermentada, é convertida em 2 moléculas de etanol e dois moléculas de  $\text{CO}_2$ , conforme a seqüência:



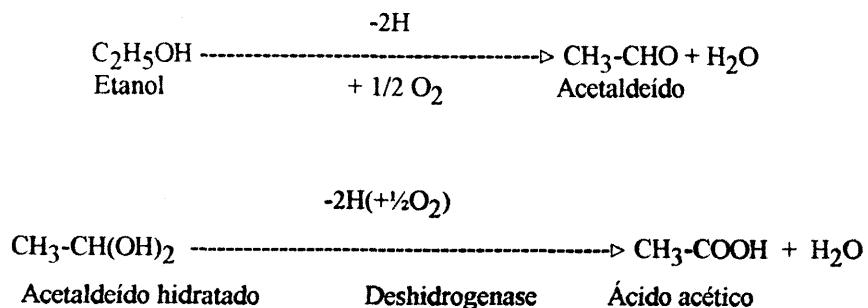
Hexose

Etanol

#### 2.5.3.2. Fermentação acética.

Consiste na transformação de álcool em ácido acético por ação de certos microrganismos como *Acetobacter aceti*, *A. xylinoides*, *A. acetigenum*, *A. rances* entre outros, segundo AQUARONE et al. (1990). Sabe-se que as bactérias acéticas, podem trabalhar também em anaerobiose.

MONTES (1977) sustenta, que na fermentação acética, a hidrogenação do etanol a ácido acético realiza-se por duas dehidrogenações sucessivas, como:



#### 2.5.3.3. Fermentação cítrica.

A fermentação cítrica realizada por vários microrganismos, especialmente *Aspergillus niger*, produz como metabólito principal ácido cítrico, apresentando alto rendimento.

Este tipo de fermentação, conforme MONTES (1977) e STAINER (1976), pode ser superficial ou submersa, sendo muito importante a composição do meio e a cepa utilizada. Como fonte de carbono, geralmente é utilizada a glucose, que tem um rendimento em ácido cítrico de até 90%; mas podem ser utilizadas sacarose, frutose, maltose ou melaços de cana.

#### 2.5.3.4. Fermentação láctica.

STAINER et al (1976), afirmam que a fermentação láctica é característica dos tecidos animais, assim como de alguns protozoários, fungos e bactérias, especialmente das chamadas "bactérias lácticas", as quais segundo VENUS (1992) devem ser adequadamente selecionadas para serem utilizadas tanto em fermentações simples como em processos biotecnológicos.

Na fermentação láctica, os açúcares hexacarbonados simples (hexoses), são convertidos em duas moléculas de ácido láctico segundo a seqüência genérica:

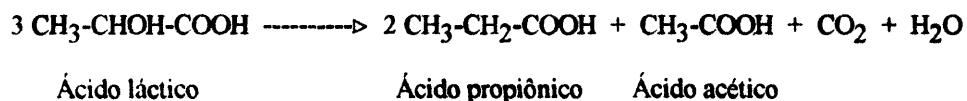


#### **2.5.3.5. Fermentação propiônica.**

E realizada por espécies do gênero *Propionibacterium*, *Clostridium propionicum* e *Micrococcus lacticus*.

Segundo STAINER (1976), esta fermentação produz ácido propiônico como produto final do metabolismo mais importante, a partir sobretudo de ácido láctico e hidratos de carbono.

O *Propionibacterium petersonii* e outros transformam os lactatos em ácido propiônico, ácido acético e água, segundo a seqüência:



Este processo, segundo DEMETER (1971), contribui na formação do aroma dos queijos duros e de corte; e pela produção de gás por parte das bactérias propiônicas, determina a correta formação de "olhos" ou poros neste tipo de queijos.

#### **2.5.4. Fermentação láctica.**

A fermentação láctica é característica principal das bactérias ácido lácticas e engloba a degradação da lactose ou outras hexoses até ácido láctico. DAVIS (1974) indica que esta fermentação é a mais simples, com uma única reação catalizada por uma desidrogenase láctica.

Segundo STAINER (1976), o mecanismo simplificado da reação é o seguinte:



A oxidação da triose fosfato é associada à redução de ácido pirúvico através da ação copladora do DPN que participa nas reações catalisadas pelas enzimas triose fosfato dehidrogenase e dehidrogenase láctica. Assim a triose fosfato que é derivada da molécula

fosforilada da frutose, é o doador de elétrons, em quanto o ácido pirúvico, produtor ulterior da oxidação da triose fosfato, é o receptor final de elétrons.

JAY (1978) e DAVIS (1974) também concordam que para cada molécula de hexose fermentada, são consumidas duas moléculas de ATP, mas são produzidas quatro, com um ganho líquido de duas moléculas de ATP.

LEHNINGER (1976), cita também que na degradação anaeróbica da glucose através da seqüência glicolítica, o lactato formado que não pode ser utilizado posteriormente, ainda contém a maior parte da energia original da glucose.

#### **2.5.4.1. Bactérias lácticas.**

A fermentação láctica que começa com a via glicolítica e após com a produção de ácido láctico a partir do piruvato, é originada por bactérias acidolácticas, que segundo JAY (1978), dividem-se em quatro géneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*(grupos D e N)

SA & BARBOSA (1990), dividem às bactérias lácticas em família *Streptococcaceae*, de forma arredondada, soltas ou em cadeias, e em família *Lactobacillaceae*, com forma de bastonetes, soltos ou em cadeias. Não possuem catalase e reagem positivamente às colorações de Gram, azul de metíleno e rezarsurina. Estas bactérias estão difundidas na natureza, especialmente lactobacilos e streptococos, na cavidade bucal e mucosas do homem e animais.

Estas bactérias lácticas, indicam RHODES & FLETCHER (1969), são Gram positivas, anaerobias ou microaerófilas que apresentam nutrição exigente e muitas precisam componentes do grupo vitamínico B e alguns aminoácidos para otimizar o seu crescimento.

As fermentações industriais dependem, principalmente, da utilização dos lactobacilos homofermentativos como *Lactobacillus delbrueckii*, *L.bulgaricus*, *L.pentosus*, *L.casei*, *L.leichmanii*, *Streptococcus lactis* e *S.thermophilus*.

Os microrganismos, a serem utilizados, são selecionados segundo o carboidrato que se quer fermentar diretamente ou após esses carboidratos serem submetidos a um tratamento preliminar. Estas fontes geralmente proporcionam glucose, sacarose ou lactose.

A temperatura de fermentação varia de 30 a 37 °C para o *S.lactis*, *L.pentosus* e *L.casei* entre outros, e de 45 a 50 °C. para *L.delbrueckii* e *L.bulgaricus*.

Segundo DEMETER (1971), as bactérias lácticas são de máxima importância para a indústria leiteira por sua capacidade de fermentar a lactose e produzir ácido láctico, aromas e sabores nos produtos lácteos e também em conservas de frutas e vegetais, assim como na ensilagem de forragens.

#### **2.5.4.2. *Lactobacillus casei*.**

Segundo BUCHANAN & GIBBONS (1974) na 8<sup>a</sup> edição do Manual de Bergey (1974), o *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen), é uma bactéria láctica em forma de bastonete curto, com extremos quadrados, geralmente com menos de 0,4 µm de largura, 1,5 µm de comprimento e tendência a formar cadeias, não são móveis, nem têm flagelos.

As colônias cultivadas em "Pour plate", são lisas, com forma de lentes ou diamantes, de cor branca ou amarelo claro. Crescem em caldos de cultivo até com bastante turbidez e usualmente fermentam sorbitol e sorbose, geralmente fermentam maltose e sacarose lentamente, existe produção de ácido L(+)-láctico quando existe excesso de ácido L(-)-láctico, sendo dextro rotativa a rotação ótica resultante. Também fermenta ribose a ácido láctico e acético sem produção de CO<sub>2</sub>. Nutricionalmente precisa de riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio e niacina, não requer tiamina, vitamina B12 e timidina.

ALAIS (1984), cita que este bacilo é mesófilo, com grande atividade na queijaria, porque possui também enzimas como proteinases, pepsidases, desaminases e lipases. As cepas de *L.casei* possuem o antígeno do grupo B ou C, mas aparentemente não existe relação entre os caracteres bioquímicos e estes抗ígenos.

Algumas classificações antigas, como a de FREUDENREICH, concedem diferentes nomes aos atualmente conhecidos como: *L.casei*=*Bacterium casei a*; *L.brevis*=*Bacterium casei y*; *L.fermenti*=*Bacterium casei s*; *L.helveticus*=*bacterium casei E*.

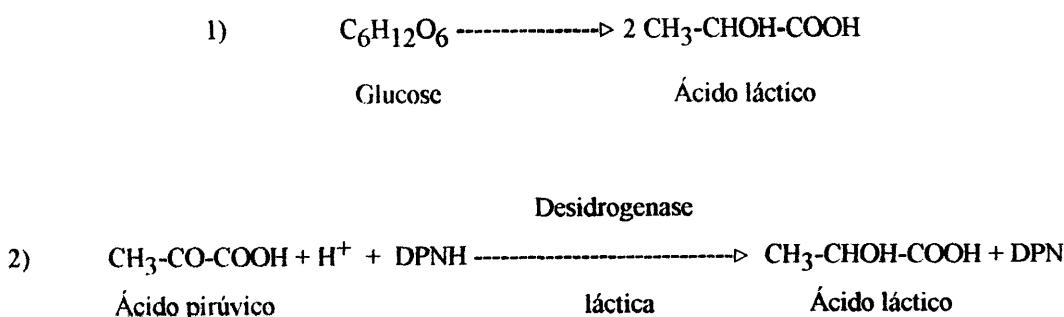
DEMETER (1971) faz notar que o *Lactobacillus casei*, existe como *Lactobacillus lactis* nas máquinas de ordenha e, mais freqüentemente, no leite cru. Muitas cepas sobrevivem à pasteurização curta e participam essencialmente na maturação de queijos duros e de corte pelo seu alto poder proteolítico. A bibliografia é escassa à respeito de características visuais como diagramas ou fotografias.

Segundo GUOQUIANG et al (1991), o *Lactobacillus casei* é um dos microrganismos que produz o nutricionalmente importante isômero L-lactato como o seu maior metabolito.

JAY (1978) assinala que todas as bactérias lácticas tem a propriedade de formar ácido láctico a partir das hexoses, mas existem algumas que produzem diferentes produtos finais segundo os dois tipos principais de fermentação láctica que identificam-se como:

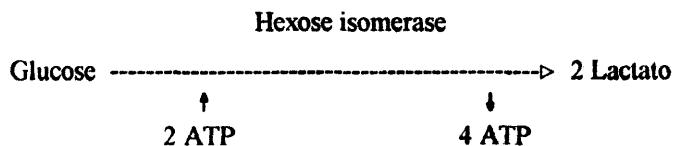
#### a) Fermentação homoláctica.

É realizada principalmente por estreptococos e algumas espécies de lactobacilos e segundo MONTES (1977), transformam o açúcar do meio quase totalmente em ácido láctico. A fermentação segue a via da glicólise de EMBDEM-MEYERHOF (E-M) até piruvato, que é reduzido até ácido láctico pelo DFNH=DPNH, sob a ação da enzima desidrogenase láctica, segundo as reações:



O autor continua, que em geral, os estreptococos formam ácido L-láctico, e os lactobacilos ácido L-láctico, D-láctico e ácido racêmico.

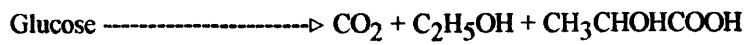
JAY (1978) indica também que os lactobacilos homofermentativos metabolizam preferencialmente a glucose para a produção de ácido láctico, mas se utilizarem pentoses, produzirão ácido acético e ácido láctico. Os homolácticos obtêm o duplo de energia a partir da glicose que os heterolácticos, segundo a reação:



O mesmo autor indica que todos os membros do gênero pediococos, estreptococos e alguns dos lactobacilos são homofermentadores e possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, carecem de fosfocetolase e usam a via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas.

### b) Fermentação heteroláctica.

Este tipo de fermentação, segundo MONTES (1977), é realizada principalmente pelo gênero leuconostoc e algumas espécies de lactobacilos, transformando o açúcar do meio em ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub>, ácido acético e manitol, enquanto que JAY (1978), indica que nesta fermentação as bactérias lácticas, partindo de hexoses, produzem quantidades iguais de lactato, CO<sub>2</sub> e etanol, segundo a seqüência:



Etanol      Ácido láctico

Segundo o mesmo autor, todos os Leuconostoc sp., e alguns Lactobacilos são heterofermentativos.

A figura 4. apresenta as bactérias homo e heterofermentadoras.

Homofermentadoras			Heterofermentadoras		
Organismos	Config. lactato	% G+C	Organismos	Config. lactato	% G+C
<i>Lactobacillus</i>			<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	DL	36,7	<i>L. brevis</i>	DL	42,7-46,4
<i>L. bulgaricus</i>	D(—)	50,3	<i>L. buchneri</i>	DL	44,8
<i>L. casei</i>	L(+)	46,4	<i>L. cellobiosus</i>	DL	53
<i>L. coryniformis</i>	DL	45	<i>L. confusus</i>	DL	44,5-45,0
<i>L. curvatus</i>	DL	43,9	<i>L. coprophilus</i>	DL	41,0
<i>L. delbrueckii</i>	D(—)	50	<i>L. fermentum</i>	DL	53,4
<i>L. helveticus</i>	DL	39,3	<i>L. hilgardii</i>	DL	40,3
<i>L. jugurti</i>	DL	36,5-39,0	<i>L. sanfrancisco</i>	DL	38,1-39,7
<i>L. jensenii</i>	D(—)	36,1	<i>L. trichodes</i>	DL	42,7
<i>L. lacticis</i>	D(—)	50,3	<i>L. viridescens</i>	DL	35,7-42,7
<i>L. leichmannii</i>	D(—)	50,8	<i>Leuconostoc</i>		
<i>L. plantarum</i>	DL	45	<i>L. cremoris</i>	D(—)	39-42
<i>L. salivarius</i>	L(+)	34,7	<i>L. dextranicum</i>	D(—)	38-39
<i>L. xylosus</i>	L(+)	39,4	<i>L. lactis</i>	D(—)	43-44
<i>Pediococcus</i>			<i>L. mesenteroides</i>	D(—)	39-42
<i>P. acidilactici</i>	DL	44,0	<i>L. oenos</i>	D(—)	39-40
<i>P. cerevisiae</i> <sup>1</sup>	DL		<i>L. paramesenteroides</i>	D(—)	38-39
<i>P. pentosaceus</i>	DL	38			
<i>Streptococcus</i>					
<i>S. bovis</i>	D(—)	38-42			
<i>S. cremoris</i>	D(—)	38-40			
<i>S. diacetilactis</i>	D(—)	35,1			
<i>S. Lactis</i>	D(—)	38,4-38,6			
<i>S. thermophilus</i>	D(—)	40			

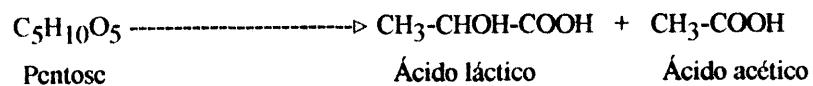
---

<sup>1</sup> *P. damnosus*

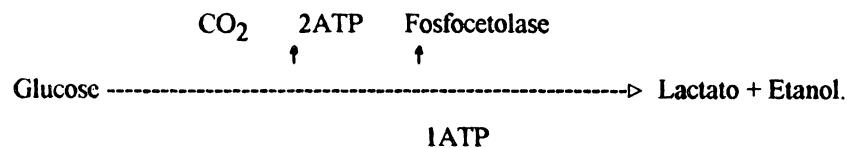
Fig. 4. Bactérias homofermentadoras e heterofermentadoras.

Fonte: JAY (1978).

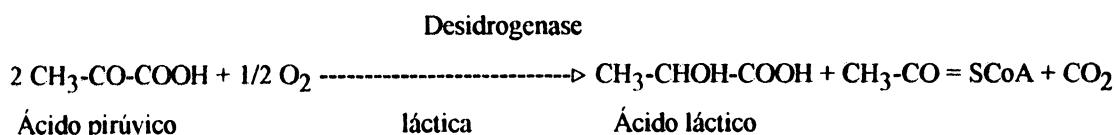
Algumas espécies homo e heterolácticas podem, segundo MONTES (1977), fermentar pentoses como xilose, arabinose e ribose, produzindo ácido láctico e acético, assim:



Os heterofermentativos, aponta JAY (1978), possuem fosfocetolase e carecem de Aldolase e hexose isomerase, utilizando a via monofosfato de hexosa e pentose em lugar da via E-M-P, para a degradação da glucose.



Segundo RHODES & FLETCHER (1969), em numerosos microrganismos, a descarboxilação oxidativa do piruvato, pode continuar incluso até em anaerobiose temporal. Assim sendo, o mesmo piruvato é o receptor de oxigênio em presença da deidrogenase láctica, para reoxidar o NADH<sub>2</sub> e converter uma molécula de ácido pirúvico em uma de acetil coenzima A por descarboxilação oxidativa; enquanto a outra molécula reduz-se a ácido láctico, assim:



Nesta reação participa o complexo alfa-hidroxietil-TPP ou acetaldeído ativo.

A formação de ácido láctico a partir de ácido pirúvico é uma reação reversível, mas se a glicólise for rápida, o equilíbrio inclina-se à produção de ácido láctico, deixando de ser adequado o método de reoxidação do NADH, falhando a descarboxilação oxidativa do piruvato. A figura 5. mostra o metabolismo do piruvato.

### 2.5.5. Produção de ácido láctico.

Segundo RHODES & FLETCHER (1969) e BARUFFALDI (1990), fungos e bactérias têm grande capacidade para produzir ácido láctico como principal produto da fermentação para uso industrial, como acidificação em salmouras, conservas e outros alimentos, indústrias do couro, tecidos e resinas na indústria de plásticos.

FRANKE et al., citado por SOCCOL, 1992, indica que a conversão da glucose em ácido láctico, nunca é de 100%. Uma conversão superior ao 80% é considerada homoláctica e uma menor conversão, mas formando além do ácido láctico, outros produtos como etanol, ácido fumárico, ácido acético e CO<sub>2</sub>, é chamada fermentação heteroláctica.

