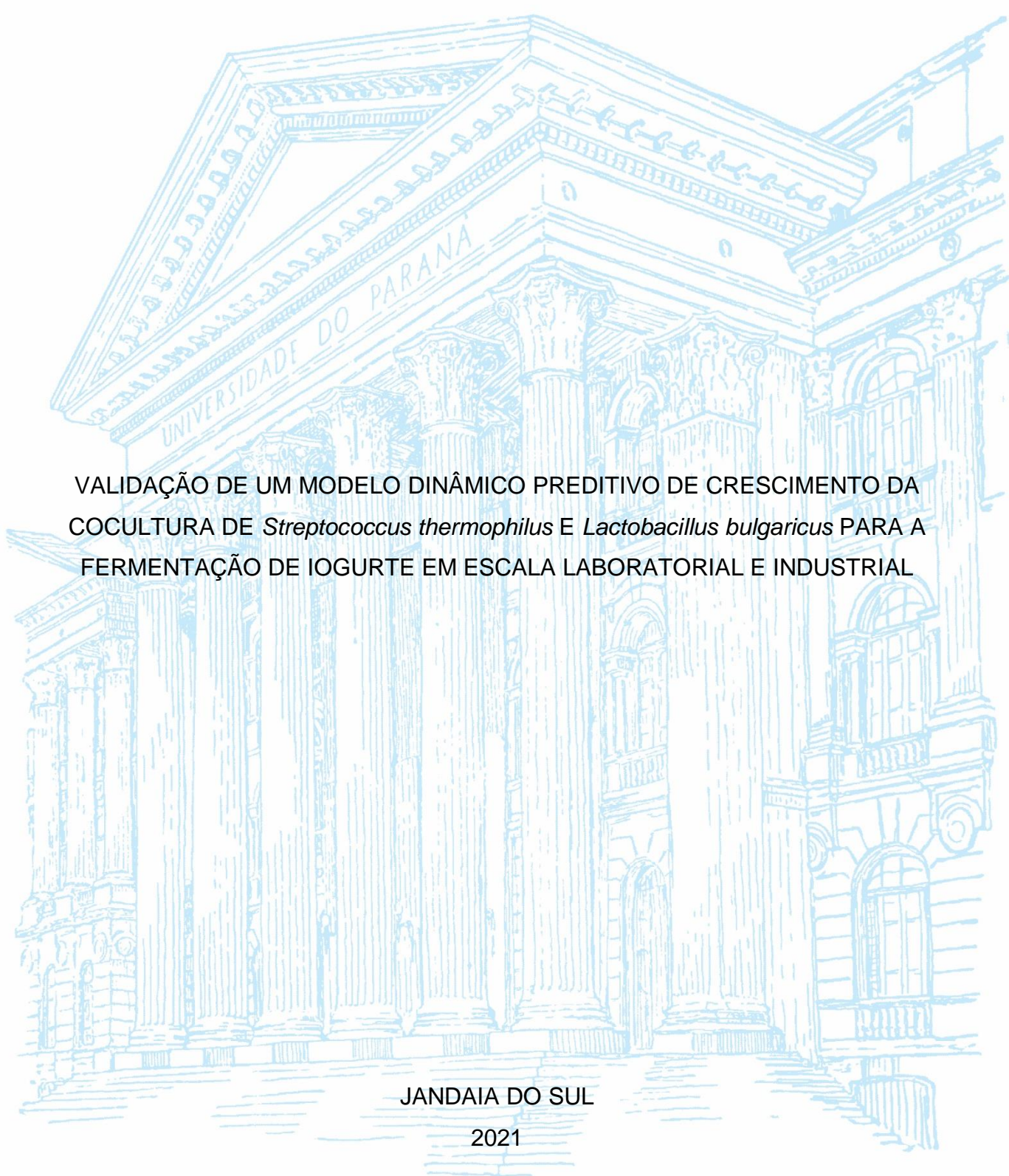


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CAMPANER SALMAZO



VALIDAÇÃO DE UM MODELO DINÂMICO PREDITIVO DE CRESCIMENTO DA  
COCULTURA DE *Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus bulgaricus* PARA A  
FERMENTAÇÃO DE IOGURTE EM ESCALA LABORATORIAL E INDUSTRIAL

JANDAIA DO SUL

2021

GABRIELA CAMPANER SALMAZO

VALIDAÇÃO DE UM MODELO DINÂMICO PREDITIVO DE CRESCIMENTO DA  
COCULTURA DE *Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus bulgaricus* PARA A  
FERMENTAÇÃO DE IOGURTE EM ESCALA LABORATORIAL E INDUSTRIAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à conclusão do curso de  
Engenharia de Alimentos, Campus Jandaia do Sul,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi

JANDAIA DO SUL

2021

S171v Salmazo, Gabriela Campaner  
Validação de um modelo dinâmico preditivo de crescimento da cocultura de *Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus bulgaricus* para a fermentação de iogurte em escala laboratorial e industrial. / Gabriela Campaner Salmazo. – Jandaia do Sul, 2021.  
40 f.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi  
Trabalho de Conclusão do Curso (graduação) – Universidade Federal do Paraná. Campus Jandaia do Sul. Graduação em Engenharia de Alimentos.

1. Otimização. 2. Bactérias ácido-láticas. 3. Lácteos. 4. Modelagem matemática. 5. Microbiologia preditiva I. Longhi, Daniel Angelo. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD: 664

## TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIELA CAMPANER SALMAZO

### VALIDAÇÃO DE UM MODELO DINÂMICO PREDITIVO DE CRESCIMENTO DA COCULTURA DE *Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus* *bulgaricus* PARA A FERMENTAÇÃO DE IOGURTE EM ESCALA LABORATORIAL E INDUSTRIAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos no curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, aprovada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi  
Orientador - Curso de Engenharia de Alimentos, UFPR

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dirlei Diedrich Kieling  
Curso de Engenharia de Alimentos, UFPR

Prof. Dr. Jair da Silva  
Curso de Engenharia de Alimentos, UFPR

Jandaia do Sul, 06 de agosto de 2021



Documento assinado eletronicamente por **DIRLEI DIEDRICH KIELING, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/08/2021, às 19:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **JAIR DA SILVA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/08/2021, às 19:49, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL ANGELO LONGHI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/08/2021, às 19:50, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **3705738** e o código CRC **A6A5712A**.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por estar comigo em todas as situações, pelas oportunidades concedidas, por ter me dado forças para superar os desafios e, principalmente, por ter colocado pessoas boas no meu caminho.

Aos meus pais Maria Rita e Edison, pelo amor, incentivo e apoio incondicional durante todo meu processo acadêmico. Obrigado por nunca terem deixado de acreditar e investir na minha educação mesmo quando as condições não eram tão favoráveis.

A todos os professores que contribuíram com a minha trajetória acadêmica, especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Angelo Longhi. Obrigada pelo suporte, paciência e dedicação em compartilhar seu conhecimento e ajudar a tornar tudo isso possível.

Ao Marcelo Volpato (Laticínios Volpato) pela doação da cultura Danisco que proporcionou o início deste trabalho na Iniciação Científica, no qual aprendi e pude enxergar oportunidades a serem exploradas e pesquisadas.

Ao Fabiano Carvalho (Confepar Agroindustrial) por autorizar e apoiar nos experimentos de escala industrial, além de me ensinar muito durante e depois do estágio.

À equipe da Microbiologia da Confepar por ter dado todo apoio durante as análises, pelos ensinamentos e por me socorrerem sempre que precisava.

À Marzieh Aghababaie pelos dados experimentais da sua pesquisa, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À UFPR pela estrutura física da pesquisa.

A minha parceira de curso e laboratório Vanessa, pela amizade e cumplicidade. Sem deixar de esquecer da nossa “mãe” Rosângela Gazola: obrigada pelo cuidado, preocupação, atenção e por ter nos ensinado tanto durante nossas pesquisas.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR (PRPPG-UFPR) pelo apoio financeiro – meios de cultura (Edital 04/2019, Projeto 3527).

E a todos os meus amigos da graduação pela amizade e cumplicidade construída nesses últimos cinco anos juntos.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi propor e validar um modelo matemático dinâmico capaz de descrever e prever o crescimento das bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* no processo fermentativo do iogurte em função da temperatura (T), do pH e da simbiose da cocultura. Para isso, os modelos primários (Baranyi e Roberts), secundário (Rosso e colaboradores) e de interação das espécies (Monod) foram utilizados para descrever o crescimento das bactérias em função dos fatores dinâmicos de T, pH e cocultura. Foram utilizadas 36 cinéticas da literatura (12 de cada espécie em cultura pura e 12 em cocultura) em condições constantes para estimar os parâmetros dos modelos e nove cinéticas em condições dinâmicas (três da literatura, quatro realizadas em laboratório e duas realizadas na indústria) para validar as previsões dos modelos. Os principais parâmetros estimados foram velocidade de crescimento ótimo ( $\mu_{opt}$ ) iguais a 2,41 e 2,43 h<sup>-1</sup>, temperatura ótima ( $T_{opt}$ ) iguais a 41,0 e 43,4 °C, e pH ótimo ( $pH_{opt}$ ) iguais a 7,4 e 4,9 para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, respectivamente, com Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE) dos ajustes iguais a 0,091 e 0,135 log UFC/mL, respectivamente. O modelo dinâmico foi capaz de prever de forma satisfatória o crescimento das bactérias em cocultura em condições reais durante a produção de iogurte nas escalas laboratorial e industrial, comprovadas pelos índices estatísticos (percentuais de tendência [%B] e discrepância [%D] menores que 4,38% e 14,53%, respectivamente). Portanto, o modelo validado pode ser utilizado para descrever e prever o crescimento das bactérias no processo fermentativo do iogurte.

Palavras-chave: otimização, bactérias ácido-láticas, lácteos, modelagem matemática, microbiologia preditiva.

## ABSTRACT

The objective of this work was to propose and validate a dynamic mathematical model capable of describing and predicting the growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* bacteria in the yogurt fermentation process as a function of temperature (T), pH and symbiosis coculture. For this, the primary (Baranyi and Roberts), secondary (Rosso et al.) and species interaction (Monod) models were used to describe the bacteria growth as a function of the dynamic factors of T, pH and S. Thirty-six kinetics from the literature were used (12 of each species in pure culture and 12 in coculture) under constant conditions to estimate the model parameters and nine kinetics under dynamic conditions (three from the literature, four carried out in the laboratory and two carried out in industry) to validate the predictions of the models. The main estimated parameters were optimal growth rate  $\mu_{opt}$  equal to 2.41 and 2.43  $\text{h}^{-1}$ , optimal temperature  $T_{opt}$  equal to 41,0 and 43,4 °C, and optimal pH  $pH_{opt}$  equal to 7,4 and 4,9 for *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*, respectively, with Root Mean Squared Error (RMSE) of the adjustments equal to 0,091 and 0,135 log CFU/mL, respectively. The dynamic model was able to satisfactorily predict the growth of bacteria in coculture under real conditions during the production of yoghurt at laboratory and industrial scales, confirmed by statistical indices (trend percentages [%B] and discrepancy [%D] lower than 4,38% and 14,53%, respectively). Therefore, the validated model can be used to describe and predict the growth of bacteria in the yogurt fermentation process.

Keywords: optimization, lactic acid bacteria, dairy products, mathematical modeling, predictive microbiology.