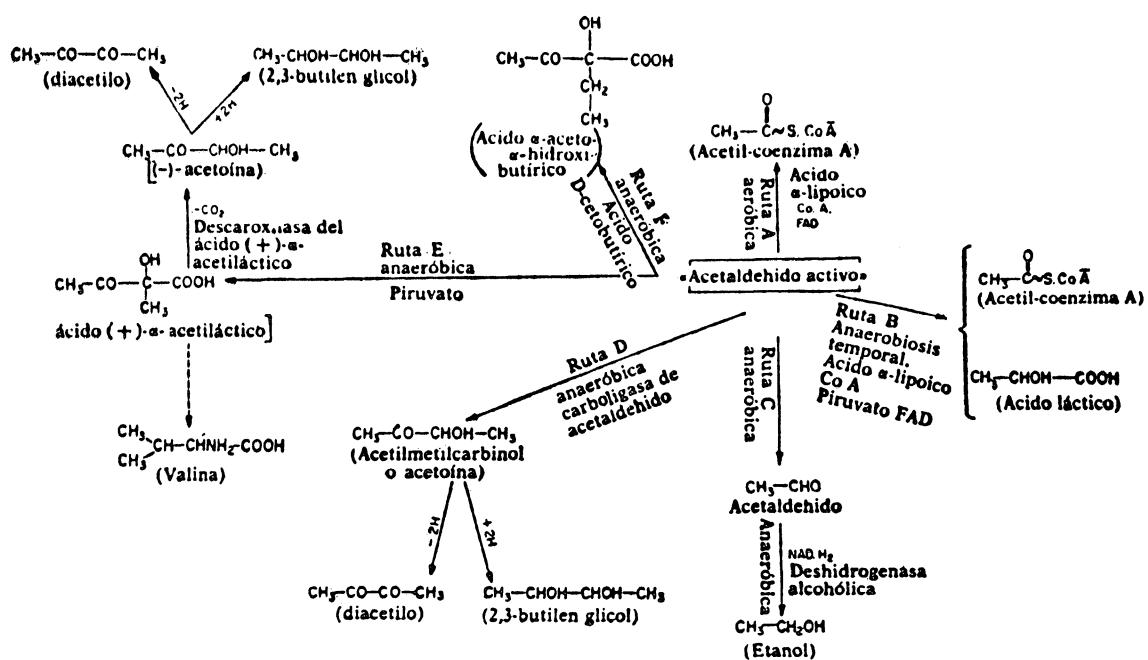


Figura 5. Vias do Metabolismo do Acetaldeído.

Os mesmos autores assinalam que o ácido láctico tem um carbono assimétrico e pode apresentar-se em duas formas com atividade ótica:



O isômero formado a partir do ácido pirúvico, depende da natureza da desidrogenase láctica presente no microrganismo utilizado. Assim, as bactérias homofermentativas e o fungo *R. oryzae*, contem a deshidrogenase do ácido L-láctico que produz ácido L-(+)láctico; e as bactérias heterofermentativas contêm a desidrogenase do ácido D-(-)láctico.

PRESOTT et al. e BUCHTA citados por SOCCOL (1992) indicam que o ácido láctico ou alfa-hidroxipropionico está amplamente distribuído na natureza, sendo produzido pelo homem, animais, plantas e microrganismos. A separação dos isomeros óticamente ativos a partir da forma racémica do ácido DL láctico, foi obtido pela primeira vez em 1890.

LOCKWOOD (1979) indica que a maioria das bactérias ácido lácticas produzem só um tipo de isômero, mas outras como o *L. plantarum*, produzem enzimas que convertem um isômero numa mistura dos dois, estas enzimas são chamadas de racemases, atualmente conhecidas como desidrogenases lácticas, que mantém um equilíbrio entre os isômeros do ácido láctico e o ácido pirúvico. A racemização acontece quando ambas as enzimas desidrogenases estão presentes.

Segundo ALAIS (1984) o *L. casei*, produz de 1,2 a 1,5% de ácido láctico do tipo L no leite e VEDAMUTHU (1982) indica que o *L. casei* é utilizado para produzir um tipo de leite ácidofilo, produzindo uma acidez de 2,7%

Nos últimos anos, o *Lactobacillus casei* é muito utilizado para produção de ácido láctico por fermentação como cita GOUQUIANG et al. (1991, 1992), com células imobilizadas em alginato e outras, em polietilenimina (PEI).

Assim, XAVIER & LONSANE (1994), utilizam cepas de *Lactobacillus casei* CFTRI 2022 para produção de altas concentrações de ácido láctico (5,27 g/100 g de cana de

açúcar) em fermentação em estado sólido, e VACARRI et al.(1993), utilizam a cepa DMS 20011 de *L. casei* para produção de ácido L(+)- láctico e posteriores aplicações biomédicas.

Num outro estudo, DEMIRCI et al.(1993), estudaram a combinação de lactobacilos (entre eles *L. casei* ATCC 11443) e bactérias formadoras de biofilmes em fermentação contínua, utilizando vários substratos para produção de ácido láctico e biofilmes.

#### **2.5.6. Produtos da fermentação láctica do leite.**

Existem numerosos produtos da fermentação láctica do leite, entre os quais estão:

**a) Iogurte.**

Para VEDAMUTHU (1982), o iogurte é o único, entre os vários produtos de leite com culturas lácticas. E também o único produto, no qual a presença de acetaldeído, em concentrações relativamente altas, é desejado como um componente essencial do "flavour". O iogurte, ganhou grande popularidade na Europa e nos Estados Unidos nos últimos 15 a 20 anos , mais ainda com a adição de frutas no produto.

O iogurte é o produto final de uma fermentação controlada de leite integral, com alto conteúdo de sólidos e uma mistura simbiótica de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, numa relação de 1:1 para obter um produto de alta qualidade.

A temperatura de fermentação varia de 35 °C a 45 °C, com uma temperatura media preferida de 40 °C. A maior quantidade de ácido láctico e acetaldeído necessários para o flavour característico do iogurte, é proporcionado pelos lactobacilos.O iogurte deve ser refrigerado quando o valor do pH é de 4,2 ou 4,3, para obter um produto de alta qualidade.

TAMINE & ROBINSON (199 ) e OLIVEIRA (1970) indicam que foi METCHNIKOFF (1910), que popularizou o consumo de iogurte, postulando que a ingestão de bactérias ácido-lácticas, prolongava a vida humana. Segundo os autores, a liberação de fatores estimulantes pelos cultivos "starter", acontece durante o período de incubação, sendo que o *L. bulgaricus* fornece nutrientes essenciais como aminoácidos para o *S. thermophilus*, que por sua vez produz compostos similares ao ácido fórmico que estimulam

o crescimento e o desenvolvimento do *L. bulgaricus*, resultando assim uma cultura simbiótica destes microorganismos.

Por outro lado, FERREIRA (1987), indica que o "starter" utilizado para produção de iogurte, está formado somente por *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, embora alguns autores sustentam que após a elaboração do produto, é agregado *L. acidophilus* durante o resfriamento.

#### b) Kefir.

O Kefir tradicional, segundo VEDAMUTHU (1982), é um antigo e histórico produto da região do Cáucaso na Rússia; sendo que o consumo anual per capita deste produto, é de mais de 2,0 kg. Os grãos de Kefir são gelatinosos, de cor branca ou creme, tamanho irregular e formados por polissacarídeos chamados kefiran. A flora tradicional destes grãos, consiste das leveduras *Saccharomyces kefir*, *Torula kefir* e certo *Lactobacillus caucasicus*, em associação com estreptococos lácticos e *Leuconostoc spp.*

KOSIKOWSKI (1977) cita ainda que as leveduras representam de 5 a 10% da população microbiana e freqüentemente as superfícies dos grãos de Kefir são recobertas pelo *Geotrichum candidum*, fato que aparentemente não diminui muito a qualidade do Kefir. O maior metabótico do Kefir é o ácido láctico em quase 0,8%, álcool etílico 1% e CO<sub>2</sub>. O sabor típico é devido à relação ótima de 3:1 de diacetil e acetaldeído e álcoois complexos com pequenas quantidades de acetona. Segundo KON (1972) os grãos de Kefir, são partículas essenciais recobertas de leite, que contém a população microbiana mista. A formação de álcoois no Kefir pode ser ainda maior que 1% e as proteínas são particularmente degradadas à proteoses e peptones, sendo que os grãos do Kefir são partículas essenciais, contendo a população microbiana mista, recobertas de leite.

#### c) Koumiss.

Autores como KON (1972) e VEDAMUTHU (1982), concordam em que o Koumiss foi originado nos planaltos da Rússia, na tribo dos Kumans, e pode ser tido como uma variedade do Kefir. O Koumiss, é uma bebida fermentada, amarga, de conteúdo alcoólico e

produzida com leite de égua, a qual não coagula no ponto isoelétrico da caseína do leite de vaca e contém mais caseína que este, pelo qual pode conter de 0,7 a 1,8% de ácido láctico e de 1,0 a 2,5% de etanol sem ser um produto coalhado.

Os organismos produtores do Koumiss são o *Lactobacillus bulgaricus* e leveduras tipo *Torula*, segundo KOSIKOWSKY (1977); mas atualmente, debido a falta de grandes quantidades de leite de égua utiliza-se leite de vaca e uma mistura de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Sacharomyces lactis*.

d) Leite acidófilo.

É produzido por fermentação com *L. acidophilus*, que segundo KOSIKOWSKY (1977) já começou a ser estudado apartirde 1900. Este bacilo pode implantar-se no intestino e suportar as severas condições existentes nele, e segundo HARDGROVE (1970), reemplazará as indesejaveis fermentações putrefactivas com a benéfica fermentação láctica.

OBERMAN (1985) ressalta que o leite contendo células viáveis de *L. acidophilus*, tem grande importância terapêutica , especialmente no controle das desordens intestinais. O *L. acidophilus* produz um leite ácido com só traços de subprodutos, uma acidez de 1% em ácido láctico. As condições de acidez produzidas por este bacilo no intestino humano, diminui o crescimento e proliferação de bactérias formadoras de gás e putrefação.O seu conteúdo de 1,5 a 2,0% de ácido láctico e seu sabor ácido, não fazem o produto muito consumido apesar de suas possibilidades terapêuticas no sistema digestivo, segundo indica KOSIKOWSKY (1977).

SPECK (1978) explica que em estudos iniciais, a predominância de *L. acidophilus* em amostras fecais, foi obtido pelo consumo de mais de 250 ml de leite acidófilo por dia, e este volume poderia conter  $10^{11}$  unidades de *L. acidophilus*. Depois, o autor desenvolveu um produto de leite ácidofilo utilizando leite semi desnatado, pasteurizado e inoculado com *L. acidophilus*, chamado SWEET ACIDOPHILUS-TM., contendo muitos milhões de bactérias/ml. Assim mesmo foi estudado o efeito antagônico destes bacilos contra salmonelas e estafilococos.

e) Yakult.

E um leite fermentado produzido no Japão e segundo SPECK (1978) é feito com leite magro, sem sólidos graxos, agentes adoçantes e cepas de *Lactobacillus casei* variedade Shirota, para obter a acidez desejada. O ácido láctico é o metabólito em maior quantidade, mas existem pequenas teores de ácido cítrico, succínico, málico e acético, assim como acetaldeído, diacetil e acetona.

OBERMAN (1985) também indica que é utilizado glucose e extrato de Chlorella. A fermentação dura aproximadamente 4 dias a 37 °C., alcançando uma acidez final de 2,7% pela ação do *Lactobacillus casei*. O incremento destes lactobacilos no intestino, segundo SPECK (1978), ocasiona uma diminuição de *Escherichia coli*, de outras bactérias patogênicas bem como a correção de desordens intestinais.

FERREIRA (1987) indica que o *Lactobacillus casei* tem um pH de crescimento ótimo de 6,8 e mínimo de 3,5 e coagula o leite após 48 horas. O Yakult é recomendado para reposicionar a flora intestinal em pacientes que fizeram uso prolongado de antibióticos e atualmente é um produto comercializado em quase todos os países.

Existem outros produtos fermentados com leite, como o Bulgarian Buttermilk, Leben, Dahi, Bioghurt, Biogarde e outros, mas de pouca importância, sendo os acima descritos os mais representativos.

#### **2.5.7. Utilização do extrato aquoso de soja (EAS), soro de leite e leite de vaca em produtos fermentados.**

A literatura é escassa no referente a produtos fermentados utilizando leite, soro de leite e EAS ou "leite de soja". Existem trabalhos, como os de NEIROTTI & OLIVEIRA (1988), na produção de iogurte, mas utilizando somente leite de vaca.

TULI et al. (1987) utilizam filtrado ou permeado de soro na produção de ácido láctico por imobilização de *Lactobacillus casei*, com uma conversão do 90% da lactose após de 48 horas de fermentação.

TRAN et al. (1992) estudam a diminuição do n-hexanal em leite de soja em pó, e citam que o uso do leite de soja é limitado pelo "flavour" característico que apresenta, pela presença de compostos voláteis de carbonil, ligados às proteínas da soja, particularmente o n-hexanal. Estes compostos são enzimaticamente derivados de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados. Os autores concluem que o uso de um inibidor mutante L-2-3, deficiente em lipoxigenase da soja e de um absorvedor de oxigênio são efetivos para diminuir o nível de n-hexanal em leite de soja em pó, promovendo o amplo uso da proteína de soja. O estudo é interessante mas não inclui fermentação.

Por outro lado, HESSELTINE & WANG (1992) observaram que freqüentemente o processo de fermentação melhora ou modifica o sabor e aroma dos subprodutos da soja. Eles inocularam leite de soja enriquecido com *L. bulgaricus* e incubaram de 37 a 43°C. durante 4 a 6 horas. O produto coagulado ou iogurte de leite de soja continha 9,8% de proteína, comparado com 3,4% da proteína do iogurte de vaca.

Em um outro trabalho similar, o leite de soja foi inoculado com *L. acidophilus* e logo após incubado durante 24 horas a 37 C., obteve-se um leite de soja fermentado, de bom sabor apesar a adição de açúcar e essência de baunilha. Outros autores, também evidenciam a necessidade de suplementar o leite de soja com açúcares.

Contudo, WANG & ASCHERI (1991), fermentaram leite de soja com e sem suplemento de carboidratos, utilizando lactobacilos e estreptococos isoladamente e com diferentes tempos de incubação. Ao final do processo, apenas os iogurtes preparados com leite de soja suplementado com 2% de sacarose e inoculados com *L. acidophilus* ou com *S. thermophilus* foram considerados os de melhor sabor.

Num outro trabalho, ROSSI (1983), estudando a produção de um produto similar ao iogurte, utilizou leite de vaca em pó, soro de leite em pó e extrato aquoso de soja, fermentou esta mistura com *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, e concluiu que é possível obter pelo processamento convencional, um produto fermentado similar ao iogurte, tendo o

produto aceitação satisfatória na análise sensorial. Ressalta também a necessidade de suplementar os cultivos com glucose ou sacarose.

Em estudos posteriores, ROSSI et al (1989) indicam que a modificação das culturas convencionais usadas no preparo e fermentação do iogurte à base de soja, não reduzem satisfatoriamente os níveis de oligossacarídeos destes produtos.

Também não fazem culturas associadas e/ou substituintes como *L. fermenti* e *L. acidophilus*, sendo que as reduções de oligossacarídeos verificadas, ocorreram nos produtos com cultura convencional e nos produtos substituídos.

ANGELES & MARTH, citados por SOUZA & OLIVEIRA (1988), indicam que existe uma elevada produção de ácido láctico pelo *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. casei* e *L. helveticus* no leite de soja suplementado com glicose, soro de leite em pó ou lactose. Mas declaram que os carboidratos presentes no leite de soja, ou são um fator limitante ou as culturas lácticas testadas não as utilizam completamente. Segundo MITAL et al, citado pelos mesmos autores, a produção de ácido láctico no leite de soja fermentado, poderia ser elevado por enriquecimento da matéria prima com carboidratos como sacarose, glucose ou lactose e pelo uso de culturas lácticas selecionadas.

KOBAYASHI et al.(1992) estudaram a eliminação do n-hexanal pela ação de microrganismos para melhorar o "flavor" das proteínas da soja; e trabalhando com soro de leite, JULIANO et al (1987) recuperaram as proteínas do soro por ultrafiltração para serem reutilizadas na produção de queijos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS.**

#### **3.1. Materiais.**

##### **3.1.1. Equipamentos.**

- Câmara de fluxo laminar TROX MDL FLV.
- Estufa bacteriológica FANEM, com termostato automático.
- Incubador "Shaker", MDL NT-710.
- Microscópio ótico monocular WILD MDL 11018, 1000 aumentos.
- Estufa SOC. FABBE para secagem de material até 100 °C.
- Balança semianalítica, SARTORIUS MDL 2116.
- Balança analítica, SARTORIUS carga máxima 100 g.
- Fermentador em estado líquido, MARUBISHI, MDL Chino, capacidade 8,0 l.
- Espectrofotômetro COLEMAN JUNIOR, MDL 6A.
- Espectrofotômetro SIEL, MDL. 200.
- Potenciômetro PROCYON, MDL PH N-4 (sv/mv/pH).
- Autoclave vertical de laboratório SOC. FABBE, MDL. 103.
- Microcomputador COMPAQ 386.
- Microscópio de Trasmissão de luz

##### **3.1.2. Reagentes.**

- Hidróxido de sódio P.A.,
- Fenolftaleína a 0.1%
- Ácido sulfúrico P.A., MERCK S.A.
- Albumina Bovina Serica PROTHERMO- São Paulo.
- Reativo de Folin Ciocalteau, da LABORCLIN
- Ácido láctico a 85%, da LABORCLIN.

### **3.1.3. Matérias primas.**

- Grãos secos de soja
- Extrato aquoso de soja, produzido no Laboratório de Processos Biotecnológicos.
- Soro de leite, procedente da Companhia de Laticínios de Curitiba (Clac).
- Leite de vaca desengordurado procedente da Parmalat S.A.

### 3.2. Métodos.

#### 3.2.1. Preparo do inóculo.

Foi utilizada uma cultura láctica de *Lactobacillus casei* LPB-93 liofilizada, que foi transferida e reativada em leite desengordurado e esterilizado a 121 °C., durante 15 minutos, após inoculado em caldo MRS para seguidamente ser conservada em agar MRS inclinado à temperatura de refrigeração de 4 +1 °C.

Paralelamente foi isolada uma cepa de *L. casei* do produto comercial denominado Yakult, acondicionada da mesma forma que a cepa anterior. Esta cepa apresentou boa qualidade e força nas fermentações, mas teve que ser deixada de lado pela dificuldade de identificação e codificação exata segundo as normas internacionais e a ATCC.

A cepa LPB-93 de *L. casei*, uma vez reativada, foi utilizada para produzir os pré-inóculos e inóculos para a fermentação.

Foram testados diferentes meios de cultura para Lactobacilos conforme GERALDINI et al. (1979), como o meio Elliker, Bacto Tomato Juice Agar 0031, M-17, e MRS (Bacto Lactobacilli MRS Broth- DIFCO), sendo que este último respondeu com maior eficácia, e a sua composição para 1,0 litro de meio, a seguinte: proteose peptona 10 g; extrato de carne 10 g; extrato de levedura 5 g; dextrose 20 g; Tween 80 1 g; citrato de amônio 2 g; acetato de sódio 5 g; sulfeto de magnésio 0,1 g; sulfeto de manganês 0,05 g; fosfato dissódico 2 g. O desenvolvimento do inóculo de *L. casei* no MRS caldo, foi estudado em referência a curva de crescimento, temperatura, pH, e biomassa produzida, cujos resultados são apresentados nas figuras 8 e 9.

Na figura 8, observa-se a curva de crescimento do *L. casei*, notando-se as fases de latência, transição, logarítmica, estacionária e de decrescimento são muito similares às curvas de crescimento apresentadas na literatura, e na figura 9, a variação da densidade ótica (D.O.).

Antes de ser feita a inoculação para a fermentação, a cultura foi submetida a um exame bacterioscópico, incluindo coloração de Gram, para verificar a pureza da cultura;

sendo também feita uma contagem de colônias em placas, expressando os resultados em log.(células/ml) de produto.

### 3.2.2. Preparo do meio de fermentação.

O meio de fermentação otimizado foi a mistura básica preparada com leite de vaca desnatado e estéril, soro de leite desproteinizado e extrato aquoso de soja ou "leite de soja" em proporções de 4:3,5:2,5, respectivamente. Esta relação foi estabelecida em base a numerosos ensaios preliminares, tendo em conta:

- A resposta mais favorável no crescimento e fermentação por ação do *L. casei*.
- A utilização intensiva do soro de leite no produto.
- A máxima utilização da proteína do extrato aquoso de soja (EAS) sem que esta interfira nas características reológicas e organolépticas do produto.
- A máxima utilização dos glucídeos do EAS, sem que estes e os outros componentes interfiram nas qualidades organoléticas do produto fermentado. A tabela 5 mostra a composição química teórica dos componentes da mistura a fermentar.

Tabela 5. Principais constituintes dos componentes da mistura a fermentar.

Constituintes %	Leite de vaca		Soro de leite		Leite de soja	
	Alais	Behmer	Alais	Spreer	Wang	Gomez
Água	90,50	87,50	93,50	94,50	93,00	89,60
Glucídios	4,90	4,60	4,00	4,00	0,84	1,40
Lipídios	3,50	3,60	0,10	--	2,43	2,46
Protídios	3,40	3,60	1,00	0,90	3,35	5,76
Cinzas	0,90	0,70	0,80	0,75	0,38	0,80
Extrato seco	12,70	12,50	--	5,50	7,00	10,40

(--): Valor não indicado.

A formulação do produto foi ajustada às características dos leites fermentados.

O meio de fermentação foi preparado em duas etapas: A primeira, para volumes de 200 ml a serem fermentados no incubador-agitado "Shaker", e a segunda, após a etapa anterior, para volumes de 2,0 e 6,5 l, a ser processado no fermentador líquido MARUBISHI.

### **3.2.3. Fotografia ótica de transmissão de luz.**

Foram fotografadas colônias de *Lactobacillus casei*, tanto em meio de cultura MRS, como no substrato a fermentar, utilizando um microscópio de transmissão de luz com um aumento de 1.000 vezes o tamanho original das bactérias. As amostras para as fotografias foram preparadas da mesma forma que para a coloração de Gram.

### **3.2.4. Produção de extrato aquoso de soja (EAS).**

O EAS foi obtido no laboratório de Processos Biotecnológicos, utilizando sementes secas e selecionadas de soja. Os grãos de soja foram deixados de molho durante 16 a 18 horas em água fria, depois descascados, moídos num liquidificador em proporção de 1 parte de soja para 10 partes de água (p/v), descontando a água absorvida pelos grãos, e adição de 2 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, o líquido, assim obtido, foi filtrado através de um filtro de flanela para reter os sólidos. Após, o EAS foi deodorizado na autoclave. O leite, assim obtido, foi armazenado na geladeira entre + 4 °C e -1 °C. Na figura 6 é apresentado o diagrama do processo.

### **3.2.5. Obtenção de soro de leite desproteinizado.**

Foi utilizado soro de leite tipo ácido, que foi desproteinizado aquecendo volumes determinados deste produto na autoclave de 80 a 100 °C durante 10 minutos. Neste processo as proteínas do soro coagulam e precipitam por efeito da deterioração pelo calor, obtendo-se duas fases, uma líquida e a outra, sólida. O filtrado é dessecado e a parte líquida é utilizada para a formulação do substrato a fermentar.

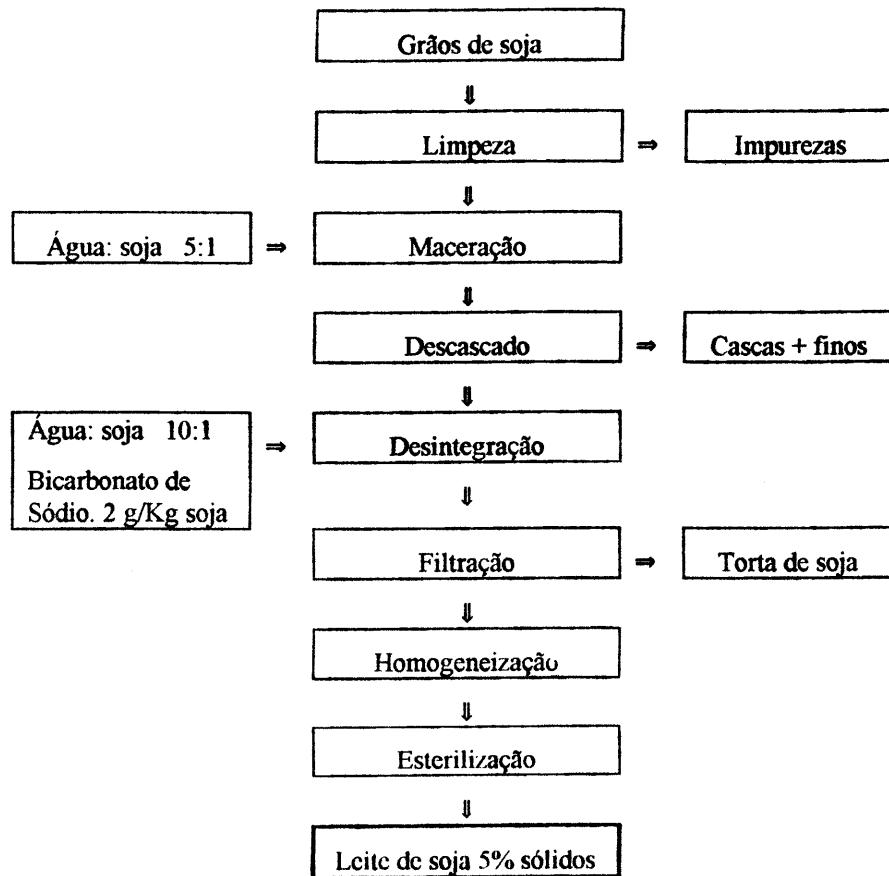


Figura 6. Diagrama de produção de leite de soja.

### 3.2.6. Obtenção da bebida láctea fermentada.

Inicialmente foram medidos os volumes adequados de leite de vaca, soro de leite e extrato aquoso de soja. O volume final de 2,0 l. foi obtido completando com água destilada.

A mistura foi homogeneizada mecanicamente durante dois minutos, determinado o valor do pH do meio e padronizado a pH 7,0 com NaOH 6,5N.

Depois, a mistura foi colocada no fermentador e o conjunto foi esterilizado na autoclave a 15 psi. durante 15 minutos. A seguir, o fermentador, contendo o meio, foi resfriado até 60 °C e depois até alcançar 37,5 °C., na controlador de fermentação, sendo então feita a inoculação em condições assépticas sob agitação lenta para incorporar o

mínimo possível de ar. Para manter condições anaeróbicas, foi extraído o ar do fermentador por succção mecânica.

A quantidade de inoculo de *L. casei* utilizado foi de 5% (v/v) em relação ao volume total. A fermentação foi realizada a 125 rpm, temperatura 37,5°C. Seguidamente foi coletada a primeira amostra do tempo zero, sendo que o pH inicial foi de 6,8+-0,2.

As amostragens foram feitas em intervalos de 3 em 3 horas para avaliar a densidade ótica (D.O.), unidades formadoras de colônia (UFC), e em intervalos de uma hora para medir o pH do meio. A fermentação continuou por tempo suficiente para atingir o pH 5,0 aproximadamente.

Finalmente, o produto fermentado assim obtido, foi transferido a recipientes estéreis de 1,0 l em condições assépticas. Depois de esfriar até 10°C foi armazenado à temperatura de refrigeração de 4+-1 °C. Na figura 7 é apresentado o diagrama de produção da bebida láctea fermentada.

### **3.2.7. Contagem padrão em placas.**

A contagem de unidades formadoras de colônias/ml (ufc/ml) do produto fermentado, foi realizada em intervalos de 3 horas, semeando diluições de  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  no caso das amostras da fermentação, e  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  no caso das amostras do inoculo.

As semeaduras foram feitas em placas de Petri utilizando a técnica "Pour plate" em agar MRS, incubadas a 37°C em estufa bacteriológica, durante 48 horas, após o qual, foi feita a contagem das colônias que cresceram, expressando os resultados como ufc/ml.

### **3.2.8. Determinação da densidade ótica.**

A densidade ótica (D.O.) foi determinada realizando-se leituras das absorbâncias das amostras no espectrofotômetro, a um comprimento de onda 650 nm.

As determinações foram feitas a intervalos de 3 horas, incluindo a amostra do tempo zero e do inóculo.

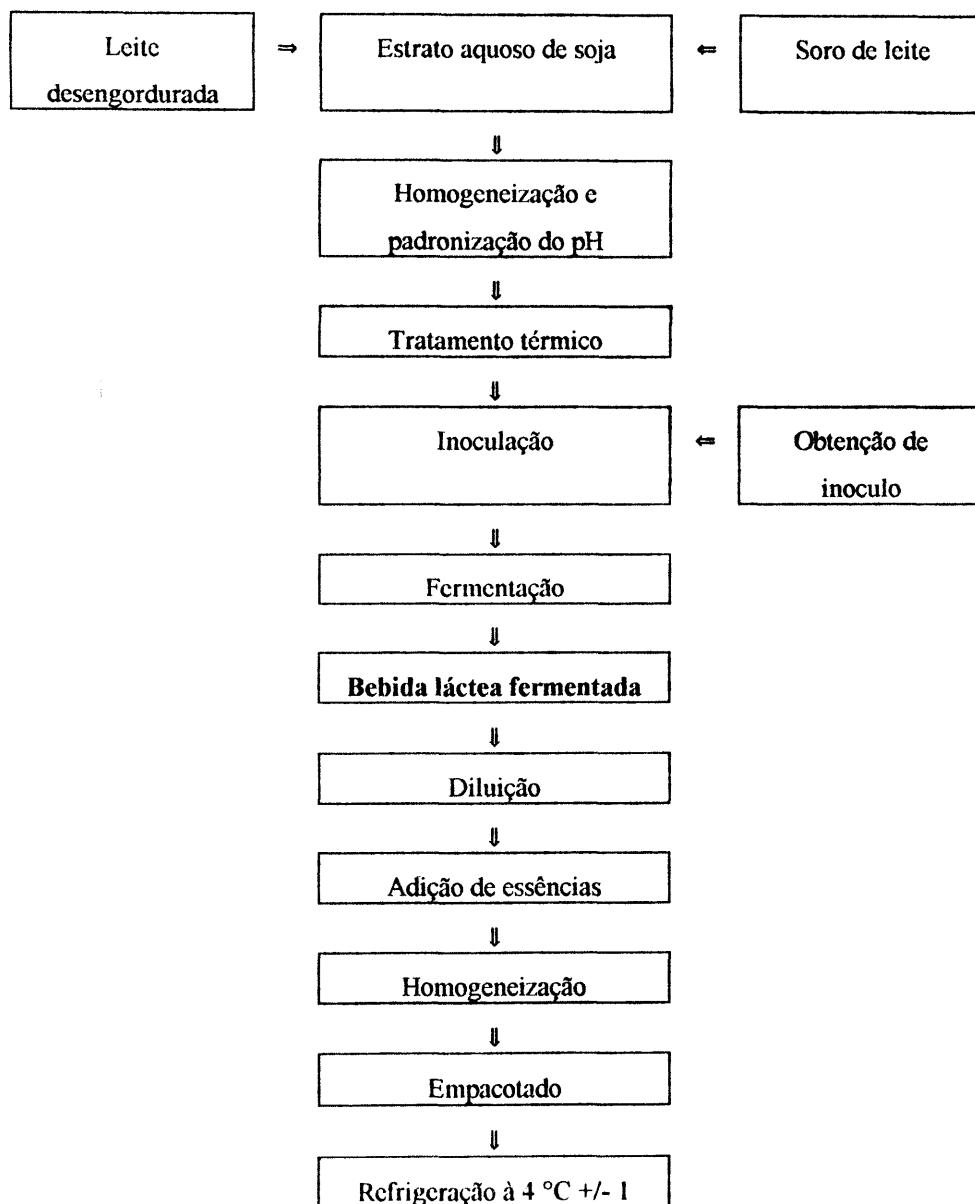


Figura 7. Diagrama de produção da bebida láctea Biofermentada.

### 3.2.9. Controle do pH.

O acompanhamento do incremento da acidez no processo fermentativo foi realizado através de leituras do pH em intervalos de 1 hora.

### **3.2.10. Determinação de açúcares totais.**

A determinação de açúcares totais foi realizada utilizando o método da reação ácida do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), no qual os monossacarídios, oligossacarídios, polissacarídios e seus derivados, incluindo metil éters, fornecem uma cor amarela-alaranjada quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado. A absorbância da cor característica, é medida a 490 nm no espectrofotômetro. A sensibilidade do método é de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

A curva padrão foi traçada utilizando glucose anidra para a solução a partir de 1.000 ug/ml.

### **3.2.11. Determinação de ácido láctico.**

A produção e incremento de ácido láctico foi preliminarmente determinado por titulação, utilizando solução de NaOH 0,1N e gotas de solução de fenolftaleína como indicador segundo método da AOAC (1990).

A determinação definitiva da produção de ácido láctico, foi realizada colorimetricamente segundo o método de LAWRENCE (1975), por conversão do lactato a acetaldeído por ação do ácido sulfúrico concentrado em presença de sulfato de cobre. O desenvolvimento da cor azul brilhante é medida no espectrofotômetro a 570 nm. A sensibilidade do método é de 5-10 ug de ácido láctico/ml. A sensibilidade do método é de 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de acido lactico.

### **3.2.12. Determinação de proteína.**

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Biureto (GORNAL et al., 1949), que dá reação positiva para proteínas e peptídeos de três ou mais aminoácidos; a partir das leituras de absorbância a 535 nm no espectrofotômetro. O padrão utilizado foi

uma solução de soro albumina bovina a 2,5 mg/ml. A sensibilidade do método é de 1 a 5 mg/ml de proteína.

### **3.2.13. Aromatização e coloração.**

Foi utilizada essência de baunilha até atingir níveis aceitáveis baseados em testes sensoriais prévios de aroma.

### **3.2.14. Controle microbiológico.**

O controle microbiológico do produto fermentado foi feito para determinar a existência dos principais contaminantes em alimentos, realizando-se semeadura, incubação e contagem nos meios específicos para bactérias mesófilas, coliformes totais (nmp) e fecais (nmp), *Escherichia coli*, bolores e leveduras, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* clostrídio sulfito redutor e pesquisa de *Salmonella* conforme indicam CARDOSO et al. (1989).

Estes controles foram realizados nos 2° e 20° dias de armazenamento do produto fermentado a temperatura de refrigeração de 4 °C+-1.

### **3.2.15. Análise sensorial.**

A análise sensorial foi realizada para estudar a aceitabilidade do produto pelos consumidores, utilizando-se questionários a serem preenchidos. Os provadores não foram treinados, foram selecionados ao acaso e o teste utilizado foi o da Escala Hedônica.

- Teste de Escala Hedônica. Foi realizado para avaliar as propriedades do produto como: aroma, sabor, aparência, textura e cor, utilizando-se uma escala de 1 = desgostei muitíssimo, até 9 = gostei muitíssimo.

A apresentação das amostras foi feita em copinhos codificados com 3 dígitos ao acaso e sem repetições, numa sala de avaliação sensorial, bem ventilada, iluminada e num horário entre as refeições como aconselha MORAES (1990). O modelo do questionário utilizado na avaliação sensorial, é apresentado no anexo.

Na analise estatistica dos ressultados do teste de escala Hedonica, se o valor de F calculado for igual ou maior ao da tabela, podera afirmar-se que existe diferencia significativa entre as amostras ao nivel de 1%, e nesse caso poderemos determina-la através do teste de média de Tukey.

### **3.2.16. Avaliação do tempo de prateleira.**

A avaliação do tempo de prateleira do produto foi estabelecida com amostras preliminares assim como com o produto acabado, armazenado na geladeira a temperatura de 4°C+-1, utilizando-se recipientes de vidro de 100 ml, 250 ml e 500 ml; e saquinhos de polietileno transparentes com um volume de produto de 100 ml e selados ao calor.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### 4.1. Preparo do inóculo.

O inóculo de *Lactobacillus casei* LPB-93 foi preparado em frascos contendo 100 ml. de caldo MRS, cultivado por 16 horas em incubador "Shaker", a 100 rpm, 37 °C e pH de 7,0; embora GOUQUIANG et al. (1991, 1992) utilizaram 42°C e 200 rpm, estamos mais de acordo com VACARRI et al (1993) que preparam os inóculos a 36°C e 120 rpm, assemelhando-se às nossas condições de trabalho.