## LISTA DE ABREVEATURAS

- $\%B_f$  - percentual de tendência entre observado e modelado
- $\%D_f$  - discrepância discreta em porcentagem entre o observado e o modelado
- $C_1$  - primeiro coeficiente de efeito do pH na taxa de crescimento
- $C_2$  - segundo coeficiente de efeito do pH na taxa de crescimento
- $C_3$  - terceiro coeficiente de efeito do pH na taxa de crescimento
- $C_{Hla}$  - concentração do ácido láctico não dissociado (g/L)
- $C_{La}$  - concentração do íon lactato (g/L)
- $C_{SC}$  - concentração do substrato de carbono (g/L)
- $C_{SN}$  - concentração de substrato de nitrogênio (g/L)
- $C_f$  - produção de ácido fórmico (g/L)
- $C_{pep}$  - concentração dos peptídeos
- DCU – *Danisco Culture Units*
- $K_{Hla}$  - parâmetro de inibição de ácido láctico não dissociado
- $K_{La}$  - parâmetro de inibição do lactato (L/g).
- $K_N$  - constante de Monod para as fontes de nitrogênio
- $K_C$  - constante Monod para as fontes de carbono (g/L)
- $K_f$  - metabólitos produzidos por *L. bulgaricus* do modelo de Monod ( $\mu gL^{-1}$ )
- $K_{pep}$  - metabólitos produzidos por *L. bulgaricus* do modelo de Monod ( $\mu gL^{-1}$ )
- $Q_0$  - estado fisiológico inicial das células (adimensional)
- $T_{m\acute{a}x,i}$  - temperatura teórica de crescimento máximo (°C)
- $T_{m\acute{i}n,i}$  - temperaturas teóricas de crescimento mínimo (°C)
- $T_{opt,i}$  - temperatura teórica de crescimento ótimo (°C)
- $X_i$  - concentração de biomassa (g/L)
- $f_T^i$  - função de temperaturas cardinais (CTM)
- $f_{pH}^i$  - uma função de pH cardinais (CPM)
- $pH_{m\acute{a}x,i}$  - pH teóricos de crescimento máximo
- $pH_{m\acute{i}n,i}$  - pH teórico de crescimento mínimo
- $pH_{opt,i}$  - pH teórico de crescimento ótimo
- $pH_{opt}$  - pH ótimo na função de pH
- $y_{max}$  - logaritmo da concentração máxima de células (log UFC/g)

$K_p$  - segundo parâmetro de inibição do ácido láctico (L/g)

$R$  - constante universal dos gases (8,314 kJ/g.mol/K)

$R^2$  - Coeficiente de determinação

RMSE - (*Root mean squared error*) Raiz do Erro Quadrático Médio

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

$W$  - efeito da *S. thermophilus* sobre a *L. bulgaricus* (adimensional)

$Z$  - efeito da *S. thermophilus* sobre a *L. bulgaricus* (adimensional)

## LISTA DE SÍMBULOS

$\mu_{m\acute{a}x}$  - velocidade máxima específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

$\mu_{opt,i}$  - é a velocidade específica ótima de crescimento ( $h^{-1}$ )

$\Delta E_a$  - variação da energia de ativação (kJ/g.mol)

$\Delta G_a$  - energia livre de efeito da temperatura no crescimento (kJ/g.mol)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 INGREDIENTES .....	14
2.1.1 Escala Laboratorial .....	14
2.1.2 Escala Industrial.....	15
2.2 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE IOGURTE .....	15
2.2.1 Escala laboratorial.....	15
2.2.2 Escala Industrial.....	16
2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS .....	16
2.3.1 Determinação do pH .....	16
2.3.2 Determinação da acidez.....	16
2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS.....	17
2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	18
2.5.1 Validação da Modelagem Matemática.....	21
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) recomenda a adoção de uma alimentação saudável para a melhoria do bem-estar, expectativa e qualidade de vida (FAO, 2013). Em consequência disso, há uma crescente procura por alimentos nutricionalmente ricos, como é o caso do leite e seus derivados. O leite, segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), de 29 de março de 2017, deve ser composto por, no mínimo, 3 g de gordura, 2,9 g de proteína, 4,3 g de lactose, 8,4 g de sólidos não gordurosos e 11,4 g de sólidos totais por 100 g de leite (SILVA et al, 2014; BRASIL, 2017).

Com a finalidade de garantir a qualidade, a segurança dos alimentos e maior tempo de vida útil do leite, a Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 determina que seja feita a inativação de microrganismos patogênicos não esporulados presentes na matéria-prima destinada para consumo e também para a fabricação dos derivados lácteos. Esse processo é denominado pasteurização, o qual utiliza como parâmetro térmico a destruição de bactérias termorresistentes, como é o caso da *Mycobacterium tuberculosis* e da *Coxiella burnetii*. Além disso, para produtos fermentados, a pasteurização serve para inibir a competição com as bactérias ácido-láticas (BAL), o que favorece a fermentação (BRASIL, 2018, ORDÓNEZ et al., 2005).

Dentre os produtos lácteos, o iogurte é muito apreciado por possuir grande variedade de sabor e textura, capaz de agradar os mais diversos paladares. Para a fabricação do iogurte deve-se seguir o que determina o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) descrito na Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, que define iogurte como sendo o produto oriundo da fermentação realizada com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. E, de forma complementar, podem ser utilizadas outras bactérias ácido lácticas para contribuição das características finais desejadas (BRASIL, 2007).

A proporção quantitativa das culturas *starter* não é definida em regulamentos, porém, existem vários estudos sobre a razão adequada entre microrganismos para a produção do iogurte. Algumas referências do equilíbrio inicial da cultura *starter* na literatura propõe uma variação de cocos:bacilos de 1:1, 2:1 (BRANDÃO, 1995) ou 2:3 (SPREER, 2011), contudo essa proporção não é fixa, ficando a critério dos fabricantes

das bactérias iniciadoras. Outro ponto que pode variar conforme a tecnologia empregada é a concentração da cultura *starter* necessária para a produção de iogurte, a exemplo disso, a Chr. Hansen estabelece uma proporção de 1 U para 5 L de leite ou mistura láctea. Além disso, as condições de temperatura, acidez e tempo durante a fermentação e o armazenamento podem mudar a proporção bacteriana viável e as características físico-químicas e sensoriais do produto final (MARTIN, 2002).

O processo fermentativo do iogurte se inicia através da atividade da bactéria *S. thermophilus* devido ao pH do leite ser próximo do seu ideal (em torno de 6,8). Esta apresenta como produtos metabólicos o ácido fórmico e o ácido fólico, consumindo oxigênio e gerando dióxido de carbono. Sua condição de temperatura ótima varia entre 35 e 42 °C. Como consequência dessa fermentação, observa-se uma escassez de oxigênio e uma acidificação do leite, o que o torna mais propenso para a atividade da *L. bulgaricus*, cujo pH ótimo é próximo de 5,8. A geração de oligossacarídeos nessa segunda ação bacteriana propicia a biossíntese da *S. thermophilus*. Essa troca de metabólitos mostra o processo denominado protocooperação, pois em conjunto, elas se desenvolvem melhor e produzem mais ácido láctico em menor tempo quando comparado aos cultivos isolados. A fermentação simultânea também proporciona melhores características ao produto final, como maior viscosidade, maior estabilidade e maior liberação de compostos aromáticos (como acetaldeído e diacetil). Diferentemente da primeira bactéria, a temperatura ótima para a *L. bulgaricus* está entre 43 a 46 °C. Contudo, atualmente, os laticínios optam por uma incubação isotérmica próxima a 42 °C no processo de fermentação, considerando assim um meio-termo entre as temperaturas ótimas das duas espécies (MICHAEL, SANDINE, 1986; SIEUWERTS, SANDER, 2016; MOON, REINBOLD, 1993, ORDÓNEZ et al., 2005).

Quanto às características do iogurte, o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) exige que o produto apresente, até o último dia de validade, acidez entre 0,6 a 1,5 g de ácido láctico/100 g de produto e contagem de bactérias lácticas totais de, no mínimo,  $10^7$  UFC/g (BRASIL, 2007). Essa disposição se faz necessária porque, durante o prazo de validade (*shelf-life*), deve-se garantir que qualquer produto alimentício esteja seguro para o consumo, além de conferir as propriedades nutricionais, sensoriais e microbiológicas desejadas. Esse intervalo de tempo é determinado através de análises e estudos preditivos, os quais simulam do alimento nas condições de armazenamento em que ele é submetido (ANVISA, 2018).

No decorrer da vida útil, algumas alterações são observadas no iogurte, como o surgimento de sabor amargo devido à hidrólise das proteínas (TAMINE, ROBINSON, 1988) e a redução da consistência (O'NEIL et al. 1979). Sua validade pode ser reduzida ainda mais quando este permanece sob condições inadequadas de temperatura, sendo que a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 permite armazenamento de no máximo 10 °C (BRASIL, 2007). Estas condições térmicas adversas podem acelerar reações de deterioração, contribuir para o desenvolvimento de bactérias psicrófilas (MORENO, KOSIKOWSKI, 1973) e reativar o processo fermentativo das bactérias ácido lácticas provocando alterações indesejáveis. Uma delas é o aumento da acidez além de 1,5 g ácido láctico/100 g, o que ocasionaria mudanças nas características sensoriais do produto, podendo desagradar alguns paladares.

Tendo em vista que as circunstâncias de produção do iogurte utilizadas atualmente não oferecem as temperaturas ótimas para nenhuma das duas bactérias iniciadoras, tem-se um pressuposto de que o tempo de fermentação poderia ser melhorado. Isso porque seria possível proporcionar uma situação para que cada uma das BAL atingissem seu potencial máximo de reprodução e atividade através da aplicação de uma incubação não-isotérmica. Uma pesquisa conduzida por Abraham et al (1993) também sugere a hipótese levantada, pois em seus resultados as culturas iniciadoras do iogurte deviam ser incubadas a temperaturas mais baixas para se obter uma concentração mais elevada de protease, o que corresponde à faixa ótima de *S. thermophilus*.

Para colaborar com a melhoria do processo de produção e vida útil do iogurte, a microbiologia preditiva pode ser utilizada como uma ferramenta para controlar e otimizar o tempo e as condições do processo fermentativo (VAN IMPE et al. 1995). Ela possibilita o entendimento, de forma mais assertiva, do crescimento dos microrganismos como uma resposta diante do meio em que estão inseridos (BARANYI; ROBERTS, 1995). Isso é possível graças aos modelos matemáticos de inativação e crescimento microbiano, os quais são desenvolvidos e testados exaustivamente sobre condições experimentais controladas (BUCHANAN, 1993).

Os modelos utilizados na microbiologia preditiva receberam uma proposta de classificação por Whiting e Buchanan (1993) em três níveis: primário, secundário e terciário. No modelo primário, são avaliadas as respostas de microrganismos sob uma condição controlada de teste em relação ao tempo, podendo ser a densidade

populacional microbiana, concentração de metabólitos, entre outros. Esse modelo permite estimar parâmetros, como fase de adaptação do organismo em um novo ambiente (fase de *lag*), velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) ou de maneira complementar, a velocidade de inativação na condição analisada. O modelo secundário, por sua vez, descreve a interferência das condições ambientais sobre um ou mais parâmetros de um modelo primário. Este permite calcular, por exemplo, modelos de superfície de respostas para os parâmetros estimados no primeiro modelo diante de mudanças de temperatura, pH e atividade de água. Já os modelos terciários são obtidos pela combinação dos modelos primários e secundários, e são capazes de prever o crescimento microbiano sob condições ambientais variáveis ou dinâmicas utilizando para isso algoritmos, como por exemplo, oscilações de temperatura em função do tempo (BARANYI, ROBERTS, 1995). Por este motivo, a microbiologia preditiva também é usada para determinação de prazo de validade dos produtos alimentícios simulando as condições de armazenamento (BARANYI, ROBERTS, 1994).

Verificou-se uma carência de modelos preditivos na literatura descrever o crescimento de bactérias ácido-láticas em culturas mistas, com interação de mutualismo e protocoperação. Portanto, este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo geral propor e validar um modelo matemático capaz de descrever e prever o crescimento das bactérias em função da temperatura, do pH e da simbiose da cocultura durante a fermentação do iogurte.

Para atingi-lo foram definidos os seguintes objetivos específicos: obter dados experimentais das cinéticas de crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em culturas puras e cocultura em diferentes condições; propor um modelo matemático dinâmico para descrever o crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em culturas puras e cocultura em função das diferentes condições; estimar os parâmetros dos modelos matemáticos; quantificar o crescimento das espécies durante a produção de iogurte em quatro experimentos em escala laboratorial e em dois experimentos em escala industrial; validar o modelo dinâmico proposto a partir dos dados experimentais nas escalas laboratorial e industrial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados em escala laboratorial no Laboratório de Módulos Didáticos (LAMODI) da UFPR – Campus Avançado de Jandaia do Sul, e em escala industrial na CONFEPAR Agro-Industrial Cooperativa – Londrina, Paraná.

Dados experimentais de dois artigos da literatura foram fornecidos pelos seus autores e utilizados neste trabalho: *Developing a detailed kinetic model for production of yogurt starter bacteria in single strains cultures* (AGHABABAIE et al., 2014) e *Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation* (AGHABABAIE et al., 2015). Neles, os autores propõem um modelo de crescimento das bactérias ácido-láticas, baseado em fundamentos de biotecnologia, que considera o efeito do pH, temperatura, ácido láctico, concentração de carbono e nitrogênio no desenvolvimento das culturas iniciadoras. Os dados experimentais foram encaminhados pela autora após serem solicitados.

Além desses dois artigos, foram utilizados dados da dissertação de Giuseppina Anna Luzzi (LUZZI, 2020) intitulada *Influence of Yogurt and Cheese Reformulation Strategies on Microbial ecology and Product Characteristics* e, para aquisição dos dados experimentais a partir dos gráficos apresentados como resultados ao longo da dissertação, foi utilizado o *WebPlotDigitizer* (ROHATGI, 2020).