A cultura pura de *Lactobacillus casei*, LPB-93, manipulada nas condições mencionadas em 3.2.1., apresentaram os resultados esperados de crescimento celular, diminuição do pH e densidade ótica, como se observa na figura 8.

Segundo GOUQUIANG et al (1991, 1992), o aumento da densidade ótica (D.O) é acompanhada por um leve incremento de unidades formadoras de colônias por ml (ufc/ml) nas primeiras 6 horas de cultura constante, mas entre 6 e 18 horas ocorre um rápido crescimento, que permanece constante até 24 horas de fermentação.

Verificou-se também uma diminuição constante e quase linear do pH entre 0 e 15 horas de cultura evidenciada por uma produção constante de ácido láctico. Na figura 8 observa-se igualmente que o máximo crescimento celular, em "Shaker", foi obtido ao longo das primeiras 16 horas de fermentação, a 37°C., e 100 RPM.

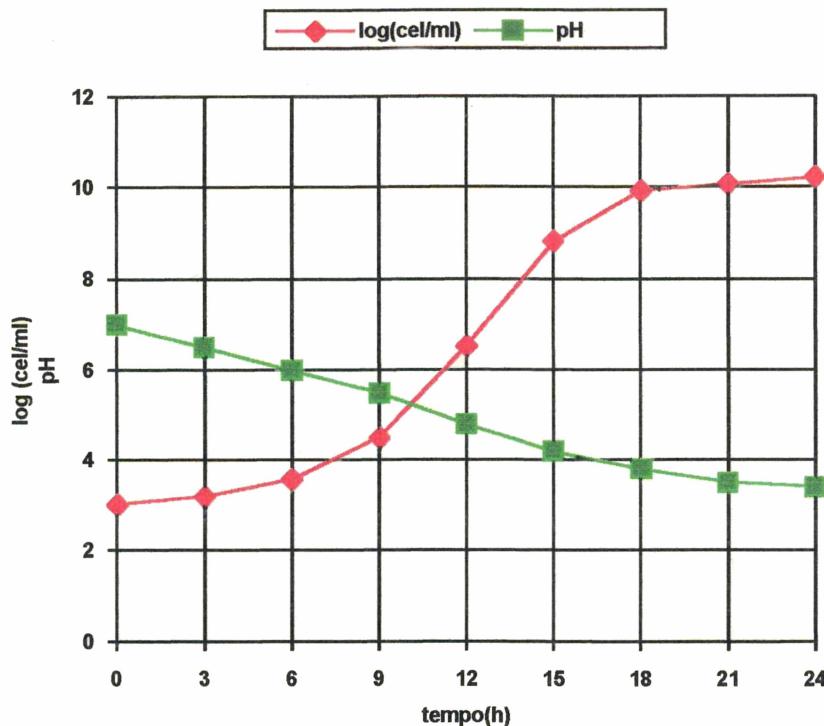


Figura 8. Curva de crescimento e variação do pH de *Lactobacillus casei* em caldo-MRS.

A figura 9 mostra a evolução da densidade ótica (D.O.) da cultura pura de *Lactobacillus casei* em caldo MRS, determinada através da absorbância a um comprimento de onda de 650 nm., incubada em "Shaker", a 37°C. e 100 RPM.

Nesta figura observa-se que o crescimento da cultura segue uma curva típica; nas primeiras 6 horas, praticamente não ocorreu crescimento, evidenciando uma fase de adaptação das células ao novo meio, assim como às condições da cultura, embora WANG & ASCHERI (1991), trabalhando com *L. acidophilus* em fermentação de leite de soja, para produzir iogurte de soja, mostrem que o crescimento da população foi máximo nas primeiras 12 horas de fermentação.

Entre às 6 e às 18 horas, observa-se uma fase de crescimento significativo caracterizado por um importante aumento nos valores da D.O.. Após esse período, observa-se uma ligeira fase de estabilização, seguida de uma leve redução da D.O.

Essa estabilização deve-se provavelmente ao aumento de acidez no meio, associada à redução na concentração dos nutrientes presentes, e segundo GOUQUIANG et al.(1991), também é produzido pelo efeito inibitório do ácido láctico sobre a utilização da glucose.

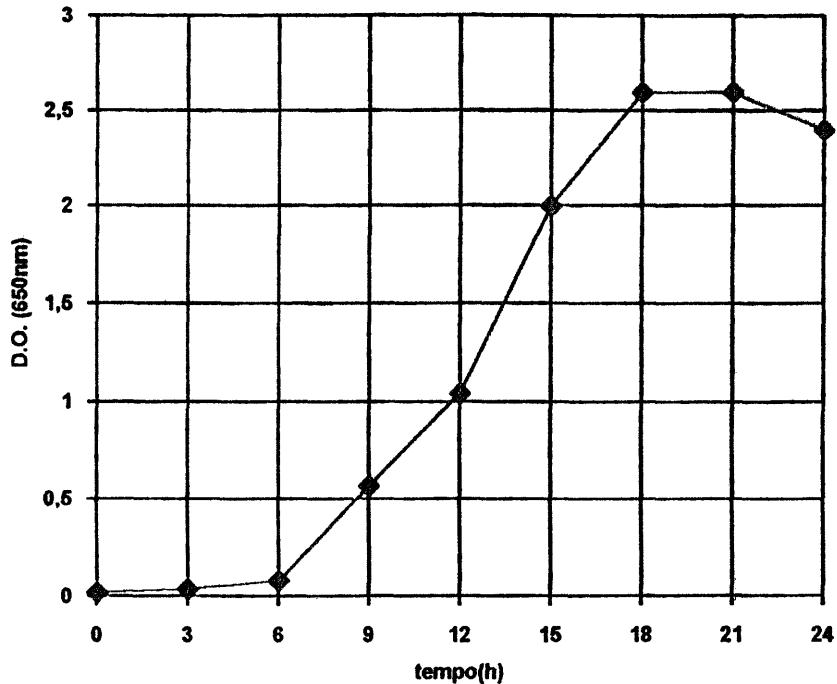


Figura 9. Variação da D.O. da cultura de *Lactobacillus casei* em caldo MRS.

Constatou-se que a cultura de *Lactobacillus casei* tem boa resistência à estocagem e repicagem. As figuras 10 e 11 mostram microfotografias da cultura de *Lactobacillus casei* LPB-93 utilizada neste estudo. Observa-se que são bactérias Gram (+), em forma de bastonetes curtos de extremos retos, com  $0,4 \mu\text{m}$  de largura e menos de  $1,5 \mu\text{m}$  de comprimento, concordando com a 8<sup>a</sup> edição do Manual de Bergey. Verifica-se também, que os lactobacilos tem tendência a formar cadeias de 4, 6, 8, 10 ou mais células, agrupando-se também em grupos compactos até formar colônias de cor branca, geralmente circulares e de aproximadamente 1 mm de diâmetro.

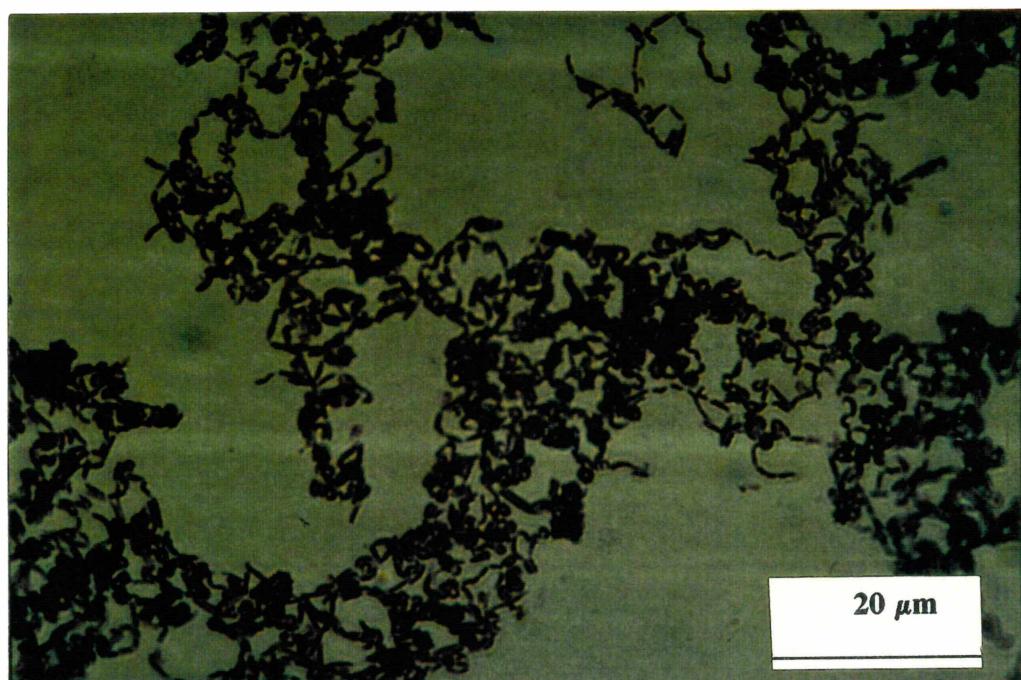


Fig. 10. Microfotografia de transmissão de luz de colônias de *Lactobacillus casei*, em caldo-MRS. (x 1.000 aumentos).

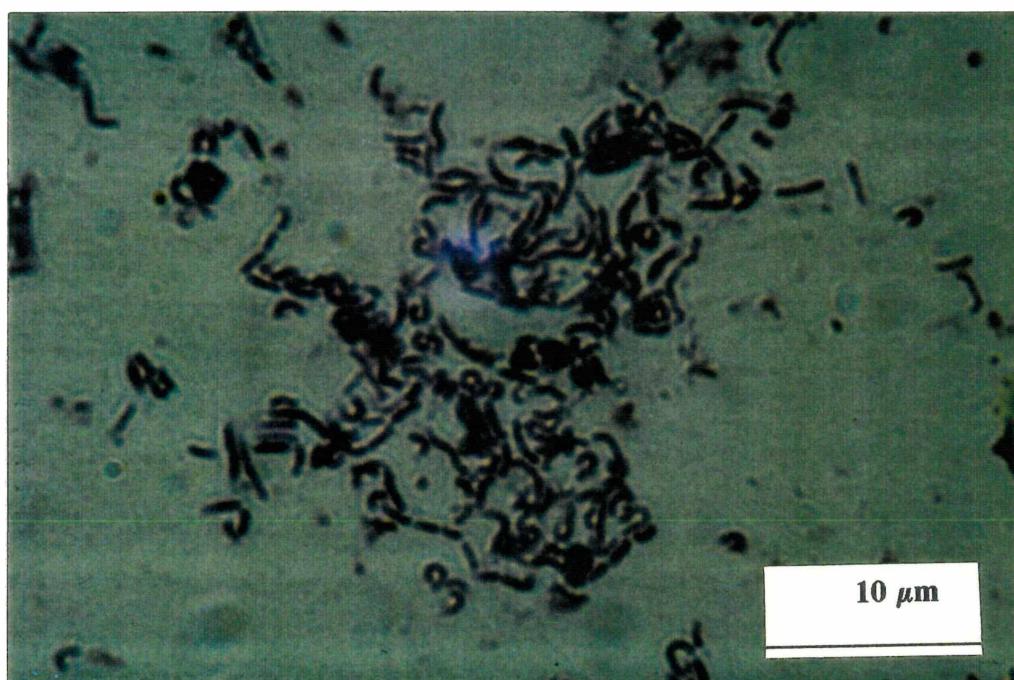


Fig. 11. Microfotografia de transmissão de luz de cultura de *Lactobacillus casei* em meio de fermentação diluído. (x 1.000 aumentos).

#### **4.2. Obtenção da bebida láctea fermentada.**

##### **4.2.1. Composição físico-químico dos diferentes componentes utilizados na elaboração da bebida láctea fermentada.**

A composição físico-químico dos componentes utilizados, apresenta-se na tabela seguinte:

**Tabela 6. Determinações físico-químicas dos diferentes componentes utilizados na bebida láctea antes da fermentação.**

Componentes (%)	Leite de vaca desnatado.	Soro de leite desproteinizado.	Leite de soja.
Umidade	91,59	95,13	92,16
Glicídios	4,29	3,58	1,42
Protídios	3,02	0,46	3,80
Lipídios	0,05	0,09	2,40
Cinzas	1,04	0,74	0,21
Extrato seco	8,40	4,87	7,83

Na tabela 6 observa-se que o leite desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja contêm quantidades próximas de umidade , mas diferem significativamente na concentração de glicídios, apresentando o leite de vaca teor mais elevado de lactose ou "açúcar do leite". Esses dados confirmam os obtidos por ALAIS (1984) e BEHMER (1975) que são de 4,9 e 4,6% respectivamente.

O soro desproteinizado apresenta valores de açúcar menores que os apresentados na tabela 5, mas o leite de soja por nós utilizado, apresenta valor similar ao indicado nesta tabela, especialmente ao teor considerado por GOMEZ (1988); mas é superior aos 0,84% obtido por WANG & ASCHERI (1991), talvez porque estes autores obtiveram o teor de açúcar por cálculos matemáticos.

A concentração em proteínas do leite desnatado, é inferior a do leite integral e a do soro desproteinizado, e cerca de 50% inferior a do soro integral. Essa diferença é resultado da desproteinização realizada para evitar a precipitação das proteínas durante a esterilização da mistura de leite, soro de leite e leite de soja.

Dos substratos utilizados na formulação da bebida, o leite de soja é o componente que apresenta a maior concentração em proteínas 3,8%, cerca de 50% da concentração de sólidos. Esses valores elevados estão relacionados diretamente as proteínas presentes no grão (40-45%). Os teores de proteína no leite de soja, por nos encontrado, são próximos aos obtidos por WANG & ASCHERI (1991) porém inferiores aos de GOMEZ (1988).

A concentração de lipídios no leite desnatado e no soro de leite desproteinizado, é inferior a 0,1% em razão do processo de desnatamento do leite e porque o soro deixou quase a totalidade de lipídios na produção do queijo, que segundo ALAIS (1984), contém até 92% dos lipídios do leite de vaca, segundo os tipos de queijos produzidos.

O conteúdo de cinzas é maior para o leite, menor para o soro e de baixa quantidade para o leite de soja. A quantidade de extrato seco reflete as concentrações de glicídios, protídios e lipídios.

#### **4.2.2. Fermentação em "Shaker".**

A fermentação da bebida láctea, foi conduzida preliminarmente em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 ml, contendo 200 ml de uma mistura de leite de vaca desnatado, soro de leite desproteinizado e extrato aquoso de soja (EAS) ou "leite de soja".

Cinco diferentes formulações foram realizadas utilizando os três componentes básicos (leite desnatado, soro de leite e extrato aquoso de soja). Dentro das formulações propostas de A a E, procuramos reduzir a concentração de leite desnatado, aumentando as concentrações de soro desproteinizado e extrato aquoso de soja como se observa na tabela 7.

Nosso objetivo foi o de utilizar concentrações crescentes de soro de leite desproteinizado, assim como extrato aquoso de soja, visando reduzir os custos da bebida, bem como dar destino aos grandes volumes de soro gerado diariamente pelos laticínios e como indica SORBA et al.(1993), o soro de leite é um resíduo de grande poder contaminante, mas que poderá ser transformado em outro produto de valor comercial sem liberar resíduo.

O crescimento do *Lactobacillus casei*, foi avaliado através da evolução da D.O., produção de ácido láctico e redução do pH.

Tabela 7. Formulações com leite, extrato aquoso de soja e soro de leite desproteinizado.

Substancias (%)	Formulações				
	A	B	C	D	E
Leite desnatado	50	40	40	30	30
Soro desproteinizado	20	30	35	35	40
Extrato aquoso de soja	30	30	25	35	30

**A:** 50% leite desnatado + 20% soro de leite desproteinizado + 20% extrato aquoso de soja.

**B:** 40% leite desnatado + 30% soro de leite desproteinizado + 30% extrato aquoso de soja.

**C:** 40% leite desnatado + 35% soro de leite desproteinizado + 25% extrato aquoso de soja.

**D:** 30% leite desnatado + 35% soro de leite desproteinizado + 35% extrato aquoso de soja.

**E:** 30% leite desnatado + 40% soro de leite desproteinizado + 30% extrato aquoso de soja.

As diferentes amostras, foram fermentadas em "Shaker", em frascos de 500 ml contendo 200 ml de produto, a 37 °C e 100 rpm com um pH inicial de 7,0 e um volume de inoculo de *L. casei* de 10 ml para cada frasco contendo  $10^{10}$  células viáveis/ml.

As figuras 12, 13 e 14, mostram a evolução da D.O., Log.(nº cel/ml) e pH da cultura de *Lactobacillus casei*, nas diferentes formulações.

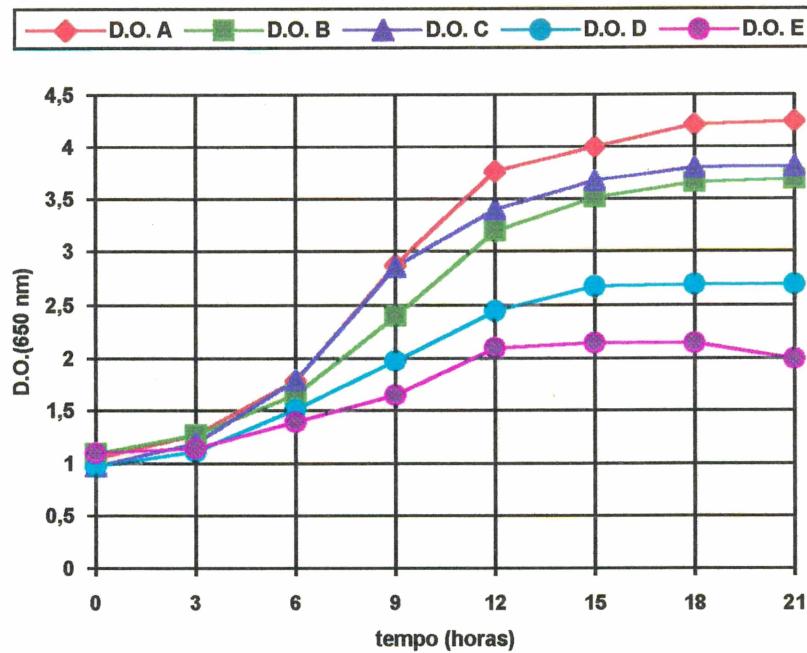


Figura 12. Evolução da densidade ótica (D.O.) durante a fermentação para as diferentes formulações.

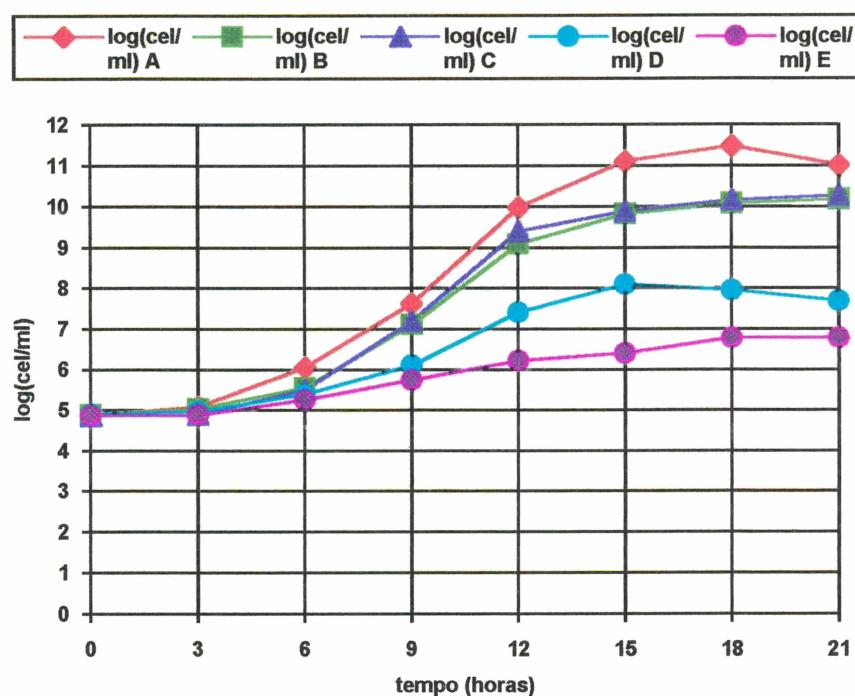


Fig.13. Evolução do log.(nº cel/ml) do crescimento bacilar para as diferentes formulações fermentadas.

Estas figuras demonstram que a formulação A apresenta um maior crescimento de biomassa avaliado através da D.O. e contagem celular quando comparadas às demais formulações. Até as primeiras 6 horas de fermentação o crescimento é similar às demais formulações, mas a partir desse tempo ocorre uma fase exponencial rápida e quase linear que perdura até 12 horas, seguido de uma redução de crescimento até 16 horas e uma fase de cultura estacionária quase linear que se mantém até o final da fermentação.

A formulação B mantém a mesma tendência de crescimento que a formulação A, mas o crescimento é menor entre às 6 e 16 horas, verificando-se um crescimento constante das 6 às 12 horas. Entre as 12 horas e o final da fermentação, o crescimento continua, mas em grau de inclinação menor que o da curva A.

Com relação a formulação C, observa-se que embora experimente um crescimento similar ao da curva A até as 9 horas, a partir deste tempo até o final do processo, o crescimento é menor do que o da curva A, mas superior ao da curva B.

A formulação D experimenta, nas primeiras 6 horas, crescimento similar às demais curvas, no entanto seu crescimento permanece inferior até 12 horas, quando comparada às formulações anteriores. Processo similar ocorre com a formulação E, que apresentou um crescimento lento entre 3 e 9 horas, com ligeiro incremento entre 9 e 12 horas, mas com uma fase estacionária a partir de 12 h até o final da fermentação, caracterizando-se como a fase estacionária mais longa de todas.

Observou-se que elevando-se a concentração de leite de soja na mistura fermentada, tem-se uma maior tendência à precipitação e aparecimento do sabor de feijão na bebida láctica fermentada.

A figura 14 mostra as variações do pH para cada uma das formulações experimentadas.

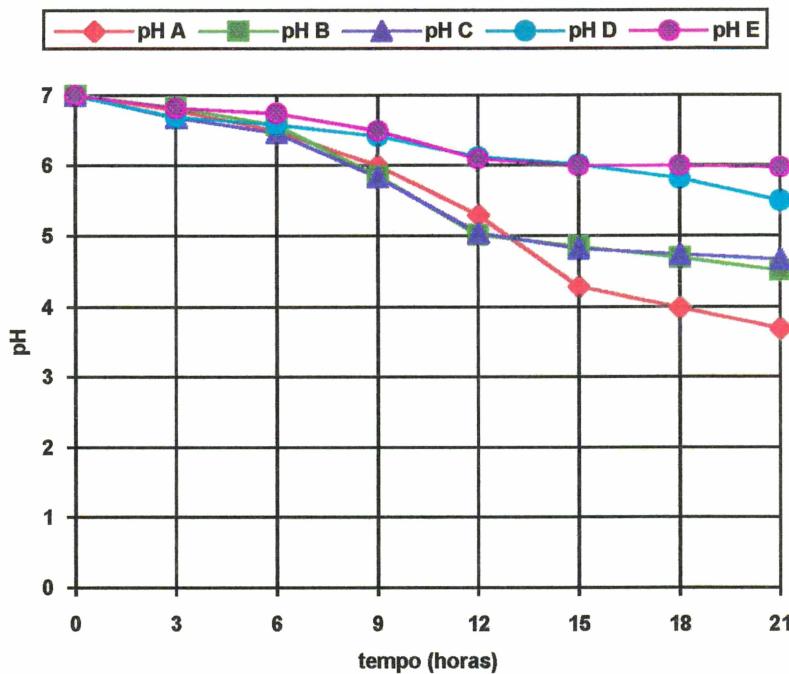


Fig. 14. Evolução do pH das diferentes formulações.

A figura 14 mostra a evolução do pH durante a fermentação das diferentes amostras. O pH da formulação A diminui lentamente até as primeiras 6 horas de cultura. Após esse período e até 15 horas, a acidificação é mais acentuada e quase linear, estando essa redução de pH associada à fase exponencial do crescimento celular onde existe maior acidificação do meio pela maior produção de ácido láctico. Das 15 h até o final do processo fermentativo, o pH continua diminuindo até atingir um valor de 3,7. Esta última etapa, corresponde à fase estacionária da curva de crescimento.

O controle de pH é um fator extremamente importante na obtenção da bebida láctea fermentada, pois um pH inferior a 4,4 induz a formação de partículas de precipitado na bebida láctea fermentada, que formam-se provavelmente devido à rápida acidificação do meio e a presença de proteínas de diferentes origens, com pesos moleculares heterogêneos, influindo nas características organolépticas e na aparência do produto final.

O pH das formulações B e C apresentaram tendências similares nas primeiras 12 horas e diminuição mais lenta após esse período, mas a partir deste ponto, experimentam ligeira

diminuição sem atingir valores inferiores a 4,5, onde experimentalmente observa-se o fenômeno de precipitação das partículas. O valor de pH das 15 às 21 horas de fermentação são mais estáveis e não produzem precipitado, embora a experiência demonstre que se deve finalizar a fermentação entre as 16 e 18 horas, quando o pH está por volta de 4,8.

As formulações D e E não experimentam variações apreciáveis de pH e até apresentam tendência linear, especialmente a partir das 12 horas de fermentação. Observamos tal fenômeno em maior grau na formulação E. Este pH mais elevado parece ser devido à falta de produção de ácido láctico devido a ausência de açúcares facilmente metabolizáveis como glucose, lactose e a dificuldade de fracionar os oligossacarídos da soja, observando-se assim, que existe pouca produção de biomassa e por conseguinte pouca produção de ácido láctico, sem gerar um bom produto fermentado.

Desta forma, consideramos conveniente tomar como base as formulações B e C como sendo as mais recomendáveis para os estudos posteriores. A figura 15 apresenta a evolução da D.O. e pH das formulações B e C.

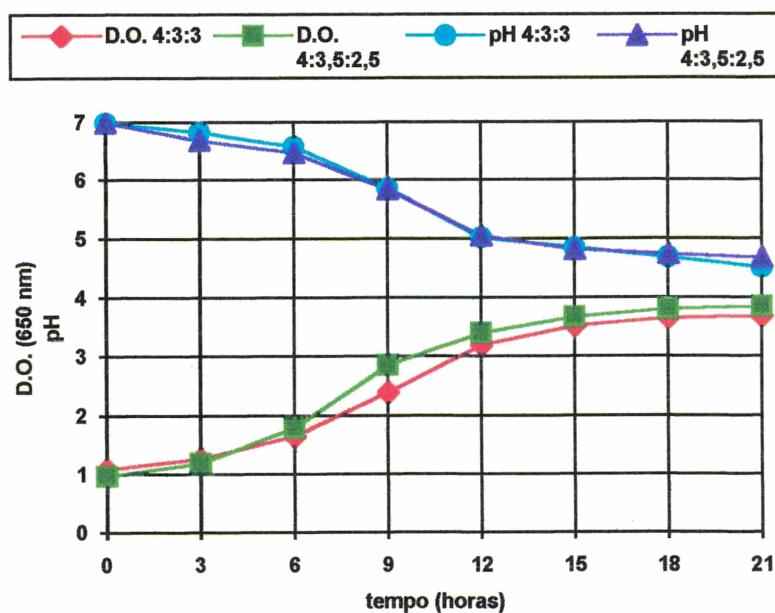


Fig. 15. Evolução comparativa dos valores de D.O. e pH das formulações B e C.

Observa-se uma semelhança na evolução da D.O., com pouca diferença nas primeiras 12 horas de fermentação, que tende a estabilização por volta de 15 horas, mantendo-se assim até o fim da fermentação. Por sua vez, os valores do pH não experimentam variação apreciável, confundindo-se até em alguns pontos da curva, atingindo valor ligeiramente inferior a pH 5 após 15 horas de fermentação.

Com base em tais estudos e visando igualmente uma maior utilização de soro de leite, pois tal substrato é um resíduo produzido em grandes volumes pelos laticínios, e que um incremento de 5% desta substância não influiu apreciavelmente nas características organolépticas da bebida láctea fermentada, optou-se por utilizar a formulação C, composta por 40% de leite de vaca desnatada, 35% de soro de leite desproteinizado e 25% de leite de soja, como formulação ideal para os próximos estudos.

A figura 16 apresenta a evolução de diferentes parâmetros (açúcares totais, ácido láctico, proteínas e D.O.) da mistura C, contendo 40% de leite desnatado, 35% de soro de leite desproteinizado e 25% de leite de soja, fermentada em incubador de tipo "Shaker".

Observa-se que a produção de ácido láctico evoluiu de forma crescente durante todo o período de fermentação, sendo que sua produção é incrementada significativamente após 12 horas. A concentração inicial de ácido láctico passa de 0,25 g/100 ml no início da fermentação a cerca de 1,18 g/ 100 ml ao final de fermentação.

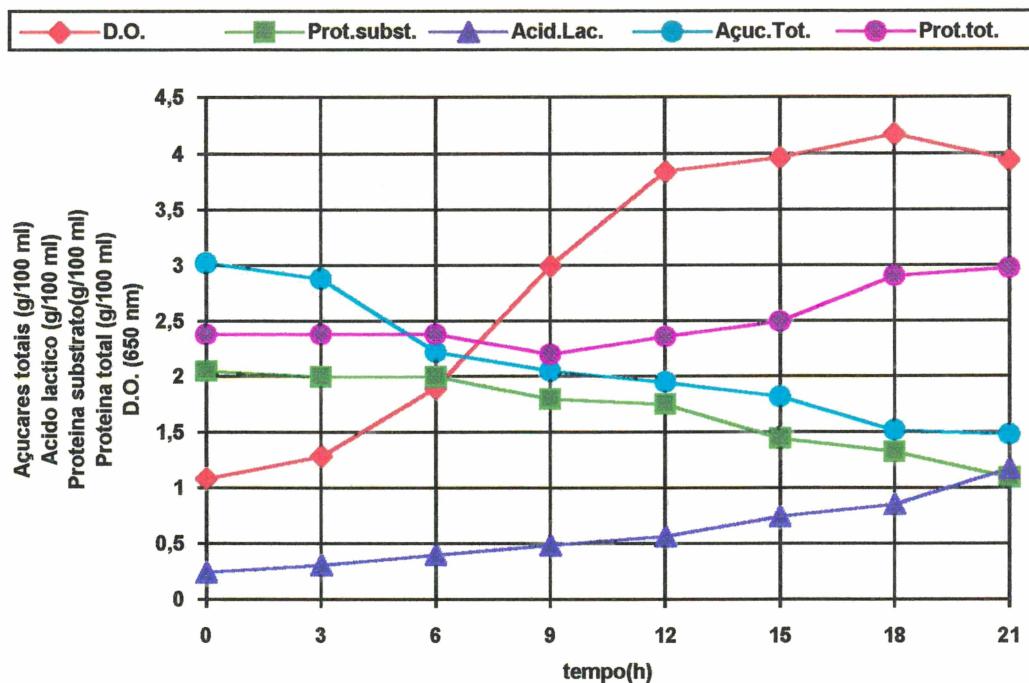


Fig. 16. Evolução dos diferentes parâmetros da fermentação em Shaker, formulação C.

O controle da concentração final de ácido láctico na bebida é um fator muito importante, pois uma fermentação muito prolongada ou de um tempo superior a 21 horas, poderá aumentar em muito a concentração de ácido láctico, acentuando significativamente o sabor ácido e a rejeição do produto pelos consumidores. Além da alteração das propriedades organolépticas, o excesso de ácido láctico poderá elevar de tal forma a acidez do produto final, que induzirá à coagulação das proteínas presentes no produto, provocando a separação das fases sólido e líquido, e levando em conta que, segundo ALAIS (1984), as proteínas do leite precipitam a um pH próximo a 4,6, deve-se tomar cuidado para não deixar que a fermentação atinja valores de pH inferior a 4,6.

Por outro lado, observa-se também que o maior consumo de açúcares ocorre nas primeiras 9 horas de fermentação, mostrando que durante esse mesmo período, acontece uma elevação importante da D.O., embora a evolução linear ocorra entre 6 e 12 horas.

A figura 16, mostra ainda que a síntese de ácido láctico, esta parcialmente associada ao crescimento, pois somente evolui significativamente após 12 horas de fermentação. Nesta

figura, observa-se igualmente a redução na concentração das proteínas na mistura inicial (leite desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja), determinadas no sobrenadante, após a centrifugação da biomassa celular que variou de 2,05 g/100 ml, no início da fermentação à 1,10 g/ 100 ml ao final da fermentação.

#### 4.2.3. Fermentação em Bioreator.

O processo de fermentação foi realizado em um Bioreator MARUBISHI de 8,0 l de volume total. Utilizou-se 325 ml de inoculo de *Lactobacillus casei* LPB 93, cultivado em meio caldo-MRS, para um volume de trabalho de 6,5 l. utilizando como substrato a formulação C, previamente otimizada em "Shaker" segundo o item 4.2.2. e composta por 40% de leite de vaca desnatado, 35% de soro de leite desproteinizado e 25% de leite de soja. A temperatura de fermentação foi de 37,5 °C. Inicialmente avaliamos o efeito da rotação na biofermentação do composto lácteo, como observa-se na figura 17.

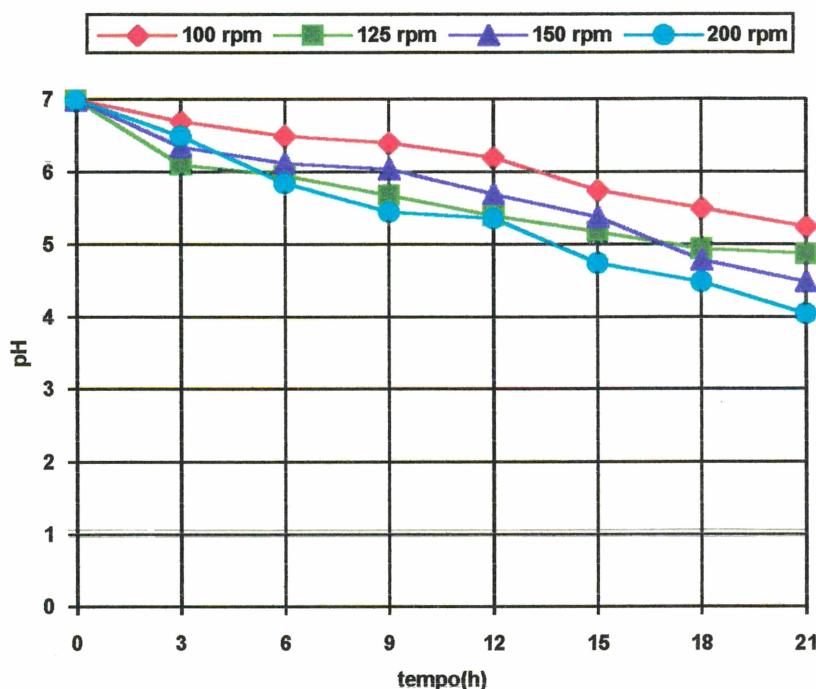


Fig. 17. Evolução dos valores de pH nas diferentes rotações, a 37,5 °C na biofermentação do composto lácteo em bioreactor MARUBISHI de 8,0 l.

Na figura 17, observa-se que a rotação de 100 rpm., produz uma diminuição lenta do pH até as primeiras horas, sendo que essa redução acentua-se entre 9 e 15 horas, mas sem atingir uma acidificação adequada do produto. Entre 15 horas até o final da fermentação, novamente se produz uma redução de pH, atingindo valores de 5,25.

Na rotação de 125 rpm, ocorre maior acidificação nas primeiras 3 horas, após ocorre uma diminuição de forma quase linear até 18 horas. Esta diminuição lenta e contínua do pH reflete-se na produção constante e crescente de ácido láctico, fermentação constante que permite a obtenção da bebida láctea fermentada de bom aspecto, aroma e sabor, permitindo também o controle da variação de acidez.

Na rotação de 150 rpm, experimenta variação similar a de 125 rpm nas primeiras 9 horas, começando após a diminuir com maior intensidade, provocando precipitação de parte das proteínas a partir das 15 horas de fermentação. Já a rotação de 200 rpm, produz a precipitação entre as 12 e 15 horas de fermentação. Desta forma, com base à resposta do pH à diferentes níveis de agitação testados, achamos conveniente utilizar uma velocidade de rotação de 125 rpm, por apresentar uma acidificação suficiente para obter um produto com o sabor, aroma e aparência mais aceitáveis e sem a presença de precipitado precoce ou seja entre as 12 e 18 horas de fermentação.