Os dados disponíveis no Capítulo 10 *Cultures and starter manufacture* do livro *Dairy Processing Handbook*, da Tetra Pak, que trata das BAL e da produção de fermentados lácteos, também foram utilizados.

As simulações e aplicações dos modelos foram realizados em planilhas eletrônicas do *software Excel*, com auxílio do suplemento *Solver*.

### 2.1 INGREDIENTES

#### 2.1.1 Escala Laboratorial

Leite cru não padronizado foi adquirido de uma propriedade rural de Jandaia do Sul (PR), sendo que cada experimento foi realizado com leite ordenhado em diferentes dias. Cada experimento em bancada foi elaborado com 2 L de leite cru, 240 g açúcar cristal e 82 g leite em pó. E 0,0214 g de fermento liofilizado composto

pelas bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Danisco cultures, YO-MIX™ 499 LYO 100 DCU) foi doado pelo Laticínio Volpato (Arapongas, PR).

### 2.1.2 Escala Industrial

Para cada produção de iogurte foram utilizados 1.300 L de leite integral padronizado e homogeneizado, 12,5 kg de leite em pó desnatado (marca Cativa), 37,5 kg de soro de leite em pó (marca Cativa), 1.075 L de água (para reconstituição do soro e do leite em pó), 255 kg de açúcar cristal (marca Globo), 11 kg de estabilizante (marca Ashland), e 10 kg de amido (marca Gemacom). Além disso, também foram utilizados 3 sachês de fermento liofilizado YOFLEX® Mild 1.0 de 200 U cada (marca CHR HANSEN).

## 2.2 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE IOGURTE

### 2.2.1 Escala laboratorial

Para cada experimento, foi utilizado um béquer de vidro de 2 L para conter a mistura dos ingredientes no qual este era submetido a agitação manual constante com um bastão de vidro até completa homogeneização. A mistura foi submetida a um tratamento térmico (90 °C por 5 min) em um banho-maria com circulação de água (marca Nova Técnica, modelo NT 249). Em seguida, o leite foi resfriado até a temperatura inicial de cada experimento em escala laboratorial (EEL) (38,5 °C, 42 °C, 44,5 °C e 38,7 °C, codificados como EEL1, EEL2, EEL3 e EEL4, respectivamente) no mesmo equipamento pela substituição da água quente por água fria. Então, 0,0214 g de cultura iniciadora (equivalente a 0,2 DCU), quantificado em balança analítica (Bioscale, modelo), foi adicionada à mistura sob agitação manual. As temperaturas (centro da amostra, paredes internas e externa do béquer, e água do banho) foram monitoradas durante todo o processo, a cada 5 s, com sensores de temperatura do tipo bastão (modelo PS – 2143, *Pasco Capstone*). Amostras para as análises microbiológicas e físico-químicas foram coletadas no início do processo e em intervalos sucessivos de 30 min até o término da fermentação.

### 2.2.2 Escala Industrial

Um maturador com capacidade de 5.000 L foi utilizado para conter a mistura dos ingredientes e realizar o tratamento térmico a 92,6 °C por 10 min. Na sequência, o conteúdo foi resfriado a 43,1 °C através da circulação de água gelada na camisa do maturador para a inoculação do fermento para o qual foi realizada agitação mecânica de baixa rotação por 10 min a 40 rpm. A temperatura da mistura foi monitorada durante todo o processo, a cada 5 s, com um sensor de temperatura do tipo PT100 (Thermomax, Classe A). Amostras para as análises microbiológicas e físico-químicas foram coletadas no início do processo e em intervalos sucessivos de 30 min até o término da fermentação.

## 2.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

### 2.3.1 Determinação do Ph

O pH das amostras foi quantificado por imersão de eletrodo de pH conectado a um pH-metro de bancada (escala laboratorial: marca MS TECNOPON-Instrumentação científica, modelo Mpa-210; escala industrial: OHAUS, Starter 300) a cada 30 min de incubação.

### 2.3.2 Determinação da acidez

O procedimento foi realizado segundo as instruções contidas no Manual de Métodos Oficiais para Análises de Alimentos de Origem Animal (BRASIL, 2019). Desta forma, foram coletadas 20 mL de amostra a cada 30 min. Em seguida foram transferidos a um Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de água para diluição e adicionado 2 mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (utilizada como indicador). Essa mistura foi titulada em bureta manual com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L padronizada até a primeira coloração rosa forte, semelhante ao padrão (solução de 100 µL de fucsina, 20 mL de amostra e 40 mL de água), persistente por aproximadamente 30 s. Os resultados de acidez foram calculados com a Equação (1) e expressos em *gramas de ácido láctico por 100 gramas de amostra*, onde  $V$  é o volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L gasto na titulação (mL); 20 é o volume da

amostra, em mL;  $f$  é o fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L; 0,009 é o fator de correção do ácido láctico; 0,1 é a molaridade de solução de hidróxido de sódio. O resultado da acidez titulável é expresso como uma casa decimal.

$$\text{Acidez em g de ácido láctico /100 g} = \frac{V \cdot f \cdot 0,1 \cdot 0,09 \cdot 100}{20} \quad (1)$$

## 2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS

Os procedimentos foram realizados em conformidade com as normas da *International Organization for Standardization* (ISO).

Para a Contagem Bacteriana Total (CBT) foi observada a ISO 4833:2003 utilizando o Agar Padrão para Contagem (PCA) (*Plate Count Agar*, Milipore), preparado pela diluição de 22,5 g em 1000 mL de água destilada. Já para a quantificação de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* foi observada a ISO 7889:2003 utilizando o Agar MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*, Milipore), preparado pela diluição de 68,2 g em 1000 mL de água destilada, e o Agar M17 (TM Media), preparado pela diluição de 33,25 g em 1000 mL de água destilada, respectivamente.

Inicialmente, cada agar foi diluído em água destilada e aquecido até temperatura de ebulição e, em seguida, resfriado a 25 °C. O ajuste do pH dos meios de cultivo foi realizado com ajuda de um pH-metro, com a adição de ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) ao Agar MRS até obtenção do pH 5,4 (± 0,1) a 25 °C (± 1 °C), e com a adição de hidróxido de sódio (NaOH, marca Cap Lab) 0,1 mol/L ao Agar M17 até obtenção do pH 6,8 (± 0,1) a 25 °C (± 1 °C). Após o ajuste do pH, os meios foram autoclavados a 121 °C (± 1 °C) por 15 min. Então, os frascos com os meios foram resfriados e mantidos a 45 °C até a sua utilização.

A diluição inicial (10<sup>-1</sup>) para três experimentos em escala laboratorial e para o primeiro experimento em escala industrial foi realizada utilizando 1 mL da amostra diluída em 9,0 mL de solução salina peptonada (0,1%). A diluição inicial (10<sup>-2</sup>) para o primeiro experimento em escala laboratorial foi realizada utilizando 0,1 mL da amostra diluída em 9,9 mL de solução salina peptonada (0,1%). Para a diluição inicial do segundo experimento em escala industrial, a diluição inicial foi realizada a partir de 25 g da amostra adicionada em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. Em todos os casos, a mistura (amostra + água peptonada) foi homogeneizada por

aproximadamente 60 s em vortex (escala laboratorial: marca FISATOM, modelo 772, potência de 40 W; escala industrial: marca Cap Lab - Biomixer).

Em um planejamento experimental prévio foram determinadas as três diluições a serem utilizadas a partir das amostras coletadas a cada 30 min de experimento. Um mL de cada amostra foi despejada em placas de Petri estéreis de 9 cm de diâmetro e, em seguida, foram adicionados cerca de 15 a 20 mL de ágar (PCA para a escala laboratorial; PCA, MRS ou M17 para a escala industrial) em cada placa. Após a semeadura, foi realizada a homogeneização pela técnica de profundidade (*pour plate*) e deixada as placas solidificarem em superfície plana para depois serem invertidas e incubadas a 37 °C por 48 h (meios PCA e M17) ou 72 h (meio MRS). No segundo experimento em escala industrial, as amostras foram plaqueadas em profundidade e com dupla camada para todos os tipos de meio; além disso, o MRS foi incubado envolto em plástico filme.

A contagem de colônias foi feita manualmente, considerando toda a superfície da placa. Os resultados foram expressos em UFC/mL levando-se em conta a diluição empregada e a Equação (2) onde  $N$  é o valor numérico da quantidade de microrganismos característicos por mL da amostra teste;  $C$  é o valor numérico da soma das colônias nas placas contadas;  $n$  é a diluição da placa

$$N = C10^n \quad (2)$$

## 2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

A Equação (3), que se trata do modelo logístico de Gibson et al. (1987) adaptado de Gompertz (1825), foi ajustada aos dados experimentais de pH, onde  $pH(t)$  (adimensional) é o valor do pH no tempo  $t$  (h),  $A$  (adimensional),  $C$  (adimensional),  $B$  ( $h^{-1}$ ) e  $M$  (h) são parâmetros empíricos. A partir desta equação foi possível determinar o valor teórico do pH a qualquer tempo durante a fermentação.

$$pH(t) = A + C \exp\{-\exp(-B(t - M))\} \quad (3)$$

O modelo dado pela Equação (4), de acordo com AGHABABAIE et al. (2014), descreve uma cinética de primeira ordem com a influência de cada fator  $j$  no crescimento da bactéria  $i$  ( $f_j^i$ ), entre eles a temperatura ( $f_T^i$ ), o pH ( $f_{pH}^i$ ), as concentrações de carbono ( $f_C^i$ ), de nitrogênio ( $f_N^i$ ), de lactato ( $f_{La}^i$ ) e de ácido láctico ( $f_{Hla}^i$ ).  $X_i$  é a concentração de biomassa (g/L) e  $t$  é o tempo (h).

$$\frac{dX_i}{dt} = \mu_{m\acute{a}x}^i f_T^i f_{pH}^i f_C^i f_N^i f_{La}^i f_{Hla}^i X_i \quad (4)$$

Essa abordagem de Engenharia Bioquímica usa como base a Teoria dos Obstáculos de Leistner e Gorris (1995) por ser composta por funções cujos fatores são os responsáveis por modular a dinâmica de multiplicação e sobrevivência dos microrganismos em alimentos, como mostra as Equações (5) a (10) (AGHABABAIE et al., 2014). Nestas equações,  $\Delta E_a$  é a variação da energia de ativação do efeito da temperatura no crescimento (kJ/g.mol),  $R$  é a constante universal dos gases (8,314 kJ/g.mol/K),  $T$  é a temperatura (K),  $A$  é a constante na função de temperatura (adimensional),  $e$  é o número de Euler,  $\Delta G_a$  é a energia livre de efeito da temperatura no crescimento (kJ/g.mol),  $pH_{opt}$  é o pH ótimo na função de pH,  $C_1, C_2, C_3$  são respectivamente o primeiro, segundo e terceiro coeficientes de efeito do pH na taxa de crescimento,  $C_{SC}$  é a concentração do substrato de carbono (g/L),  $K_C$  é a constante Monod para as fontes de carbono (g/L),  $C_{SN}$  é a concentração de substrato de nitrogênio (g/L),  $K_N$  é a constante de Monod para as fontes de nitrogênio,  $K_P$  é o segundo parâmetro de inibição do ácido láctico (L/g),  $C_{Hla}$  é a concentração do ácido láctico não dissociado (g/L),  $K_{Hla}$  o parâmetro de inibição de ácido láctico não dissociado,  $C_{La}$  é a concentração do íon lactato (g/L), e  $K_{La}$  o parâmetro de inibição do lactato (L/g).