Com base em dados de otimização obtidos em "Shaker" e Bioreator de 8 l., procedeu-se a uma fermentação utilizando-se 6,5 l. da mistura contendo 40% de leite de vaca desnatado, 35% de soro de leite desproteinizado e 25% de leite de soja. Essa mistura foi inoculada com 325 ml de uma cultura de *Lactobacillus casei* LPB 93, contendo  $10^{10}$  células viáveis/ml. A fermentação foi conduzida a 37,5°C e uma agitação de 125 rpm. A evolução das diferentes variáveis acompanhadas durante a biofermentação da bebida láctea, observa-se nas figuras 18 e 19.

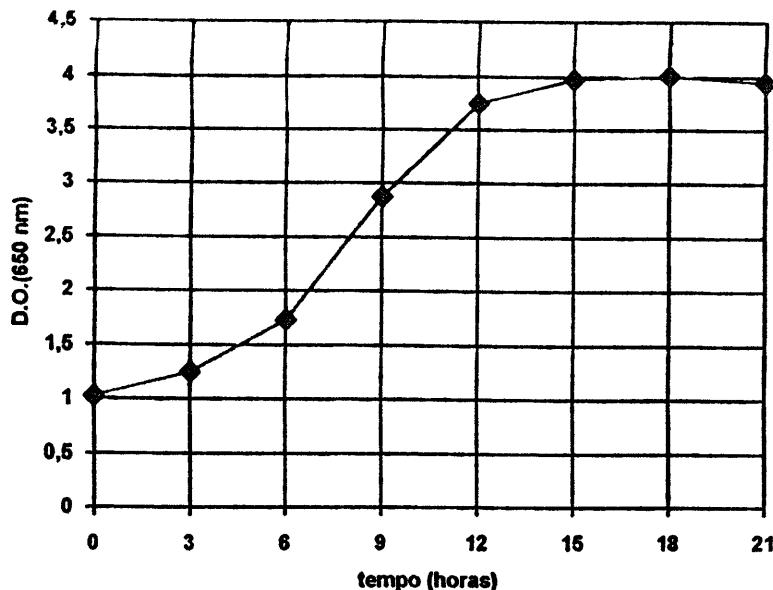


Fig. 18. Evolução da D.O. da fermentação em bioreator MARUBISHI-8 l a temperatura de 37,5°C e agitação de 125 rpm.

Como foi indicado anteriormente, e segundo os nossos resultados, concordamos mais com VACARRI et al.(1993) que utiliza *L. casei* para produzir ácido láctico por fermentação a 36°C e 120 rpm.

A figura 18, mostra uma evolução lenta da biomassa nas primeiras 6 horas de fermentação, entre as 6 e as 12 horas, existe um crescimento exponencial pronunciado, sendo que entre 12 e 21 horas o crescimento do *L. casei* LPB-93 entra numa fase estacionária de crescimento.

A figura 19, mostra o comportamento do pH e a biomassa celular.

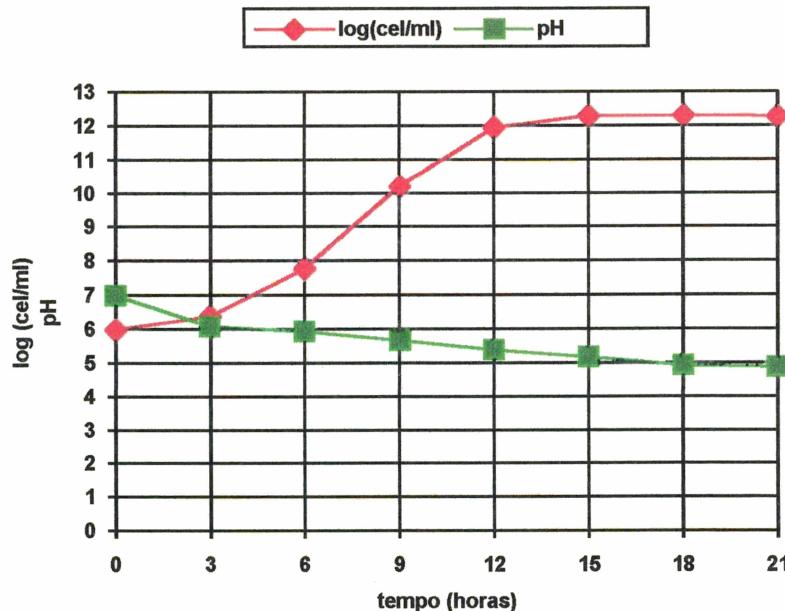


Fig. 19. Evolução do pH e população bacteriana na fermentação em bioreator a 125 rpm e 37,5 °C.

Observa-se uma diminuição rápida de pH que passa de 7,00 para 6,10 nas três primeiras horas, devido provavelmente ao baixo valor de pH do inoculo (pH = 4,02). Este mesmo efeito observa-se no trabalho de WANG & ASCHERI (1991), na produção de iogurte de soja.

Entre 3 e 18 horas, o pH, experimenta uma redução gradual e constante. Após esse período e até o final da fermentação, ocorre uma estabilização do pH. Esta redução lenta e constante do pH, permite que o processo de produção do ácido láctico e acidificação do meio, sejam também constantes, sem alterações bruscas que poderiam provocar a precipitação das proteínas.

Além disso, é desejável que o pH entre as 15 e 18 horas, não seja muito pronunciado a fim de completar a fermentação até obter-se as características desejáveis de aroma, sabor, textura e aparência na bebida láctea fermentada.

Um fato interessante é que YANAMAKA & FURUKAWA, citados por SOUZA & OLIVEIRA (1988), indicam que a produção de ácido por culturas de estreptococos e lactobacilos, entre eles *L. casei*, era maior numa mistura de 70% de leite de soja com 30% de leite de vaca desnatado do que somente no leite de vaca desnatado, mas embora a proporção de leite de vaca desnatado seja aproximada a quantidade por nos utilizada.

Nosso objetivo não é somente a produção de ácido láctico, mas sim uma bebida láctea fermentada incluindo soro de leite e que seja organolepticamente aceitável com as proporções por nos estabelecidas.

#### **4.3. Determinações físico-químicas da bebida láctea fermentada.**

Foram determinadas através de análises físico-químicas as principais características do substrato e bebida láctea fermentada como observa-se na tabela 8.

**Tabela 8. Composição centesimal do substrato e da bebida láctea fermentada.**

Componentes %	Substrato t <sub>0</sub>	Produto em t <sub>f</sub>
Umidade	93,1575	92,7540
Glicídios	3,2400	1,7100
Protídios	2,3200	2,9500*
Lipídios	0,6515	2,3945
Cinzas	0,6310	0,6415
Estrato seco	6,84250	7,2460

Substrato t<sub>0</sub>: Mistura de leite desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja antes da fermentação e inoculação.

Produto em t<sub>f</sub>: Bebida láctea fermentada, após 21 horas de fermentação.

\* : Protídios totais.

#### **4.3.1. Umidade.**

Os teores de umidade tanto no substrato antes da fermentação como no produto fermentado, são similares e não diferem em muito dos valores de umidade para as matérias primas apresentadas na tabela 7.

#### **4.3.2. Cinzas.**

O valor das Cinzas, para o substrato  $t_0$ , é ligeiramente inferior ao do produto fermentado  $t_f$ , isso provavelmente devido a uma ligeira evaporação ocorrida durante a fermentação ocasionada pela agitação e temperatura (Tabela 8).

Autores como ALAIS (1984), BEHMER (1975) e SPREER (1991), apresentam valores de cinzas próximos aos obtidos neste trabalho, mostrando que a variação é relativa à composição do substrato a ser fermentado.

#### **4.3.3. Extrato seco.**

O extrato seco para o substrato  $t_0$ , antes da fermentação, tem um valor inferior ao do produto fermentado. Esse aumento de concentração deve-se à biomassa bacteriana formada durante a elaboração da bebida (Tabela 8).

#### **4.3.4. Açúcares totais.**

A evolução do consumo de açúcares durante o processo fermentativo, é mostrado na figura 20. Observa-se que o conteúdo de açúcares totais teve ligeira redução nas primeiras 6 horas de fermentação. Entre 6 e 9 horas, constata-se um acentuado consumo que esta diretamente relacionado com o crescimento exponencial rápido da biomassa de *Lactobacillus casei*.

Entre 9 e 12 horas, o consumo de açúcares continuou elevado, embora com menor intensidade, seguido de um consumo mais estável entre 12 e 18 horas, coincidindo com a

fase estacionária de crescimento. Já no final da fermentação, entre as 18 e 21 horas, observou-se um incremento de consumo de açúcar.

Estas ligeiras variações no consumo de açúcares, segundo MITAL & STEINKRAUS, citados por SOUZA & OLIVEIRA (1988), poderiam ser causados pela utilização rápida da sacarose, produzindo diminuições de pH suficientes para inibir a utilização dos sacarídos maiores como refinose, estaquiose e sacarose, cujo consumo pelas bactérias lácticas, diminui a tendência destes a causar flatulência no trato intestinal e consequente melhora na digestibilidade e aceitação do produto.

Supomos que esta inibição seja momentânea, enquanto não seja preciso mais açúcar e energia para continuar com o metabolismo e processo fermentativo, porque os valores indicam que embora em forma lenta, a partir das 12 horas de fermentação, os açúcares continuam sendo consumidos. Apreciação similar foi realizada por HANG & JACKSON, citados por SOUZA & OLIVEIRA (1988), indicando que uma mistura de leite de soja suplementada com lactose do leite de vaca, experimenta mudança no conteúdo de carboidratos, que supostamente foram utilizados para a produção de ácido láctico.

A diferença entre a quantidade de açúcares totais de 3,14 g/100 ml no início da fermentação e a quantidade doseada de 3,24 g/100 ml mostrada na tabela 8, deve-se provavelmente à caramelização destes açúcares no processo de esterilização da mistura do leite desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja.

#### **4.3.5. Produção de Ácido Láctico.**

A produção de ácido láctico, evoluiu em forma crescente, mas lenta nas primeiras 6 horas de fermentação e que correspondente à fase de latencia na curva de crescimento onde as células de *L. casei*, estão se adequando ao novo meio,

Entre 6 e 12 horas, observa-se uma produção de ácido mais pronunciada em razão do crescimento exponencial da população bacteriana, que ao multiplicar-se, ativam a conversão de açúcares em ácido láctico.

Este mesmo efeito experimentaram GOUQUIANG et al.(1991) num estudo de produção de ácido láctico com características muito similares as obtidas neste trabalho, mas utilizando um meio de cultura complexo.

Entre 12 e 21 horas de fermentação, a produção de ácido é mais acentuada, provavelmente devido ao fato que a produção de ácido láctico está parcialmente associada ao crescimento, sendo que a produção de ácido evoluiu de 0,24 g/100ml até 1,18 g/100 ml no final da fermentação. A figura 20, mostra a produção de ácido láctico.

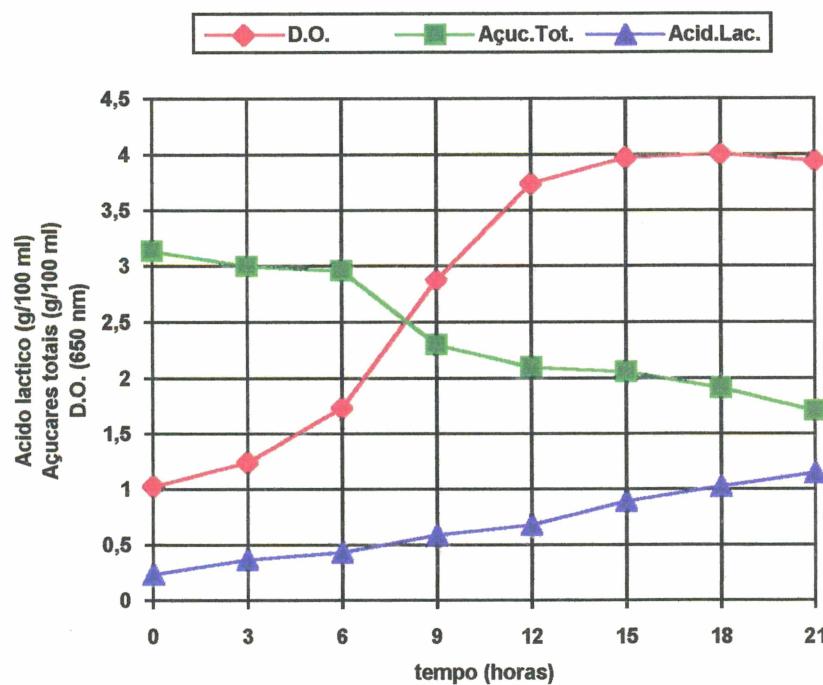


Fig.20. Variação dos Açúcares totais e ácido láctico durante a fermentação no bioreator.

#### 4.3.6. Proteínas.

O conteúdo de proteínas, experimenta também um consumo variado, especialmente as proteínas do substrato (sem biomassa), que diminuem de 2,3 g/100 ml a 1,50 g/100 ml, e que pode ser observado na figura 21.

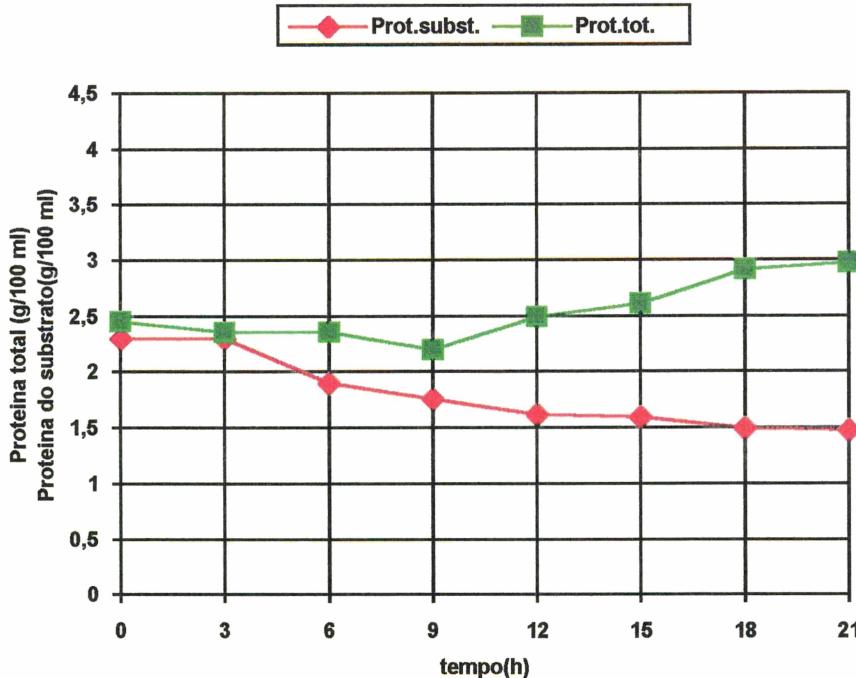


Fig. 21. Variação das proteínas durante a fermentação em bioreator MARUBISHI 8 L.

Observa-se uma ligeira redução no nível das proteínas do substrato durante a fermentação. Entre 3 e 6 horas de fermentação, ocorre uma redução considerável na quantidade de proteínas, correspondente ao início da fase exponencial de crescimento celular, pois a cultura de *Lactobacillus casei* necessita de apreciável quantidade de nitrogênio, principalmente na forma de aminoácidos, várias vitaminas e minerais. Entre 9 horas até o fim da fermentação, não ocorrem variações bruscas no consumo de proteínas, sendo que a diminuição é lenta e constante.

As proteínas totais (substrato + biomassa), variam nas primeiras 6 horas de fermentação; a partir deste tempo e até o final da fermentação, ocorre uma pequena elevação, e entre 15 e 18 horas existe mas um apreciavel incremento que permanece constante das 18 até o final da fermentação com 2,95 g/100ml. Estas variações podem ser causadas pelo acréscimo de biomassa celular, que segundo HJÖRLEIFSDOTTIR et al. (1990) sugerem, a formação de nova proteína celular é um mecanismo envolvido na

sobrevivencia das células com necessidades nutritivas, tanto quanto ressultado do stress mecânico.

#### 4.3.7. Lipídios.

O conteúdo de lipídios na mistura de leite de vaca desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja, antes da fermentação é pequeno, mas na bebida láctea fermentada tem um teor de quase 2,4%, o que pode ser devido aos lipídios das células da cultura láctica. Referente a este fator, estudos feitos por ANGELES & MARTH, citados por SOUZA & OLIVEIRA (1988), indicam que a maioria das culturas lácticas, não hidrolizava os lipídios, mas que o *L. casei*, entre outros, liberavam alguns ácidos graxos livres no leite de soja e no meio de cultivo MRS enriquecido com 2% de lipídios da soja. Mas dada a pouca quantidade inicial de lipídios, este efeito também de . era ser relativamente pequeno.

A figura 22 mostra a fotografia da biofermentação da bebida láctea em bioreator MARUBISHI de 8 L. A cor creme é devido à caramelização de parte dos açúcares durante a esterilização do meio de cultura ou substrato, antes da inoculação com cultura de *L. casei* LPB 93.

Na figura 23, observa-se a bebida láctea sob constante agitação, com a formação de espuma devido a liberação de CO<sub>2</sub> durante o processo. Esta formação de espuma é pequena e não interfere no processo. Observa-se igualmente que a cor é homogênea e de bom aspecto.