$$f_T = \frac{e^{-\left(\frac{\Delta E_a}{RT}\right)}}{1 + Ae^{-\left(\frac{\Delta G_a}{RT}\right)}} \quad (5)$$

$$f_{pH} = \frac{C_1(pH_{opt} - pH)^2 + C_2}{(pH_{opt} - pH)^2 + C_3} \quad (6)$$

$$f_C = \frac{C_{SC}}{C_{SC} + K_C} \quad (7)$$

$$f_N = \frac{C_{SN}}{C_{SN} + K_N} \quad (8)$$

$$f_{Hla} = \left( \frac{1}{1 + 10^{K_P(C_{Hla} - K_{Hla})}} \right) \quad (9)$$

$$f_{La} = e^{-K_{La} \cdot C_{La}} \quad (10)$$

Com a finalidade de modelar os resultados experimentais expressos em UFC/mL ao invés de g/L, no contexto da microbiologia preditiva, a modelagem

matemática foi realizada com o modelo primário de BARANYI E ROBERTS (1994), Equações (11) e (12), onde  $y$  é o logaritmo da concentração momentânea da população ( $N$ , em UFC/mL) em relação ao tempo  $t$  (h),  $Q_0$  está relacionado com o estado fisiológico inicial das células (adimensional), e  $y_{max}$  o logaritmo da concentração máxima de células. As equações diferenciais têm as seguintes condições iniciais:  $y(0) = y_0$  e  $Q(0) = Q_0$ . Para expressar a dependência do parâmetro  $\mu_{máx}^i$  do modelo de Baranyi e Roberts (1994) com a temperatura e o pH, o modelo secundário proposto por ROSSO et al (1995) (*Cardinal Temperature and pH Model*, CTPM) com suas funções  $f_j^i$  foi utilizado. Este modelo é composto integralmente por parâmetros com significado biológico, como mostram as Equações (13) a (15), onde  $f_T^i$  é uma função de temperaturas cardinais (CTM) e  $f_{pH}^i$  uma função de pH cardinais (CPM);  $\mu_{opt,i}$  é a velocidade específica ótima de crescimento;  $T_{min,i}$ ,  $T_{opt,i}$  e  $T_{máx,i}$  são as temperaturas teóricas de crescimento mínimo, ótimo e máximo, respectivamente;  $pH_{min,i}$ ,  $pH_{opt,i}$  e  $pH_{máx,i}$  são os pH's teóricos de crescimento mínimo, ótimo e máximo, respectivamente

$$\frac{dy_i}{dt} = \left( \frac{1}{1 + e^{-Q_i}} \right) \frac{\mu_{máx}^i}{\ln 10} (1 - e^{y_i - y_{max,i}}) \quad (11)$$

$$\frac{dQ_i}{dt} = \frac{\mu_{máx}^i}{\ln 10} \quad (12)$$

$$\mu_{máx}^i = \mu_{opt}^i f_T^i f_{pH}^i \quad (13)$$

$$f_T^i = \frac{(T - T_{máx}^i)(T - T_{min}^i)^2}{(T_{opt}^i - T_{min}^i) [(T_{opt}^i - T_{min}^i)(T - T_{opt}^i) - (T_{opt}^i - T_{máx}^i)(T_{opt}^i - T_{min}^i - 2T)]} \quad (14)$$

$$f_{pH}^i = \frac{(pH - pH_{min}^i)(pH - pH_{máx}^i)}{(pH - pH_{min}^i)(pH - pH_{máx}^i) - (pH - pH_{opt}^i)^2} \quad (15)$$

A interferência positiva da protocooperação entre as bactérias foi quantificada inicialmente por Aghababaie et al. (2014) utilizando para isso equações baseadas no modelo de Monod (1942) descritos nas Equações (16) e (18), considerando para isso a concentração dos peptídeos ( $C_{pep}$ ) e os aminoácidos produzidos a partir da proteína do soro do leite pela atividade proteolítica de *L. bulgaricus* as quais estimulam o crescimento de *S. thermophilus* (Equação 17). O efeito contrário também é ponderado na modelagem, no qual a produção de ácido fórmico ( $C_f$ ) e dióxido de carbono pela *S.*

*thermophilus* são responsáveis por reduzir o pH médio do leite o que proporciona melhores condições de desenvolvimento para a *L. bulgaricus*.

Nesse sentido, a Equação (19) descreve a taxa de acúmulo de ácido fórmico, a qual não considera o efeito do dióxido de carbono o qual se dissocia em  $\text{HCO}^{-3}$  e  $\text{HCO}^{-2}$ . Dessa forma, a Equação (19) descreve o efeito dos metabólitos produzidos por *S. thermophilus* sobre o *L. bulgaricus* a partir do modelo de Monod. Por fim, a Equação (20) descreve o crescimento em condições dinâmicas de cada espécie  $i$  em fermentações de cocultura  $c$ , em que a função  $f_k^i$  (adimensional) descreve o efeito simbiótico da espécie  $k$  na taxa de crescimento específica da espécie  $i$ .

$$f_L^S = Z \frac{C_{pep}}{C_{pep} + K_{pep}} \quad (16)$$

$$\frac{dC_{pep}}{dt} = g_{pep} \frac{dX_m^S}{dt} \quad (17)$$

$$f_S^L = W \frac{C_f}{C_f + K_f} \quad (18)$$

$$\frac{dC_f}{dt} = g_f \frac{dX_m^S}{dt} \quad (19)$$

$$\frac{dy_c^i}{dt} = \frac{dy_p^i}{dt} f_k^i \quad (20)$$

Onde  $Z$  (adimensional) é o parâmetro que descreve o efeito da *S. thermophilus* sobre a *L. bulgaricus*,  $K_{pep}$  ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) é um parâmetro do modelo de Monod para metabólitos produzidos por *L. bulgaricus*,  $W$  (adimensional) é o parâmetro da função que descreve o efeito da *S. thermophilus* sobre a *L. bulgaricus*,  $K_f$  ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) é o parâmetro do modelo de Monod para a quantificação dos metabólitos produzidos por *L. bulgaricus*.

### 2.5.1 Validação da Modelagem Matemática

Como forma de comprovar a assertividade dos modelos preditivos diante dos dados experimentais, é necessário ter medidas quantitativas para confrontar os resultados preditos com os observados. Dessa forma, é possível validar o modelo e habilitá-lo para ser usado como ferramenta na indústria de alimentos, como:

implementação de HACCP, avaliação de risco microbiano além da determinação da vida útil dos produtos acabados (Baranyi et al, 1999).

Para isso, é necessário buscar indicadores para a qualidade do modelo, Baranyi et al (1999) modificaram os fatores *Bias* ( $B_f$ ) e *Accuracy* ( $A_f$ ) propostos por Ross (1996) a fim de obter um indicador capaz de comparar resultados contínuos de velocidade de crescimento máxima sob condições ambientais variáveis (Equações 21 a 24).

$$\%D_f = (A_f - 1) 100\% \quad (21)$$

$$A_f = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\ln y_{predito,i} - \ln y_{observado,i})^2}{n}}\right) \quad (22)$$

$$\%B_f = \text{sgn}(\ln B_f) (\exp|\ln B_f| - 1) 100\% \quad (23)$$

$$B_{f,g} = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^n (\ln y_{predito,i} - \ln y_{observado,i})}{n}\right) \quad (24)$$

Onde  $f$  é o vetor dos fatores ambientais cujos efeitos são modelados por  $\%D_f$  a discrepância discreta em porcentagem entre o observado e o modelado, e  $\%B_f$  o percentual de tendência entre o observado e o modelado.

Para o parâmetro  $\%D_f$  valores iguais a zero são desejados, pois significam que os resultados obtidos pelo modelo são exatamente os observados experimentalmente. Dessa forma, quanto mais distante de zero for  $\%D_f$ , maior o erro dos resultados que estão sendo comparados.

Por sua vez, um  $\%B_f$  maior que zero indica que o modelo está superestimando os dados reais, ou ainda quando  $\%B_f$  for menor que zero o modelo está subestimando os dados. O desejado é que  $\%B_f$  seja igual a zero indicando uma excelente capacidade preditiva com valores reais (sem diferença).

Além desses, serão usados para validação do modelo os parâmetros Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e Raiz do Erro Quadrático Médio (RMSE) do inglês *Root mean squared error*.

O Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é a medida descritiva da qualidade do ajuste obtido, ou seja, indica o quanto o modelo foi capaz de explicar os dados coletados. É dado pela soma dos quadrados da regressão (SQR) e a soma dos

quadrados total (SQT) (Equação 25), sendo que  $0 \leq R^2 \leq 1$  e quando  $R^2 = 1$  seria o ajuste perfeito.

$$R^2 = \frac{SQR}{SQT} = 1 - \frac{SQR}{SQT} = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2} \quad (25)$$

Já o RMSE mostra as diferenças individuais entre a previsão do modelo ( $p_n$ ) e as observações ( $o_n$ ), onde  $n$  é o total de comparações. Elevando as diferenças ao quadrado força a tratar igualmente os resultados negativos e positivos. Mede o erro total (sistemáticos e randômicos). É utilizado para medir a magnitude do erro. (Equação 26), dessa forma, o parâmetro não permite identificar se o modelo está subestimando ou superestimando os dados reais porque o erro é elevado ao quadrado. Contudo, mesmo diante disso, o RMSE é muito utilizado para análise de dados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (p_n - o_n)^2} \quad (26)$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos matemáticos (Equações (11) a (15)) apresentaram ótimos ajustes aos dados experimentais das culturas puras de *L. bulgaricus* (FIGURA 1) e *S. thermophilus* (FIGURA 2), com valores de RMSE iguais a 0,091 log UFC/mL e 0,135 log UFC/mL, respectivamente. Os parâmetros estimados nos ajustes são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – PARÂMETROS ESTIMADOS NO AJUSTE DOS MODELOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO (EQUAÇÕES 11 A 13) AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO DE *S. thermophilus* E *L. bulgaricus* EM CULTURAS PURAS EM CONDIÇÕES CONSTANTES.

Microrganismo	$\mu_{opt}$	$T_{min}$	$T_{opt}$	$T_{max}$	$pH_{min}$	$pH_{opt}$	$pH_{max}$	$h_0$	$y_{max}$
<i>S. thermophilus</i>	2,41	16,0	41,0	54,9	3,15	7,40	8,59	0,94	9,44
<i>L. bulgaricus</i>	2,43	21,2	43,4	53,5	3,67	4,90	9,19	1,45	8,37

FONTE: A Autora, 2021.

Quando comparamos os valores de  $\mu_{opt}$  e  $pH_{opt}$  obtidos neste estudo com os valores obtidos por Aghababaie et al. (2014) (Tabela 2), podemos perceber uma

diferença que pode ser explicada, principalmente, pelas bases diferentes dos dados experimentais (g/L e UFC/mL) dos quais os parâmetros foram estimados. Além disso, diferenças nos valores das funções ( $f$ ) foram observadas e serão discutidas posteriormente.

Vale destacar que a capacidade metabólica de uma bactéria em um biorreator é máxima, pois esse ambiente possibilita controlar a temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, de modo a fornecer uma condição extracelular estável, sem oscilações e sem necessidade do microrganismo se adaptar constantemente, promovendo assim a maximização do seu desenvolvimento (YEGOROV et al, 2019). Esse cenário só é possível em escala laboratorial, pois nos ambientes naturais, as bactérias são expostas a todo momento a alterações (sucessivas fases de adaptação) necessitando com que as células microbianas adaptem continuamente seu funcionamento, o que se torna um problema de otimização da velocidade de crescimento em condições dinâmicas (BARANYI, ROBERTS, 1994). Podemos então resumir que, para a microbiologia preditiva, existem duas realidades distintas: a velocidade de crescimento exponencial máxima em condições reais e a velocidade de crescimento exponencial máxima em condições ótimas, como em biorreatores.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE VELOCIDADE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO ÓTIMO ( $\mu_{opt}$ ) E PH ÓTIMO ( $pH_{opt}$ ) EM CULTURA PURA DE *S. thermophilus* E *L. bulgaricus* ESTIMADOS NESTE ESTUDO E POR AGHABABAIE ET AL. (2014).

	Este trabalho		Aghababaie et al. (2014),	
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
$\mu_{opt}$ ( $h^{-1}$ )	2,41	2,43	1,95	1,77
$pH_{opt}$	7,40	4,90	6,87	5,24

FONTE: A Autora, 2021.

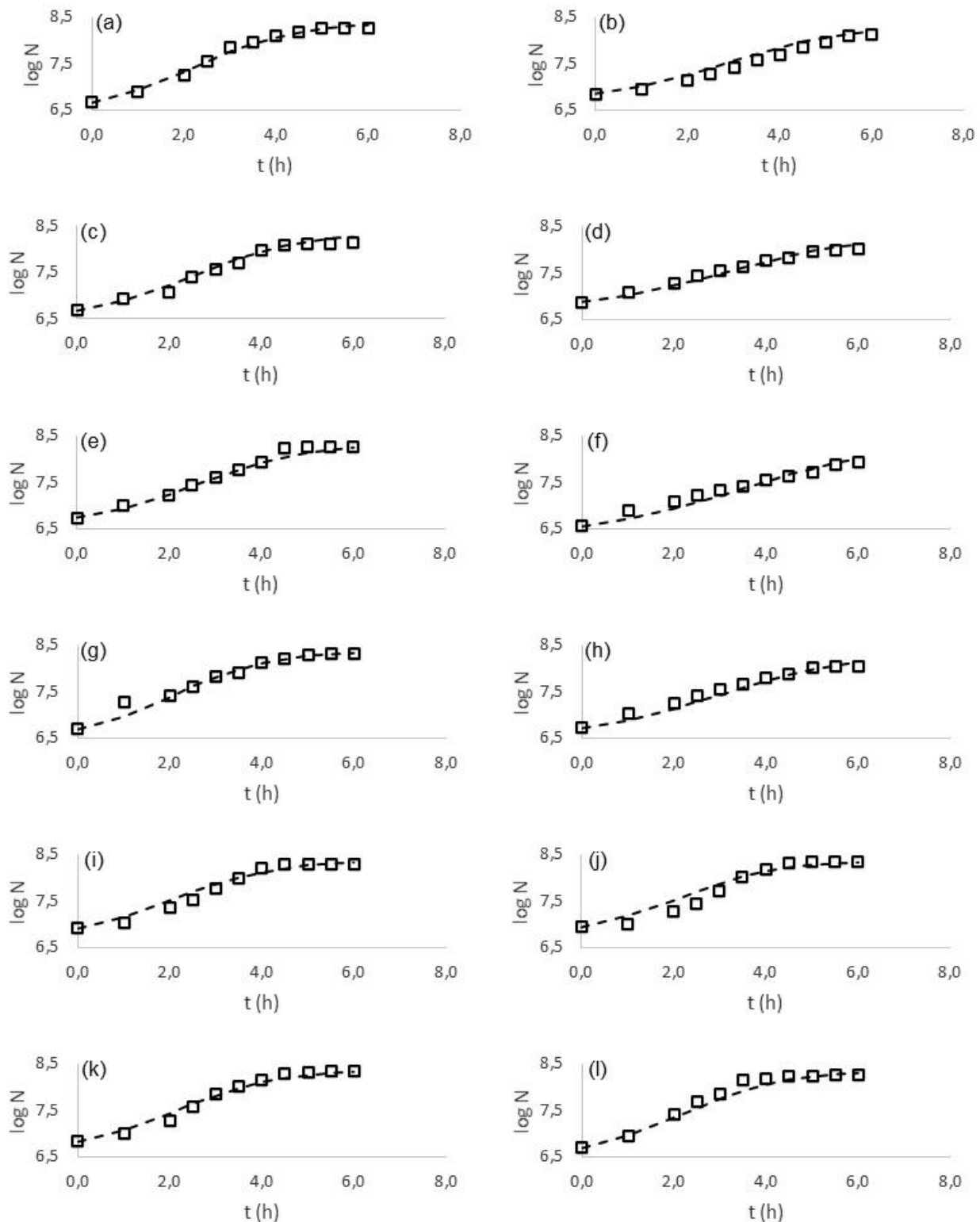
Os modelos matemáticos (Equações (16) a (19)) apresentaram bons ajustes aos dados experimentais da cultura mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (FIGURA 3) sob temperatura e pH controlados, com RMSE igual a 0,298 log UFC/mL. Os parâmetros estimados nos ajustes são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - PARÂMETROS ESTIMADOS A PARTIR DO AJUSTE DOS MODELOS DAS EQUAÇÕES 16 A 19) AOS DADOS EXPERIMENTAIS DE *L. bulgaricus* E *S. thermophilus* EM CULTURA MISTA.

Microrganismo	$g$	$K$	$Z$ ou $W$
<i>S. thermophilus</i>	0,84	2,89	4,68
<i>L. bulgaricus</i>	2,60	0,74	1,52

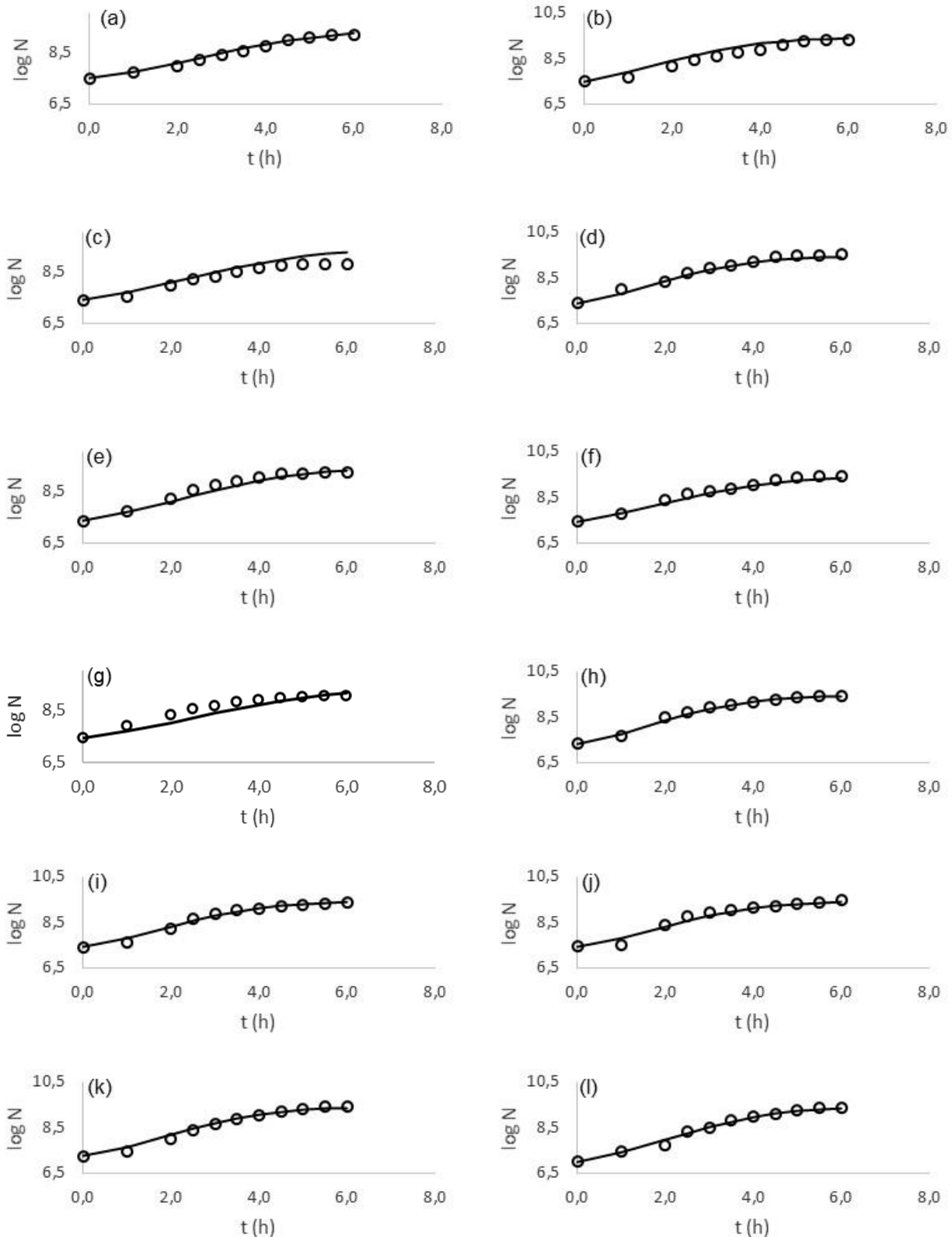
FONTE: A Autora, 2021.

FIGURA 1 – DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA PURA DE *Lactobacillus bulgaricus* (□) E AJUSTE DO MODELO MATEMÁTICO DADO PELA EQUAÇÃO 11 (- - -) PARA OS SEGUINTE FATORES: (a) 40 °C E pH 4,9; (b) 40 °C E pH 6,5; (c) 48 °C E pH 4,9; (d) 48 °C E pH 6,5; (e) 38,34 °C E pH 5,7; (f) 49,65 °C E pH 5,7; (g) 44 °C E pH 4,56; (h) 44 °C E pH 6,83; (i) 44 °C E pH 5,7; (j) 44 °C E pH 5,7; (k) 44 °C E pH 5,7; (l) 44 °C E pH 5,7.



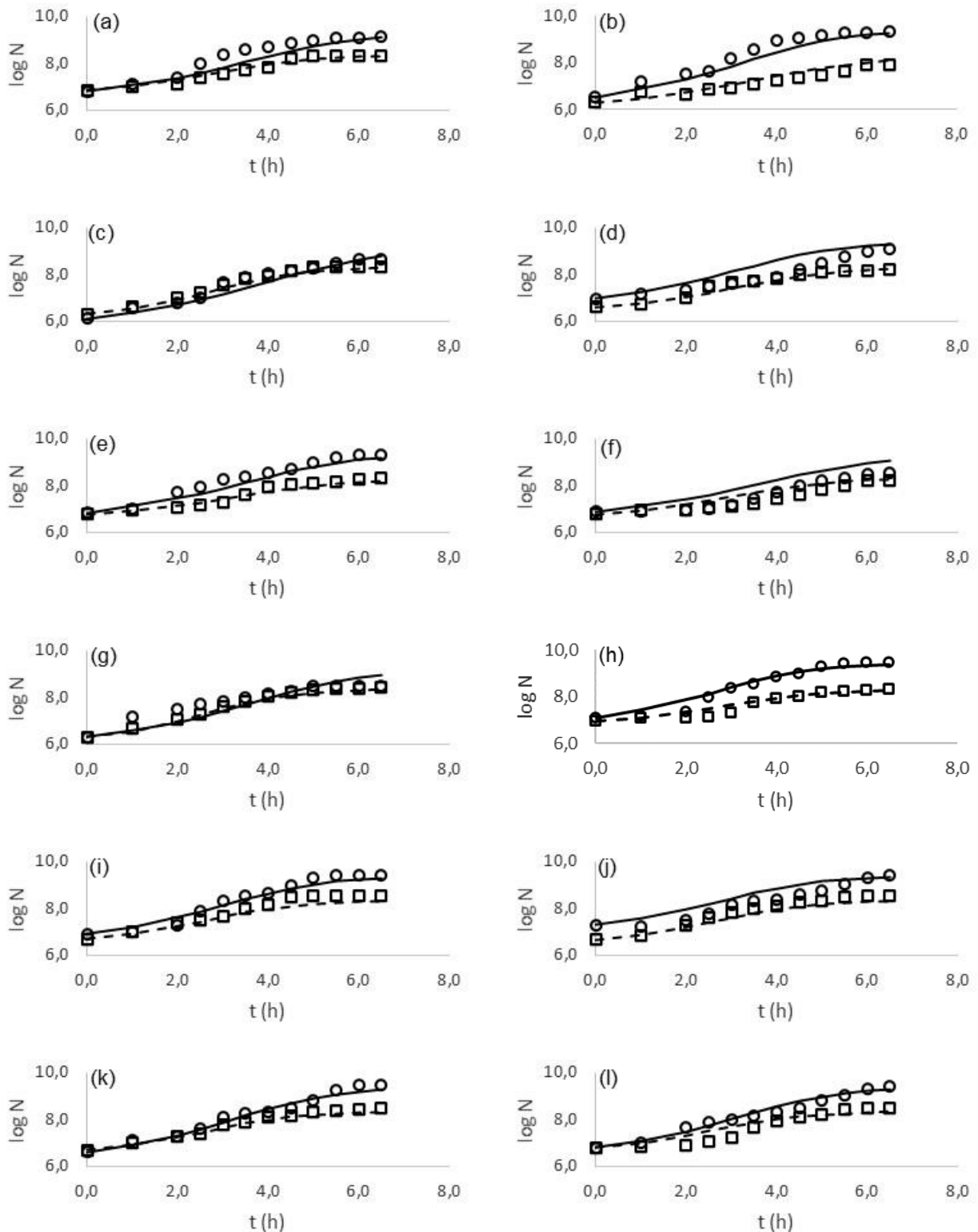
Fonte: A Autora (2021).

FIGURA 2 – DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA PURA DE *Streptococcus thermophilus* (°) E AJUSTE DOS MODELOS MATEMÁTICOS DADOA PELA EQUAÇÃO 11 (—) PARA OS SEGUINTE FATORES: (a) 36 °C E pH 5,7; (b) 36 °C E pH 7,3; (c) 44 °C E pH 5,7; (d) 44 °C E pH 7,3; (e) 34,34 °C E pH 6,5; (f) 45,65 °C E pH 6,5; (g) 40 °C E pH 5,36; (h) 40 °C E pH 7,63; (i) 40 °C E pH 6,5; (j) 40 °C E pH 6,5; (k) 40 °C E pH 6,5; (l) 40 °C E pH 6,5.



Fonte: A Autora (2021).

FIGURA 3 – DADOS EXPERIMENTAIS DE CULTURA MISTA DE *S. thermophilus* (°) E *L. bulgaricus* (□) E AJUSTES DOS MODELOS MATEMÁTICOS DADOA PELA EQUAÇÃO 20 (— E - - -, RESPECTIVAMENTE) PARA OS SEGUINTE FATORES: (a) 38 °C E pH:5,7; (b) 38 °C E pH: 6,5; (c) 46°C E pH: 5,7; (d) 46 °C E pH: 6,5; (e) 36,34 °C E pH 6,1; (f) 47,65 °C E pH 6,1; (g) 42 °C E pH 5,53; (h) 42°C E pH 6,66; (i) 42 °C E pH 6,1; (j) 42 °C E pH 6,1; (k) 42 °C E pH 6,1 e (l) 42 °C E pH 6,1.