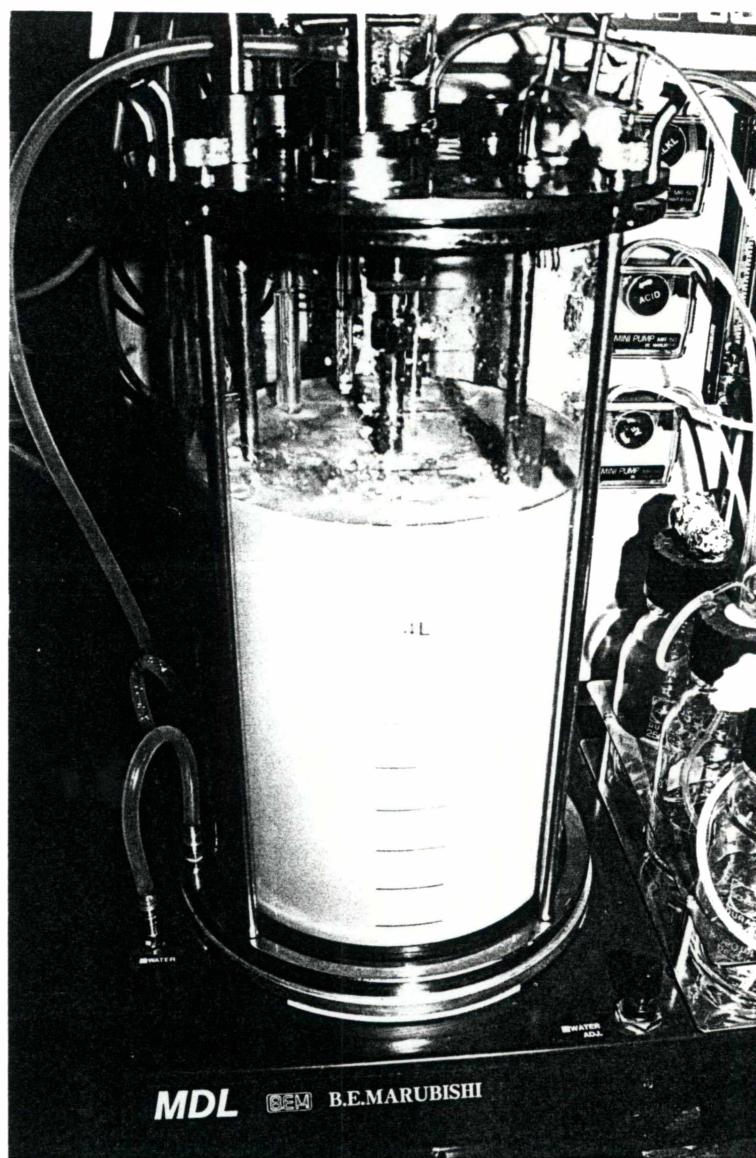


Fig. 22. Biofermentação do composto lácteo (leite desnatado, soro de leite desproteinizado e leite de soja), por *Lactobacillus casei* LPB 93, em bioreator MARUBISHI de 8,0 L.

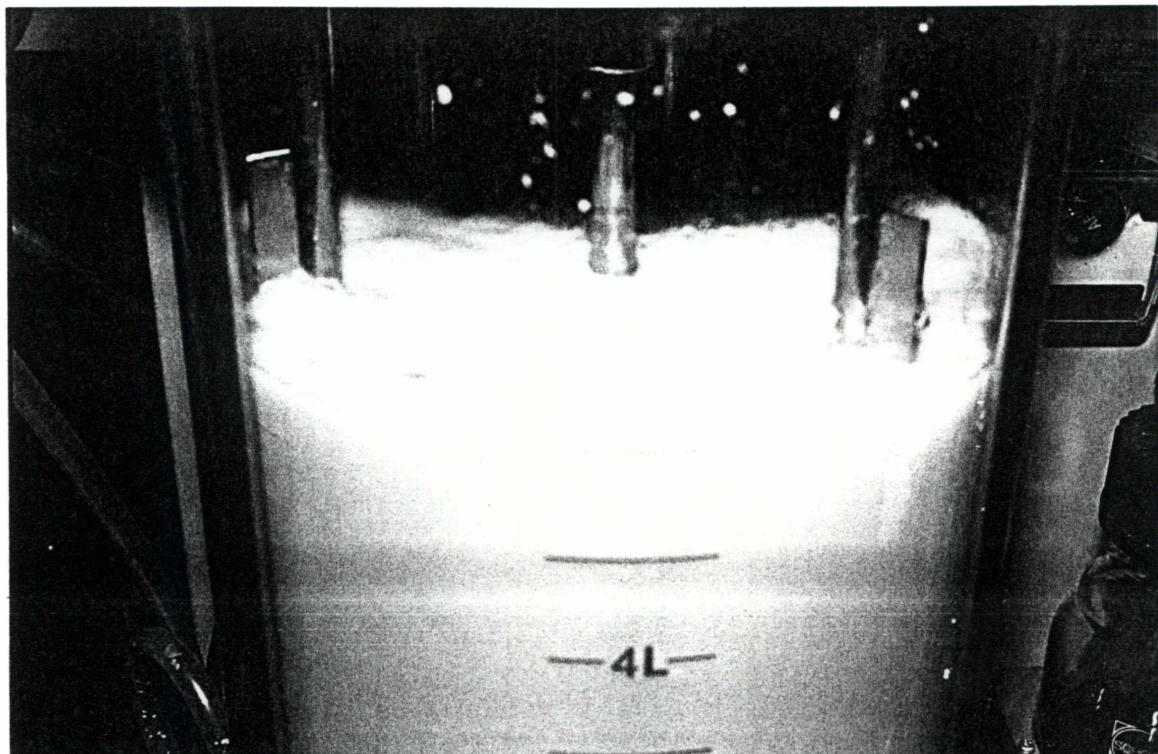


Figura 23. Vista ampliada da agitação e formação de espuma durante a fermentação da bebida láctea no bioreator.

#### 4.3.8. Cromatografia de camada delgada (TLC).

A Cromatografia de camada delgada ou TLC (Thin Layer Chromatography), foi realizada visando determinar qualitativamente a presença e o grau de utilização dos açúcares tais como glucose, sacarose, lactose, rafinose, estaquiose e verbascose, existentes na bebida láctica durante os diversos tempos de fermentação estudados.

Segundo ALAIS (1984), BEHMER (1975), e DEMETER (1971), o principal e mais importante açúcar do leite de vaca e também do soro de leite é a lactose, que na fermentação láctica seria a principal fonte de carbono para a produção de ácido láctico.

Por sua parte, SMITH & CIRCLE (1978), indicam que os principais açúcares da soja são a sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, embora este ultimo em muito pouca quantidade. A glucose e outros açúcares redutores estão presentes em quantidade apreciável nos grãos imaturos, mas estes desaparecem nos grãos maduros, sendo portanto sua presença questionável. Desta forma supõe-se que alguns destes açúcares estejam presentes no leite de soja e sejam detectados pela cromatografia TLC, como é mostrada na figura 24.

Esta figura mostra em primeiro plano os padrões de glucose(G), sacarose(S), lactose(L), rafinose(R), estaquise(E) e verbascose(V), preparadas numa concentração de 20 mg/ml. Observa-se que a glucose e sacarose tem uma fraca presença, sendo provavelmente que a glucose, provém do inoculo de *Lactobacillus casei*. A sacarose porém é encontrada na semente de soja. Observa-se a presença de sacarose na mancha do revelado correspondente ao soro de leite, mas que poderia ser confundido com alguma impureza.

A placa 1 (Fig. 24), revela que a lactose é a fonte de carbono mais importante presente na bebida láctea. Observamos a intensidade decrescente entre 0 a 21 horas de fermentação. Esta redução de intensidade indica o consumo de lactose e a consequinte produção de ácido láctico por ação da cultura de *L. casei* LPB 93. As amostras de leite (M), e soro de leite desproteinizado (W), também acusam a presença de lactose em grande quantidade.

A bebida láctea fermentada, amostrada a cada três horas, desde as 0 até 21 horas de fermentação, mostra a crescente diminuição da intensidade das manchas de lactose, indicando o consumo crescente da lactose durante a fermentação da bebida láctea, sendo que as 21 horas, tempo de fermentação máximo (M<sub>x</sub>), a mancha revelada é pouco perceptível.

A mancha assinalada com Y, pertence à amostra de um produto comercial de leite fermentado, no qual observa-se a presença de lactose misturado provavelmente com glucose e sacarose. Não foi possível detectar a presença de rafinose, tal vez pela sua presença reduzida no leite de soja.

A estaquiose foi revelada mas em concentração muito baixa durante todo o processo, embora de maneira levemente decrescente na bebida láctea, sua utilização como fonte de carbono por parte do *L. casei* provavelmente é pouca, embora a sua presença no leite de soja é mais perceptível.

Por sua parte a verbascose, conseguiu ser detectada somente durante as 3 primeiras horas de fermentação, após esse período não foi mais detectada, devido provavelmente e segundo SMITH & CIRCLE (1978), à reduzida quantidade presente nos grãos de soja e ainda menor no leite de soja.

A fase móvel utilizada para a Cromatografia TLC desta fermentação láctica foi específica para obter uma melhor separação dos compostos desejados, tendo a seguinte composição: Isopropanol, 15 ml; Nitrometano, 3 ml; Acetato de Etila, 6 ml; Etanolamina ao 0,1%, 6 ml; com um volume total de 30,0 ml.

A figura 25 mostra as placas 3,4 e 5, que apresentam resultados cromatográficos realizados somente para avaliar o conteúdo de lactose. nas revelações de cromatografias TLC, utilizando uma outra fase móvel, cuja composição foi a seguinte: isopropanol, 50 ml; acetato de etila, 45 ml, nitrometano, 30 ml; metil cetona, 25 ml; etanol, 10 ml e água destilada, 20 ml.

#### **4.3.9. Análise microbiológica.**

A análise microbiológica foi realizado em amostras no segundo dia de armazenamento e no vigésimo dia de armazenamento. A tabela 9, apresenta o resultado da análise microbiológica para as diferentes amostras.

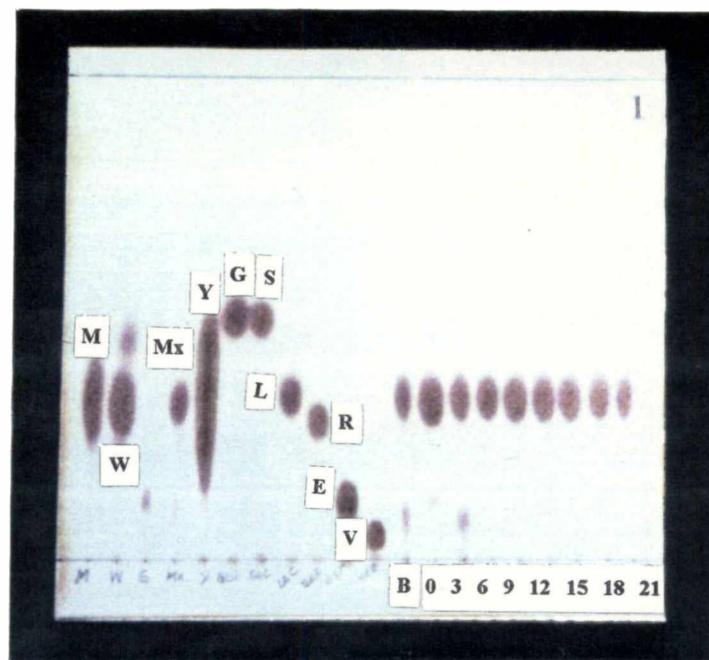


Fig.24. Desenvolvimento de Cromatografia TLC das amostras de bebida láctica a diferentes tempos de fermentação.

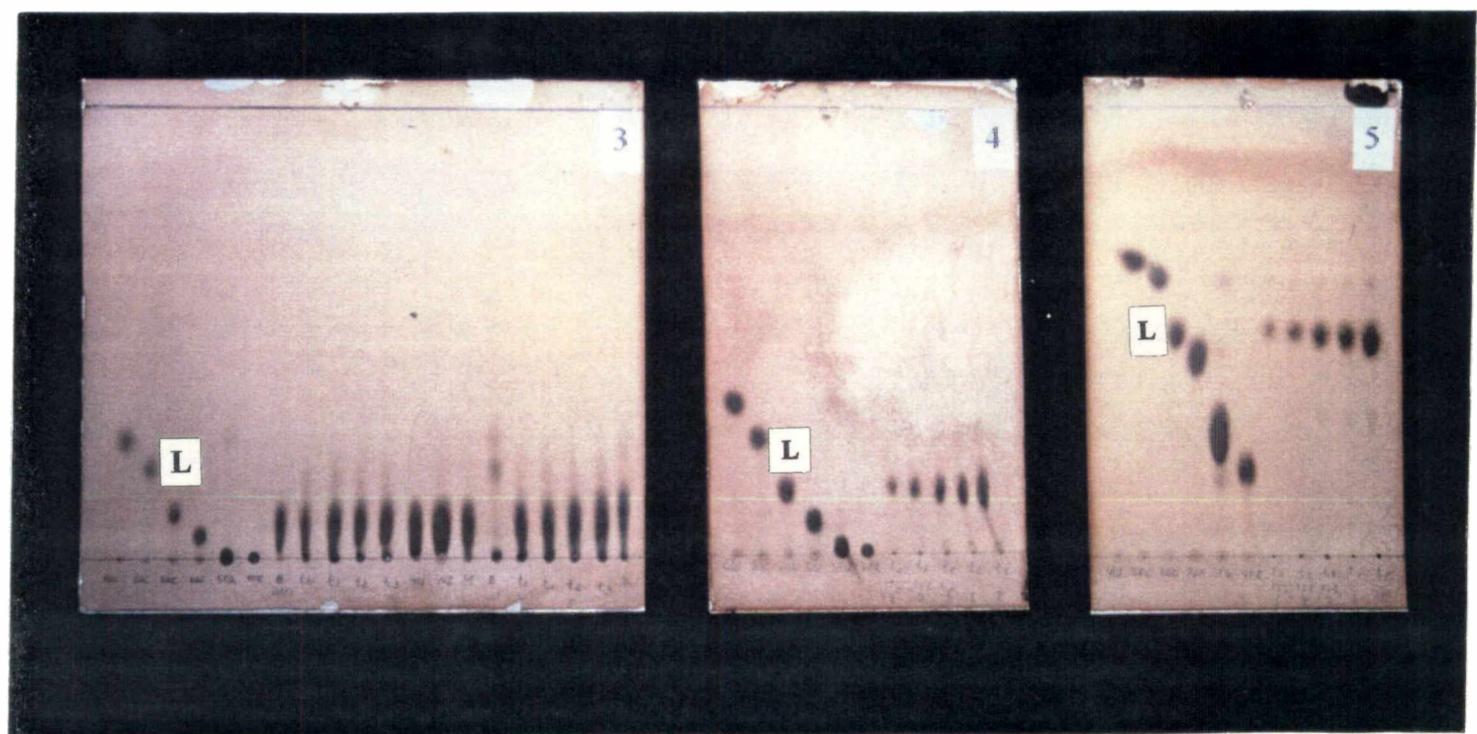


Fig. 25. Cromatografia TLC da fermentação de bebida láctica para os diferentes tempos.

Tabela 9. Resultados da Análise microbiológica da bebida láctea fermentada, aos 2 e 20 dias de armazenamento.

Amostras	A	B	C	D
Contagem de Coliformes totais NMP/	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)
Contagem de coliformes fecais NMP/	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)	<3,0 (neg)
Contagem de bolores e leveduras UFC/	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)
Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> UFC/	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)
Contagem de <i>Bacillus cereus</i> UFC/	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)
Contagem de Clostrídio sulfito redutor UFC/	<10 <sup>1</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)	<10 <sup>2</sup> (neg)
Pesquisa de <i>Salmonella</i> Sp/25	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia

A, B: Análise de amostras no 2º dia de armazenamento a 4°C+-1.

C, D: Análise de amostras no 20º dia de armazenamento a 4°C+-1.

Os resultados da análise microbiológica, mostram que a bebida láctea fermentada, apresenta excelente qualidade sanitária, não sendo detectada a presença de organismos estranhos e prejudiciais à saúde humana, e embora a portaria Nº 01-DINAL/MS DE 28 DE JANEIRO DE 1987, da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação-ABIA, exija somente análise de Salmonelas, Coliformes fecais, Bolores e leveduras, foi realizado análise microbiológica completa da bebida láctea fermentada, para garantir sua qualidade sanitária. O laudo da análise, pode ser observada no anexo A.

Estas análises foram realizadas tanto no laboratório de Processos Biotecnológicos, como no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos CEPPA.

#### 4.3.10. Avaliação sensorial

Na avaliação sensorial, foi utilizado o teste de Escala Hedônica, com 8 provadores não treinados visando refletir as preferências da população consumidora geral.

As amostras foram identificadas como 198, 325, 567, 784 e 830, sendo preparadas da seguinte maneira:

Amostra 198: 500 ml. de amostra + 1 ml. aroma de baunilha + 20 ml. solução de açúcar a 30%.

Amostra 325: 300 ml. de amostra + 200 ml. de água + 1 ml. aroma de baunilha + 20 ml. solução de açúcar a 30%.

Amostra 567: 500 ml. de amostra + 1 ml. de aroma de baunilha + 15 ml. solução de açúcar a 30%.

Amostra 784: 250 ml. de amostra + 250 ml. de água + 20 ml. solução açúcar a 30%.

Amostra 830: Bebida láctea fermentada YAKULT, comercializado na cidade de Curitiba.

Os resultados deste teste são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Análise de Variância.

Coeficiente de Variância	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	f
Tratamento	4	69,85	17,46	9,92 calc.
Provador	7	44,78	6,39	4,07 tab.
Resíduo	28	49,34	1,76	
Total	39	163,98		

Como o valor de f calculado é maior à f da tabela, aplicamos um teste de media.

Aplicando o teste de Tukey:  $\Delta 1\% = q \sqrt{QM_{resíduo}/n}$

$$\Delta 1\% = 2,368$$

As medias das amostras são:

$$X_{198} = 7,375 \quad X_{325} = 5,25 \quad X_{567} = 7,375 \quad X_{784} = 5,135 \quad X_{830} = 8,5$$

Os resultados assim obtidos, mostram que a amostra 830 diferiu das amostras 325 e 784 que foram dissolvidas com agua, ao nível de 1%; mas não diferiu das amostras 198 e 567 que não foram dissolvidas com agua. Por tanto, as amostras 198 e 567 são similares

estatisticamente à amostra 830, e tiveram muito boa aceitação, sendo que segundo os resultados, a amostra 198 foi aceita como a melhor e mais próxima da amostra 830, considerando que a amostra 830, é o produto comercial Yakult de amplo consumo no mercado, que foi tomada como padrão.

Cabe ressaltar que as amostras dissolvidas com água, apesar de apresentar consistência e textura aceitáveis, não tiveram a mesma aceitação que as amostras não diluídas, por apresentarem estas últimas, um aroma natural de caramelo bem mais pronunciado.