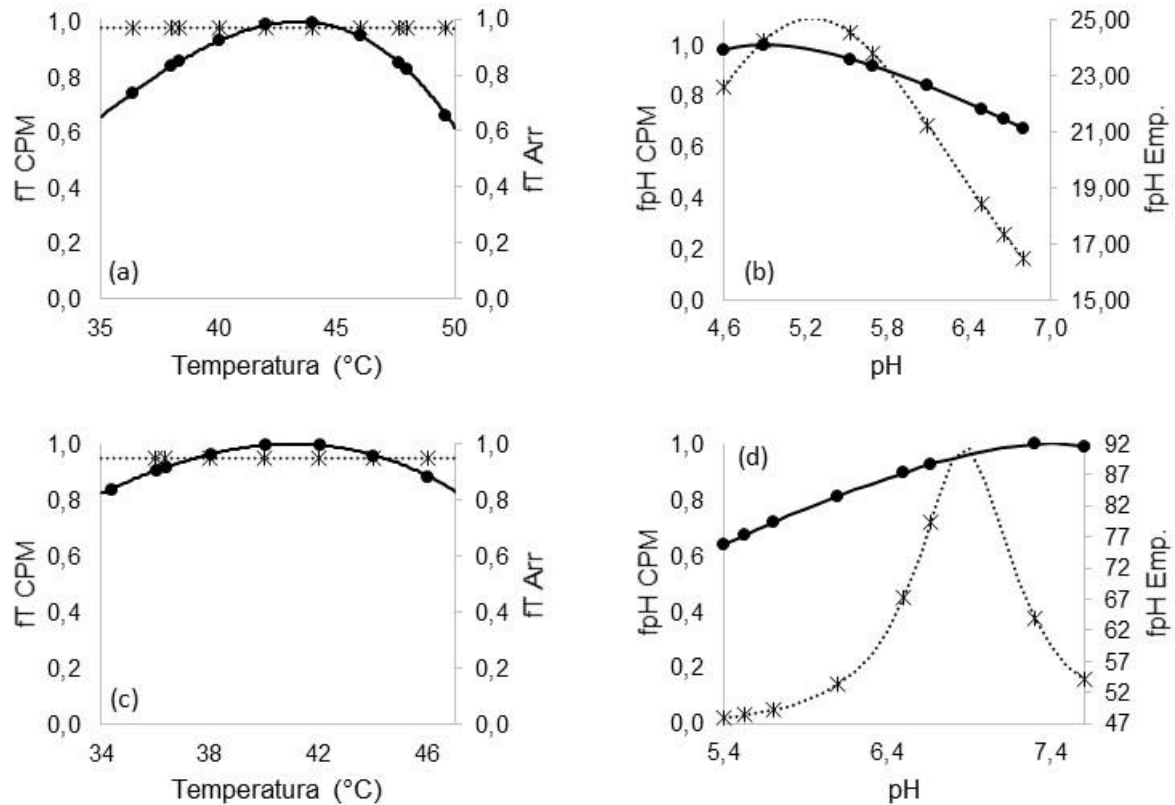
Fonte: A Autora (2021).

Segundo Beal e Corrieu (1990), o desenvolvimento da cultura láctea é diretamente relacionada com as condições ambientais como pH (em decorrência da ação metabólica das bactérias) e a temperatura como uma variável controlada. Dessa forma, para poder avaliar essa interferência, foi feita uma comparação entre as funções de temperatura ( $f_T^i$ ) e pH ( $f_{pH}^i$ ) sobre o crescimento das culturas puras. Foi possível observar diferenças importantes entre os valores obtidos com as Equações (14) e (15) (propostas neste estudo) e com as Equações (5) e (6) (propostas por Aghababaie et al, 2014), as quais descrevem os efeitos da temperatura e do pH sobre os micro-organismos, respectivamente. Essas equações baseiam-se na teoria dos obstáculos que propõe que toda função para qualquer fator  $j$  deveria resultar em valores no intervalo de 0 a 1 (LEINSTER, L., GORRIS, L., 1995). Todavia, isso não acontece na Equação 6, que traz para o  $f_{pH}$  para a *L. bulgaricus* uma amplitude de 15 a 25, como também para *S. thermophilus* de 47 a 92. Já a Equação (15) resultou em valores dentro do esperado (FIGURA 4), variando de 0,675 a 1,00 para  $f_{pH}$  do *L. bulgaricus* e de 0,642 a 1,00 para  $f_{pH}$  de *S. thermophilus*.

Outro ponto divergente observado são os valores de  $f_T^i$  obtidos pelas funções. A Equação (14) resulta em valores para *L. bulgaricus* variando desde 0,745 ao ótimo da função  $f_T^i = 1,000$ , e entre 0,840 a 1,000 para *S. thermophilus*. Enquanto a Equação (5) resulta em valores constantes de  $f_T^i$  para todos os intervalos de tempo analisados com 0,969 para *Lactobacillus* e 0,949 para *Streptococcus*. Esses resultados são interessantes visto que a temperatura se mostrou a maior influenciadora da atividade metabólica, no entanto, para as Equações de Aghababaie esse fato não se confirma.

FIGURA 4 - SIMULAÇÕES RESULTANTES DAS FUNÇÕES  $f$  CALCULADAS POR ESTE ESTUDO ATRAVÉS DAS EQUAÇÕES 14 E 15 (LINHAS CONTÍNUAS E SÍMBOLOS ●) EM RELAÇÃO ÀS OBTIDAS PELO ARTIGO DE AGHABABAIE et al (2014) (LINHAS PONTILHADAS E SÍMBOLOS \*) EQUAÇÕES 5 E 6.

(a)  $f_T$  *L. bulgaricus*, (b)  $f_{pH}$  *L. bulgaricus*, (c)  $f_T$  *S. thermophilus*, (d)  $f_{pH}$  *S. thermophilus*.



Fonte: A Autora (2021).

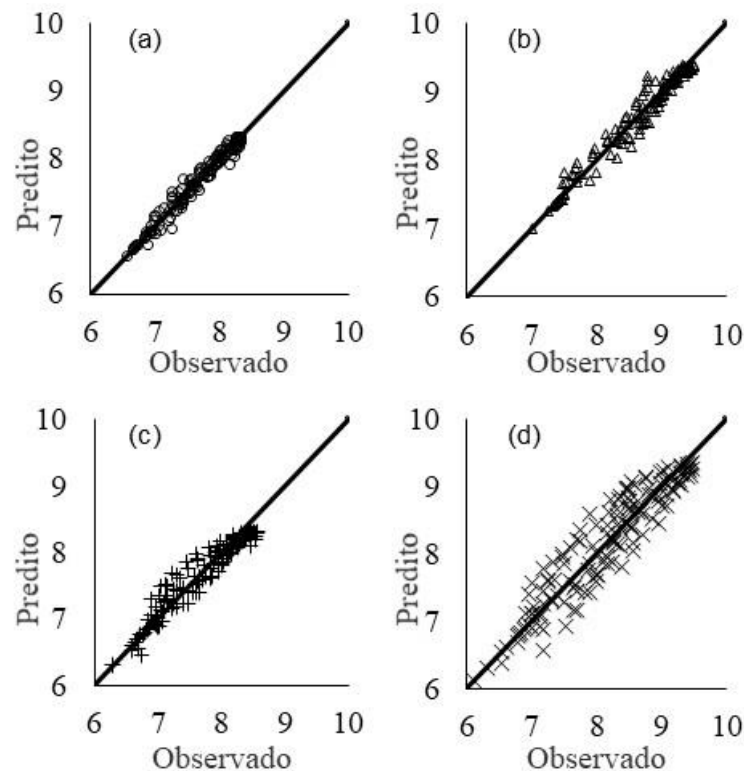
Os resultados dos ajustes podem ser analisados também através da comparação dos resultados preditos pelo modelo dinâmico com os observados experimentalmente (FUGURA 5).

É possível observar que o modelo descreve melhor os dados experimentais de *L. bulgaricus* em cultura pura, pois os dados estão próximos à reta de igualdade (diagonal). Por sua vez, na modelagem do *S. thermophilus* em cultura mista, os dados apresentam-se razoavelmente mais dispersos e distantes da reta de igualdade, o que mostra que o modelo tem um ajuste inferior para essa situação, com RMSE igual a 0,298 log UFC/mL. Também se observa que há uma maior quantidade de dados de *S. thermophilus* em concentrações maiores que *L. bulgaricus*, o que é um resultado do processo fermentativo do iogurte o qual segundo HIGASHIO et al (1977) ocorre devido ao valor do pH inicial privilegiar o desenvolvimento de *S. thermophilus*, produzindo ácido fórmico, ácido pirúvico e dióxido de carbono que tornam o meio

favorável para o desenvolvimento do *L. bulgaricus* que é mais intolerante à aerobiose (BEAL, CORRIEU, 1990).

Beal e Corrieu (1990) verificaram a alternância da razão das espécies da cultura iniciadora ao longo da fermentação. Quando as BAL possuem proporção de 1:1, é possível observar uma proporção de até 95 % de *S. thermophilus* em relação à população total de bactérias no primeiro momento. Com a acidificação do meio e desenvolvimento de *L. bulgaricus*, a porcentagem de *S. thermophilus* cai para aproximadamente 85%. Essa variação da proporção de cocos:bacilos ao longo da fermentação também foi observada por Puhan *et al* (1974) *apud* Beal e Corrieu (1990) e Spreer (2011).

FIGURA 5 - RELAÇÃO ENTRE OS DADOS PREDITOS PELOS MODELOS MATEMÁTICOS PROPOSTOS NESTE ESTUDO E OS DADOS OBSERVADOS EXPERIMENTALMENTE PARA: (a) *L. bulgaricus* EM CULTURA PURA; (b) *S. thermophilus* em cultura pura; (c) *L. bulgaricus* em cultura mista E (d) *S. thermophilus* EM CULTURA MISTA.



Fonte: A Autora (2021).

A partir dos parâmetros estimados em cultura pura e em cocultura em meio controlado, foi possível utilizar o modelo para prever o comportamento dos micro-organismos em escala laboratorial e industrial.

A partir da Equação 3, foi possível estimar os parâmetros do modelo sigmoide para determinar os valores de pH durante as fermentações nas escalas industrial e laboratorial (Tabela 4).

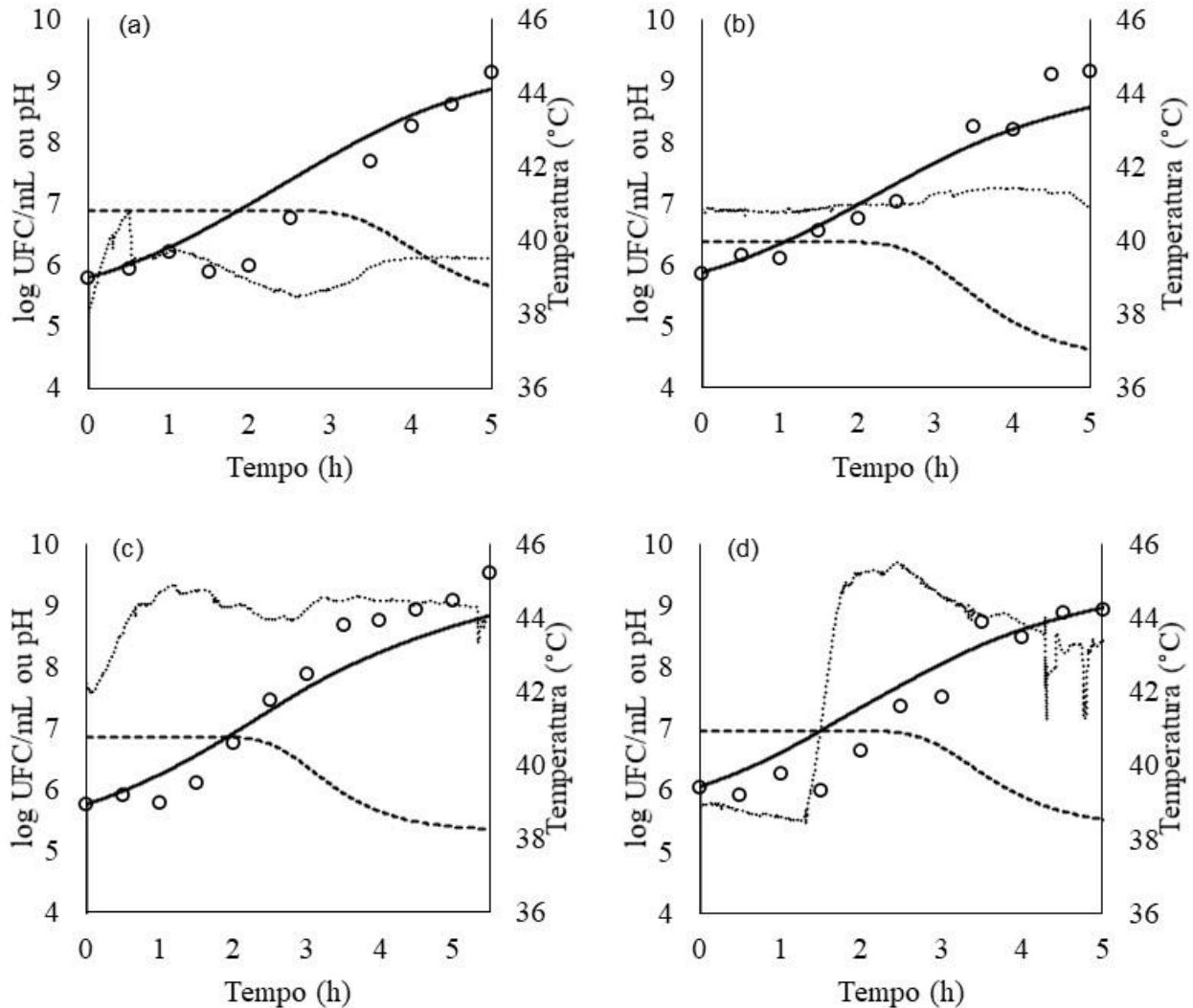
TABELA 4 - PARÂMETROS DO MODELO QUE DESCREVE O pH, EQUAÇÃO 3, DURANTE A FERMENTAÇÃO DO IOGURTE.

Códigos	Média T (°C)	Parâmetros estimados				Índices estatísticos	
		A	B	C	M	RMSE	R <sup>2</sup>
EEI1	42,4 °C	6,52	1,15	-2,11	2,01	0,062	0,992
EEI2	41,4 °C	6,54	1,48	-1,83	1,37	0,068	0,990
ELD1	43,0 °C	6,53	1,00	-2,25	1,99	0,031	0,999
ELD2	43,0 °C	6,51	1,19	-2,17	1,84	0,029	0,999
EEL1	39,3 °C	6,88	1,50	-1,50	3,95	0,021	0,998
EEL2	41,1 °C	6,37	1,39	-1,93	3,34	0,031	0,998
EEL3	44,2 °C	6,86	1,61	-1,53	3,10	0,055	0,992
EEL4	38,7 – 43,9 °C	6,96	1,55	-1,55	3,38	0,028	0,998
ETP	43,0 °C	6,59	0,79	-2,75	2,06	0,036	0,999

FONTE: A Autora, 2021.

Nos resultados dos experimentos em escala laboratorial (FIGURA 6) foi possível observar que houve variação de temperatura em relação às condições isotérmicas previstas. Como as respostas dos modelos são calculadas em função da temperatura e do pH ao longo do tempo de incubação, as variações destes fatores sobre o crescimento microbiano é computada. Os modelos apresentaram predições satisfatórias em comparação com os dados experimentais (Tabela 6), tendo como melhor predição (em termos estatísticos) o Experimento em Escala Laboratorial 3 (EEL3) com temperatura média de 44,2 °C, com menor RMSE, maior R<sup>2</sup>, menor %D, e %B mais próximo de zero. É possível observar que o modelo apresenta uma tendência de subestimação em relação aos dados experimentais nos experimentos em menores temperaturas, enquanto o modelo tende a apresentar superestimação em relação aos dados nos experimentos em maiores temperaturas. Essas tendências são quantificadas com o índice estatístico %B e %D, que podem ser observados na Tabela 6.

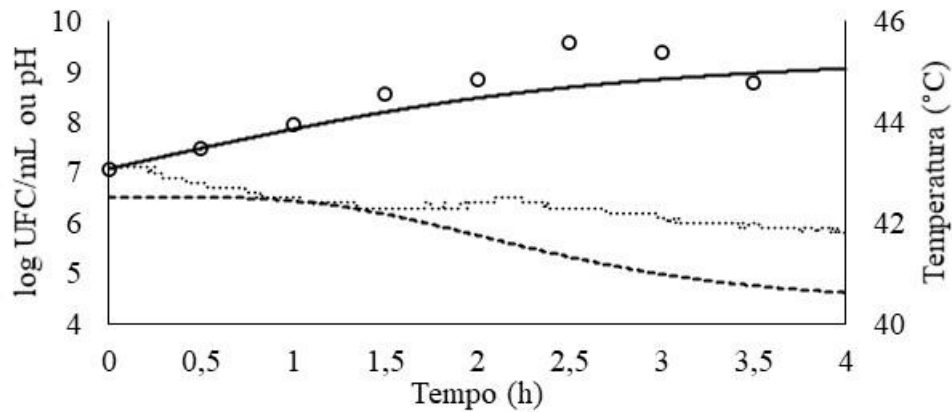
FIGURA 6 - PREDIÇÕES DO CRESCIMENTO MICROBIANO DADAS PELO MODELO PREDITIVO EQUAÇÃO 20 (—), DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA MISTA DE *L. bulgaricus* E *S. thermophilus* EM ESCALA LABORATORIAL USANDO FERMENTO YO-MIX™ 499 LYO (o), VALORES DE pH (- - -) E DE TEMPERATURA (. . .). EXPERIMENTOS: (a) EEL1; (b) EEL2; (c) EEL3; e (d) EEL4.



Fonte: A Autora (2021).

Os resultados do primeiro experimento em escala industrial (EEI1) mostraram a necessidade de ajustes no planejamento experimental, pois a maioria das inoculações em Agar M17 ficaram incontáveis após a incubação, enquanto não se observou crescimento das inoculações em Agar MRS. Dessa forma, no experimento EEI1, apenas os resultados em Agar PCA foram utilizados para a modelagem. Os resultados dispostos na Tabela 6 permitem observar que o modelo prediz bem a tendência dada pelos dados experimentais até 2 horas de incubação (7), com RMSE igual a 0,423 log UFC/mL e  $R^2$  de 0,872.

FIGURA 7 - PREDIÇÕES DO CRESCIMENTO MICROBIANO DADAS PELO MODELO PREDITIVO EQUAÇÃO 20 (—), DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA MISTA DE *L. bulgaricus* E *S. thermophilus* EM ESCALA INDUSTRIAL USANDO FERMENTO YOFLEX MILD 1.0 (o), VALORES DE pH (- - -) E DE TEMPERATURA (. . .). EXPERIMENTO EEI1

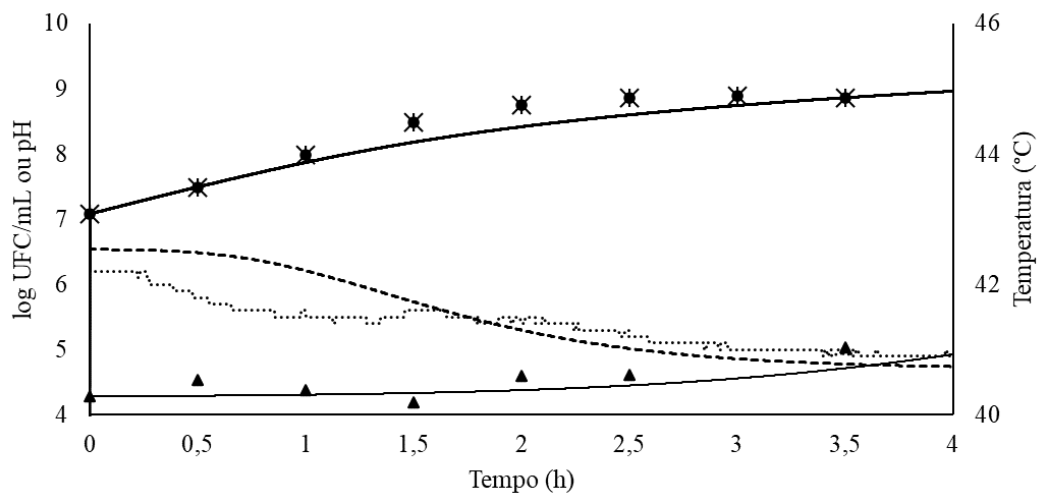


Fonte: A Autora (2021).

O modelo matemático proposto pode prever também os resultados do segundo experimento em escala industrial (EEI2), como mostra a FIGURA 8

FIGURA . Neste experimento foi possível quantificar o crescimento das duas bactérias iniciadoras, com RMSE igual a 0,194 log UFC/mL e 0,295 log UFC/mL para as bactérias *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, respectivamente. É possível observar que a proporção das BAL da cultura utilizada (YoFlex® Mild 1.0) é de 625:1, o que difere muito das proporções sugeridas na literatura de 1:1, como mostra a TABELA 5.

FIGURA 8 - PREDIÇÕES DO CRESCIMENTO MICROBIANO DADAS PELO MODELO PREDITIVO EQUAÇÃO 20 (—), DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA MISTA (\*) DE *L. bulgaricus* (▲) E *S. thermophilus* (•) EM ESCALA INDUSTRIAL USANDO FERMENTO YOFLEX MILD 1.0, VALORES DE pH (- - -) E DE TEMPERATURA (. . .). EXPERIMENTO EEI2.

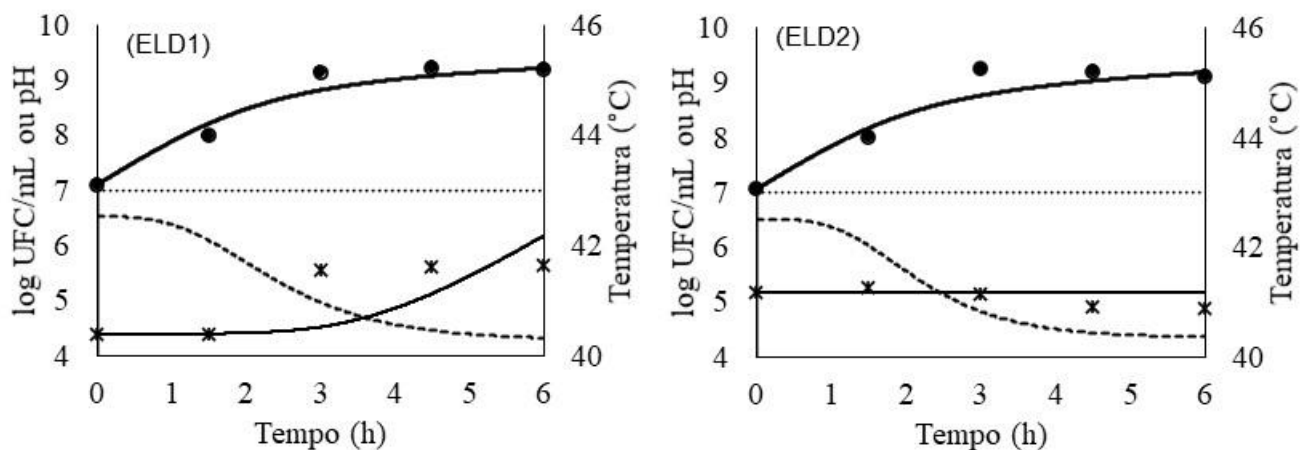


Fonte: A Autora (2021).

Os experimentos realizados a 43 °C em escala laboratorial por Luzzi (2020) em sua dissertação, com utilização das culturas YF-L812 (Chr. Hansen) e YoFlex® Mild 2.0 (Chr. Hansen), também apresentaram uma proporção inicial muito diferente do esperado. Os modelos propostos novamente puderam prever bem o crescimento microbiano (Figura 9), e obtiveram excelentes valores para as culturas YF-L812 e YoFlex® Mild 2.0, identificadas como ELD1 e ELD2, respectivamente como mostra a TABELA 6. Os resultados da escala industrial permitem afirmar que o modelo é capaz de prever o crescimento das BAL mesmo em proporções muito diferentes de 1:1, o que mostra a ampla possibilidade de aplicação, até mesmo para razões de coco:bacilos desconhecidos.

A literatura sugere que a proporção inicial da cultura *starter* para a fabricação de iogurte varia de 1:1 a 2:3; contudo, ao longo da fermentação essa razão muda em decorrência das condições ambientais favorecer e inibir as bactérias de acordo com a composição físico-química do meio (SPREER, E.2011). Muitas marcas de fermentos sugerem razões diferentes das BAL para que o produto final tenha características sensoriais distintas, como viscosidade, sabor, velocidade da fermentação, e principalmente no aroma composto por acetaldeído típico de iogurte produzido pelo *S. thermophilus* (JAY, J. 2005; SPREER, E. 2011).