Além disso, aparentemente a adição de essências e aromatizantes, não influi muito na escolha do melhor produto. Alguns provadores observaram que o produto testado, apresenta ligeira vantagem na consistência, textura e acidez mais aceitável que o padrão comercial.

#### **4.3.11. Tempo de Prateleira.**

O tempo de prateleira inicialmente projetado foi de 30 dias a temperatura de armazenamento em geladeira a 4 +1°C, mas experimentalmente somente conseguiu-se manter boas características físicas, químicas e organolépticas do produto por 22 dias.

Observou-se que tempos maiores de armazenagem, refletem na precipitação das proteínas e a separação em fases solida e líquida do produto.

A bebida láctea fermentada foi armazenada em frascos de vidro com volumes de 100, 250 e 500 ml do produto. O produto foi também armazenado em saquinhos de polietileno com 100 e 250 ml do produto e selados ao calor.

Este último procedimento foi o que mais adequou-se às características da bebida láctea fermentada, considerado também o mais econômico.

## CONCLUSÃO.

A conclusão geral que pode obter-se deste trabalho, é a possibilidade de fermentar em estado líquido uma mistura de leite de vaca, extrato aquoso de soja e soro de leite por ação de uma cepa de *Lactobacillus casei*, para produzir uma bebida láctica, com apreciável conteúdo de proteínas e propriedades probioticas interessantes.

A bebida láctea biofermentada, apresenta excelentes condições sanitárias e boas características organolépticas que a fazem aceitável no consumo humano, com cor e aroma a caramelo, sem sabor algum a soja.

A utilização de uma boa percentagem de soro de leite no substrato a fermentar, amplia os horizontes da utilização deste material, resíduo altamente poluente, visando a diminuição das quantidades despejadas nos esgotos, rios e sistemas similares.

Esta utilização do soro de leite, resíduo praticamente de custo zero nos laticínios, a baixa quantidade de leite de vaca utilizada, e o uso do leite de soja, produzido em abundância no Brasil e de excelentes propriedades nutricionais de baixo custo, contribuem a reduzir o custo desta bebida em quase a terceira parte com referência as bebidas produzidas em base a leite de vaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABIA-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO.** Portaria N°01-DINAL/MS de 28 de Janeiro de 1987. Anexo II.
- ALAIS, Charles.** *Ciencia de la leche-Principios de Técnica lechera.* 5 ed. México, D.F.: Compania Editora Continental S.A., 1984.
- ANTUNEZ, P.L.; SGARBIERI, V.C.** Propriedades fisico-químicas e nutricionais das proteínas da soja. In: **MIYASAKA, Shiro; MEDINA, Julio César.** (Ed.). *A soja no Brasil.* 5. ed. São Paulo, 1981.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC).** *Official methods of Analysis of The Association of Official Agricultural Chemists.* Method 947.05. Washington, AOAC, 1990.
- BARUFFALDI Renato.** Produção de ácidos por microrganismos. In: **AQUARONE, Eugênio; ALMEIDA LIMA, Urgel de; BORZANI, Walter.** *Biotecnologia. Tecnologia das fermentações.* São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1990. v.1.
- BEHMER, M.L. Arruda.** *Tecnologia do leite.* 5. ed. São Paulo: Nobel, 1975. 302 p.
- BONETTI, P. Luiz.** Distribuição da soja no mundo. In: **MIYASAKA, Shiro; MEDINA, Julio César.** (Ed.). *A soja no Brasil.* 5. ed. São Paulo, 1981. 850 p.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E.** (Co-editors). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 8 ed., Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1974.
- CABRAL, Lair Chavez; MODESTA, Regina Celia.** *Soja na alimentação humana.* Rio de Janeiro: EMBRAPPA/CTAA., 1981.
- CARDOSO, Wilson Mendez, et al.** *Análise microbiológica de alimentos.* 2 ed. Diagnóstica Merck, 1989.
- CARVALHO LIMA, Lucio Penna, de.** Elementos de microbiologia. In: **AQUARONE, Eugênio; ALMEIDA LIMA, Urgel de; BORZANI, Walter.** *Biotecnologia. Tecnologia das fermentações.* São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1990. v.1.

COSTA, Irineu Sebastião da. Outros produtos da soja. In: MIYASAKA, Shiro, MEDINA, Julio César, (Ed.). **A soja no Brasil**. São Paulo, 1981.

DAVIS, M. Bernard; DUELBECCO, Renato. **Microbiologia de Davis**. 2 ed., v. 1. São Paulo: Harper and Row do Brasil Ltda., 1974.

DEMETER, K.J.; ELBERTZHAGEN, H. **Elementos de microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1971. 150 p.

DEMIRCI, Ali; POMETTO III, Anthony L.; JOHNSON, Kenneth, E. Evaluation of Biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. New York: Springer-Verlag, v. 38, p. 728-733, 1993.

DUBOIS, Mitchel; GILLES, A.K.; HAMILTON, J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**. v. 28, p. 350-356, 1956.

EMPRESA PARANAENSE DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL-EMATER Paraná. **ANÁLISE DA PRODUÇÃO LEITEIRA**. 1994.

FERREIRA, F. Célia Lúcia de Lucs. **Produtos lácteos fermentados**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1987.

GERALDINI, Ana Maria, et al. Caracterizaçao de bactérias láticas em alimentos I. Avaliaçao de meios sólidos para contagens de culturas puras. **Boletim ITAL**, Campinas: 16(1), 53-64, Jan./Mar., 1979.

GOMEZ, Pimentel. **A soja**. 5 ed., São Paulo: Nobel, 1988.

GOUQUIANG, Dong; KAUL, Rajni; MATTIASSON, Bo. Evaluation of Alginat-inmovilized *Lactobacillus casei* for lactate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Springer-Verlag, 36: 3090-314, 1991.

GOUQUIANG, Dong; KAUL Rajni; MATTIASSON, Bo. Inmobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material, pretreated Polyethylenimine. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 37, p. 305-310, New York, Springer-Verlag, 1992.

GOURNAL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biologic Chemistry.** v. 177, p. 751-766, 1949.

GRANDI, José Glauco. Leites fermentados, manteiga e queijos. In: AQUARONE, Eugênio; ALMEIDA LIMA, Urgel de; BORZANI, Walter. **Biotecnologia. Tecnologia das fermentações.** São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1990. v.1.

HARDGROVE, R.E. Fermentation products from skim milk. In: WEBB, Byron H. (Editor). **Byproducts from milk.** Chapter 2, The Avi publishing company, 1970.

HESSELTINE, C.W.; WANG, H.L. Fermented soybean food products. In: SMITH, Allan K.; CIRCLE, Sidney J. (Ed.) **Soybeans: Chemistry and Technology.**, v1, Chapter 11, Westport: The Avi publishing company, 1992.

HINOJOSA, Ramón Gutierrez; HERMINIO, Roberto Moretti. A produção de leite de soja em escala semi-industrial. In: MIYASAKA, Shiro; MEDINA, Julio César, (Ed.). **A soja no Brasil.**, Campinas: 1981.

HJÖRLEIFSDOTTIR, Sigridur; SEEVARATNAM, Sulojana; HOLST, Olle; MATTIASSEN, Bo. Effects of complete cell recycling on product formation by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in continuous cultures. **Courrent Microbiology**, New York: Springer-Verlag, 1990.

JAY, James M. **Microbiología moderna de los alimentos.**, cap; 14, Zaragoza: Acribia, 1978.

JULIANO, Ana Maria de Mattos; PETRUS, José Carlos Cunha; TORRANO, A.D.M. Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para produção de queijos. **Instituto de laticinios Cândido Tostes**, Campinas: 42(251), p. 3-6, 1987.

KOBAYASHI, Hideyuki; KOHYA, Sakae; KAMASHIMA, Ken, et al. Deodorization of Soybean protein with microorganisms. **Bioci. Biotech. Biochem.** 56(3), p. 530-531, 1992.

KON, S.K. **Milk and milk products in human nutrition.** 2. ed. Roma: F.A.O., 1972, 80 p.

KOSIKOWSKI, Frank. **Cheese and fermented milk foods.** 2; ed. New York: F.V. Kosikowski and Associates, 1977. cap. 4, 711 p.

LAWRENCE, A.J. Determination of láctic ácid in cream. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v; 30, n.1, p. 14-15, March, 1975.

LEHNINGER, L. Albert. **Bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, Ltda., 1976. v. 1; v. 2.

LOCKWOOD, B. Lewis. Production of organic acid by fermentation. In: PEPPLER, H.J.; PERLMAN, D. (Ed.). **Industrial microbiology.** 2. ed. New York: Academic Press Inc., 1979. v.1.

MONTES, Adolfo Leandro. **Microbiología de los alimentos.** Curso teórico e práctico. São Paulo: Resenha Universitaria, 1977. v. 2.

MORAES, Maria Amelia, Chiab de. **Métodos para avaliação sensorial de alimentos.** 7º ed. Campinas: Edição experimental, 1990.

NEIROTTI, Edison; OLIVEIRA, Antonio Joaquim de. Produção de iogurte pelo emprego de culturas lácticas mistas. **Boletim SBCTA**, Campinas, 22 (1/2), p. 1-6, jan/jun. 1988.

OBERMAN, Helena. Fermented Milks. In: WOOD, Brian J.B. **Microbiology of fermented foods.** London: Elsevier, v.1., 1985, 371 p.

OLIVEIRA, José Sátiro. Produção e conservação do iogurte. **Boletim ITAL**, São Paulo, p. 1-12, 1970.

PELCZAR, Michael; REID, Roger; CHAN, E.C.S. **Microbiología.** São Paulo: Mc.Graw - Hill do Brasil, 1980.

RHODES, Alan; FLETCHER, L. Derek. **Principios de microbiología industrial.** Zaragoza: Acribia, 1969. 315 p.

ROSSI, Elizeu Antonio. **Formulação de um sucedâneo de iogurte a base de leite e extrato aquoso de soja.** Londrina, 1983. Dissertação (Mestrado em Ciencia de alimentos)-Universidade Estadual de Londrina.

ROSSI, Elizeu Antonio. Redução de níveis de oligossacárides em iogurte de soja pelo uso de culturas lácticas. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, 1, p. 37-46, 1989.

SA, Fernando Vieira de; BARBOSA, Manuela. **O leite e os seus produtos**. 5 ed., Lisboa: Classica, 1990.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO DO PARANÁ **Acompanhamento da situação agropecuaria no Paraná**.SEAB-Paraná, v.20, n.4, p.1-99, abr./mai. 1994.

SILVA, S.Silvio; MANCILHA, M. Ismael. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Ácido láctico, uma alternativa. **Boletim da SBCTA.**, Campinas, v. 25, n.1, p. 37-40, jan./jun., 1991.

SILVEIRA, Leda Lobo da; FERNANDEZ, Flavio Eliete; ALVARES, Martins. **Soja, o alimento e a nutrição**. Centro de Ciencias Biológicas e da Saude-Departamento de nutrição e Saude, Viçosa: Universidade federal de Viçosa, 1989.

SMITH, Allan Key; CIRCLE, Sidney Joseph. **Soybeans: Chemistry and technology**. v.1. Proteins, Connecticut: Avi Publishing company, Inc., 1978.

SOCCOL,Carlos Ricardo. **Physiologie et métabolisme de Rhizopus en culture solide et submerée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+)-lactique**.França, 1992. Tese de Doutorado. Université de Technologie de Compiègne-França.

SORBA, C.N.; CERVELLINI, M.I.; BALATTI, A.P. Utilización del suero ácido de queso para el desarrollo de la cepa **Bradyrhizobium japonicum** E-109. **Revista Argentina de microbiología**. Buenos Aires, v. 25, p. 171-184, 1993.

SOUZA, Genevaldo de; OLIVEIRA, Antonio Joaquim de. **Fermentação lática de leite de soja**. Coletanea ITAL, Campinas: v 18, N° 1, Jan/Jun 1988.

SPECK, M.L. Acidophilus Milk products. **Developments in industrial microbiology**., v.19, Washington, 1978.

SPREER, Edgar. **Lactologia industrial**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, S.A., 1991.

STAINER, R.Y.; DEUDUROF, M.; ADELBERG, E.A. **Mundo dos microbios.** São Paulo, Edgard Blucher Ltda., 1977

TAMINE, A.V.; ROBINSON, R.K. **Ciencia y tecnologia del yogurt.** Zaragoza: Acribia, 199..

TRAN, Qui, Kim; TAKAMURA, Hitoshi; KITO, Makoto. Dried Soymilk with low content of n-Hexanal. **Bioci. Biotech. Biochem.** 56(3), p. 519-520, 1992.

TULI, Amita; SETHI, R.P.; KHANNA, P.K. et al. Láctic ácid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. **Enzyme Microbiology Technology.** v. 7, n. 4, April, 1987.

VACARRI, Giuseppe; GONZALES-VARA y R. Antonio; CAMPI, L. Ana, et al. Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20011 and product recovery using ion exchange resins. **Applied Microbiology and Biotechnology.** New York: Springer-Verlag, v. 40, p. 23-27., 1993.

VEDAMUTHU, Ebenzer,R. Fermented Milks. cap. 6. p. 199-225. In: ROSE, A. H. (Ed.). **Economic Microbiology.** v. 7. London: Academic Press, 1982.

VENUS, Joaquim. New ways of selecting lactic ácid bacteria for biotechnological processes, **Applied microbiology**, New York: Springer-Verlag, 1992.

WANG, S.H.; ASCHERI, J.L.R. Iogurte de soja: Fermentaçao latica e avaliaçao sensorial. **Boletim da SBCTA.** Campinas, v. 11, n. 2, jul./dez. 1991.

WILCOX, Goerge. **Milk, Cream and Butter technólogy.** New Jersey: Moyes Data Corporation, 1971. 313 p.

WOOD, William B.; WILSON, John H.; BEMBOW, Robert M., et al. **Bioquímica.** Mexico: Fondo Educativo Latinoamericano S.A., 1977. 534 p.

XAVIER, S.; LONSANE, B.K. Sugar cane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology.** New York: Springer-Verlag, v. 41, p. 291-295, 1994.

**ANEXOS**

## TESTE DE ESCALA HEDÔNICA

**NOME** : ..... **DATA** : .....

Avalie cada amostra usando a escala abaixo mostrada, para descrever o quanto você gostou ou desgostou.

1. Desgostei muitíssimo.
  2. Desgostei muito.
  3. Desgostei regularmente.
  4. desgostei ligeiramente.
  5. Indiferente.
  6. Gostei ligeiramente.
  7. Gostei Regularmente.
  8. Gostei muito.
  9. Gostei muitíssimo.

Número de amostra	Valor	Número de amostra	Valor
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

[Comentários](#) | [Acessar](#) | [Sair](#)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

## CEPPA

### CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01  
Cx. P. 19.063 - FONES: (041) 266-1647 / 366-2323 - RAMAL 297 - FAX: (041) 266-1647  
DCTC - CEP 81531-970 - CURITIBA - PARANÁ

## CERTIFICADO OFICIAL DE ANÁLISE Nº 15948 SÉRIE A

PRODUTO: Leite Pasteurizado - B

FABRICANTE/PRODUTOR: - x -

SOLICITANTE: Pós-Graduação (Rodney)

ENDEREÇO: - x -

OBSERVAÇÕES: Entrada no. 2541/94 Data de recebimento: 15/08/94.

## RESULTADO DE ANÁLISES

### CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Contagem de Bactérias Flavófilas/UFC/ml ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Coliformes Totais/NMP/ml ..... <3,0 (neg)  
Contagem de Coliformes Fecais/NMP/ml ..... <3,0 (neg)  
Contagem de Bactérias psicrófilas/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Bactérias e Leveduras/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de *Staphylococcus aureus*/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de *Bacillus cereus*/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Clostrídio sulfato redutor/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Pesquisa de *Salmonella* sp/25ml ..... ausência

Curitiba, 30 de Setembro de 1994.

*Eliel Ribeiro do Nascimento*  
CRB 3-04248/86

TÉCNICO RESPONSÁVEL

*Marcia Regina Beux*  
T/ Marcia Regina Beux  
CFB - 04907/87

COORDENADOR DO LABORATÓRIO

Curitiba,

*A. 10.4.4*

*Prof. Gabriel Adolfo Ribeiro Guimarães*  
CHIEFE DO CEPPA / ST / UFPR  
MATRÍCULA 70300

OBSERVAÇÃO: A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

## CEPPA

### CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01  
Cx. P. 19.083 - FONES: (041) 266-1647 / 366-2323 - RAMAL 297 - FAX: (041) 266-1647  
DCTC - CEP 81531-970 - CURITIBA - PARANÁ

## CERTIFICADO OFICIAL DE ANÁLISE N° 15947 SÉRIE A

PRODUTO: Leite Fermentado - A

FABRICANTE/PRODUTOR: - x -

SOLICITANTE: Fone-Graduação (Rodney)

ENDEREÇO: - x -

OBSERVAÇÕES: Entrada no. 2540/94 Data de recebimento: 15/08/94.

## RESULTADO DE ANÁLISES

### CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Contagem de Bactérias Mesófilas/UFC/ml ..... <10<sup>1</sup> (neg)  
Contagem de Colifícios Totais/NMP/ml ..... <3<sub>g</sub>0 (neg)  
Contagem de Colifícios Fecais/NMP/ml ..... <3<sub>g</sub>0 (neg)  
Contagem de Bactérias psicrofílicas/UFC/g ..... <10<sup>1</sup> (neg)  
Contagem de S. Enterococcus/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Staphylococcus aureus/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Bacillus cereus/UFC/g ..... <10<sup>2</sup> (neg)  
Contagem de Clostrídio sulfato redutor/UFC/g ..... <10<sup>1</sup> (neg)  
Pesquisa de Salmonella sp/25ml ..... ausência

Curitiba, 20 de Setembro de 1994.

*El*  
Eliel Ribeiro do Nascimento  
CRB 3-04248/86

### TÉCNICO RESPONSÁVEL

*MRB*  
Marcia Regina Beux  
CFB - 04907/87

COORDENADOR DO LABORATÓRIO

Curitiba, *A. 10.94*

*SGM*  
Prof. Gabriel Adolfo Puelro Guimaraes  
CHÉFE DO CEPPA / ST / UFPA  
MATRÍCULA 70300

OBSERVAÇÃO: A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.