FIGURA 9 - PREDIÇÕES DO CRESCIMENTO MICROBIANO DADAS PELO MODELO PREDITIVO EQUAÇÃO 20 (\_\_\_), DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA MISTA DE *L. bulgaricus* (°) E *S. thermophilus* (\*) EM ESCALA INDUSTRIAL USANDO FERMENTO YF-L812 E YoFlex Mild 2.0 (o), VALORES DE pH (- - -) E DE TEMPERATURA (. . .). EXPERIMENTOS: (a) ELD1; (b) (ELD2).



Fonte: A Autora (2021).

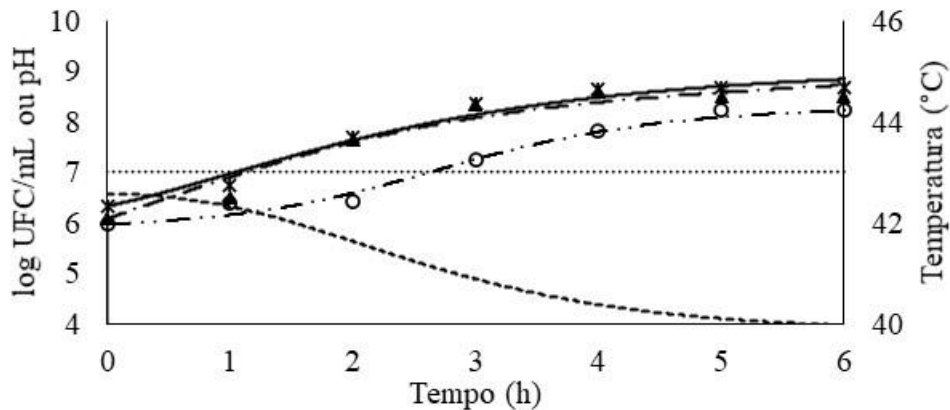
O modelo pode prever bem também o crescimento microbiano quando comparado ao conjunto de dados experimentais da TetraPak, aqui identificado como (ETP), Figura 10. Neste caso, a proporção experimental de cocos:bacilos é próxima de 1:1 (Tabela 5).

TABELA 5 – PROPORÇÃO DAS CULTURAS INICIADORAS NOS DIFERENTES FERMENTOS UTILIZADOS

Código	Tipo de fermento	Razão <i>Streptococcus</i> : <i>Lactobacillus</i>
EEI2	YoFlex Mild 1.0	625:1
ELD1	YF-L812	309:1
ELD2	YoFlex Mild 2.0	70:1
ETP	TetraPak	1:1

Fonte: A Autora (2021).

FIGURA 10 - PREDIÇÕES DO CRESCIMENTO MICROBIANO DADAS PELO MODELO PREDITIVO EQUAÇÃO 20 PARA CULTURA MISTA (—), PARA CULTURA PURA DE *L. bulgaricus* (-.-.-) E CULTURA PURA DE *S. thermophilus* (-.-.-.-), DADOS EXPERIMENTAIS DA CULTURA MISTA (\*) DE *L. bulgaricus* (▲) E *S. thermophilus* (o) A PARTIR DOS DADOS DA TETRA-PAK, VALORES DE pH EQUAÇÃO 3 (- - - -) E DE TEMPERATURA (. . . .). EXPERIMENTO ETP.



Fonte: A Autora (2021).

Diferentemente dos experimentos em escala industrial (*EEI1*, *EEI2*) e da dissertação de Luzzi (2020) (*ELD1*, *ELD2*), as culturas iniciadoras usadas em escala laboratorial (*EEL1*, *EEL2*, *EEL3*, *EEL4*), pela TetraPak (ETP) e no artigo científico da Aghababaie et al. (2014) eram em proporção próxima de 1:1. Fora a diversidade de proporção que as culturas possam ser formadas, ainda existe outra variável que não foi levada em consideração neste estudo: de que as cepas utilizadas para obtenção dos dados não serem as mesmas, de diferentes subespécies.

A origem das cepas bem como as proporções entre as BAL pode interferir no tempo e temperatura de fermentação. Os resultados obtidos por Beal e Corrieu (1991) são um exemplo, que obtiveram  $3,83 \text{ h}^{-1}$  para *S. thermophilus* e  $2,51 \text{ h}^{-1}$  para *L. bulgaricus* a  $42 \text{ }^\circ\text{C}$ , com uma razão de 84% de *S. thermophilus*. Eles também verificaram experimentalmente um efeito favorável ao metabolismo de *L. bulgaricus* em temperaturas mais elevadas, como a de  $46,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tal informação sugere que, para uma razão das BAL mais equilibrada, seria necessária uma fermentação desfavorável termicamente para *S. thermophilus*.

Para sintetizar as informações estatísticas a fim de melhorar a comparação, a Tabela 6 traz os valores de  $\%B_f$ ,  $\%D_f$  e *RMSE* para as predições do modelo.

TABELA 6 – ÍNDICES ESTATÍSTICOS DAS PREDIÇÕES DO MODELO MATEMÁTICO DURANTE A FERMENTAÇÃO E ESTADOS FISIOLÓGICOS DAS CÉLULAS ESTIMADOS PARA CADA SITUAÇÃO.

Códigos	Média T ( $^\circ\text{C}$ )	Espécie	$h_0$	Validação		
				$\%B$	$\%D$	<i>RMSE</i>
EEI1	42,4 $^\circ\text{C}$	Co cultura	0,00	-2,99	8,68	0,423
EEI2	41,4 $^\circ\text{C}$	<i>S. thermophilus</i>	0,00	-1,70	4,87	0,194
		<i>L. bulgaricus</i>	3,80	-0,48	1,38	0,295
ELD1	43,0 $^\circ\text{C}$	<i>S. thermophilus</i>	0,00	-0,53	1,18	0,189
		<i>L. bulgaricus</i>	5,52	-4,15	9,52	0,569
ELD2	43,0 $^\circ\text{C}$	<i>S. thermophilus</i>	0,00	-0,95	2,13	0,244
		<i>L. bulgaricus</i>	5,00	2,16	4,90	0,184
EEL1	39,3 $^\circ\text{C}$	Cocultura	0,00	4,38	14,53	0,468
EEL2	41,1 $^\circ\text{C}$	Cocultura	1,61	-0,82	2,60	0,337
EEL3	44,2 $^\circ\text{C}$	Cocultura	0,00	-1,78	6,28	0,430
EEL4	38,7 – 43,9 $^\circ\text{C}$	Cocultura	0,00	2,90	9,95	0,405
ETP	43,0 $^\circ\text{C}$	<i>S. thermophilus</i>	0,07	0,32	0,85	0,220
		<i>L. bulgaricus</i>	1,66	-0,45	1,20	0,123

Autora (2021).

A análise da conversão da lactose em ácido láctico poderia ser, segundo Burgos-Rubio et al (2000), uma medida indireta de contagem bacteriana. Eles confirmaram experimentalmente uma faixa ótima para a biorreação das bactérias ácido lácticas no intervalo de temperatura de  $37$  a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , podendo servir então como ferramenta para determinação da concentração final de UFC/mL no fim da fermentação. No mesmo sentido, segundo Beal e Corrieu (1991), o crescimento da concentração bacteriana é acompanhado com a evolução da produção de ácido láctico. Contudo, os autores assim como Mitchell e Sandine (1986) notaram que houve uma dissociação entre esta relação, pois o teor de ácido continuou a aumentar mesmo com as BAL terem atingido a fase estacionária devido ao metabolismo de manutenção da

cultura. E suma, é possível esperar que essa relação seja caracterizada especialmente na fase exponencial das BAL.

As fases do crescimento bacteriano podem sofrer modificações de acordo com a espécie do microrganismo e o meio que ele está inserido. Se a bactéria já estiver adaptada ao meio e as condições externas foram favoráveis não irá ocorrer fase de adaptação, a primeira já será a de crescimento exponencial. Para esse caso, é possível observar que o modelo consegue êxito mesmo quando  $h_0$  é zero. Assim como Baranyi et al (1995) observaram a ausência de fase *lag* quando  $h_0$  é zero, ou seja, o microrganismo já está adaptado ao meio, temos então  $V = \mu_{m\acute{a}x}$ . Podemos afirmar então que o modelo se ajusta bem aos dados mesmo em situações diferentes de concentração inicial e necessidade da adaptação dos microrganismos.

Mesmo diante das diversas situações experimentais exploradas neste estudo, nenhum dos testes deixou de atingir os parâmetros de qualidade do iogurte previsto na legislação brasileira (BRASIL, 2007), que é acidez entre 0,6 a 1,5 g ácido láctico/100g e contagem mínima de  $10^7$  UFC/g, como mostra a Tabela 7. Podemos concluir dessa forma que mesmo em condições distintas da ideal, a cultura láctea é capaz de se desenvolver. Para fins industriais, no entanto, é necessário explorar todas as condições ótimas para seu melhor desempenho a fim de proporcionar melhor eficiência e resultados do processo fermentativo

TABELA 7 – PARÂMETROS FINAIS DE PH, ACIDEZ E CONTAGEM PARA OS EXPERIMENTOS REALIZADOS EM ESCALA INDUSTRIAL E LABORATORIAL

<b>Códigos</b>	<b>Acidez (g ácido láctico/100 g)</b>	<b>Contagem (UFC/mL)</b>
EEI1	0,693	$4,62 \times 10^{10}$
EEI2	0,767	$8,00 \times 10^9$
EEL1	0,750	$2,00 \times 10^9$
EEL2	0,690	$2,20 \times 10^9$
EEL3	0,730	$2,00 \times 10^9$
EEL4	0,700	$2,00 \times 10^9$

Autora (2021).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo foi possível observar e quantificar os fatores que influenciam na fabricação do iogurte, como a temperatura de incubação, o pH do meio e a simbiose das espécies no processo de fermentação. Através da microbiologia preditiva foi possível estabelecer um modelo matemático dinâmico capaz de descrever e prever a influência dos fatores mencionados, bem como suas variações, no desenvolvimento das espécies bacterianas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* em cultura mista durante o processo fermentativo para a obtenção de iogurte. O modelo proposto foi testado e validado em diferentes condições ambientais (constantes e variáveis) e, em todos, foram obtidos bons resultados, provando sua excelente capacidade preditiva.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. et al. Proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. **Journal of Dairy Science**. Vol. 76, Ed 6, p. 1498-1505, 1993.
- AGHABABAIE, M. et al. Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation. **Journal of Food Engineering**. Vol. 166, p. 72-79. 2015.
- AGHABABAIE, M. et al. Developing a detailed kinetic model for the production of yogurt bacteria in single strain cultures. **Food and Bioproducts Processing**. Vol. 94, p.657-667. 2014.
- ANVISA. Guia para determinação de prazos de validade de alimentos. GUIA N. 16/20018 – Versão 1. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16\\_2018+Prazo+de.pdf/e40032da-ea48-42ff-ba8c-a9f6fc7af7af](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16_2018+Prazo+de.pdf/e40032da-ea48-42ff-ba8c-a9f6fc7af7af). Acesso em 20/05/2020.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**. v.23, p. 277-294, 1994.
- BARANYI, J. et al. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**. 27. 61-75. 1995a.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**. v.26, p. 199-218, 1995b.
- BARANYI, J.; PIN, C.; ROSS, T. Validating and comparing predictive models. **International Journal of Food Microbiology**. 48. 159-166. 1999.
- BEAL, C., CORRIEU, G. Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, p. 90-98, 1991.
- BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite & Derivados**, v.4, nº.25, p. 24-38, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 mar. de 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº.46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 out. de 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº.76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e as Características de Qualidade de leite cru refrigerado, leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 nov. de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal. **Secretaria da Defesa Agropecuária**. 2ª ed. ISBN 978-85-7991-134-7. Brasília : MAPA, 2019.

BUCHANAN, Robert L. Predictive food microbiology. **Trends on Food Science & Technology**. v.4, 1993.

BURGOS-RUBIO, C. N. et al. Kinetic study of the conversion of different strates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. **Biotechnol. Prog**, v. 16. p.305-314. 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. Roma 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>>. Acessado em: 05 mai. 2020.

GIBSON, A.M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T.A. The effect of sodium choride and temperature in the rate and extent of growth of clostridium botulinum type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**. v.62, p.479-490. 1987.

GOMPERTZ, Benjamin. XXIV On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new model of determining life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F.R.S. &c. v.115. p. 513-583. 1825

HIGASHIO,K. et al. Isolation and Identification of Growth Factor of *Lactobacillus bulgaricus* Produced by *Streptococcus thermophilus* (Studies on Symbiosos in Yogurt Culture Part II). **Journal of Japan Society for Bioscience and Biotechnology**. v.51. nº 4. p.209 – 215. 1977.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR SATANDARDIZATION. ISO. **ISO 7889:2003**. Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37 degrees C. 2003.

JAY, James M. Microbiologia de alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEISTNER, L., GORRIS, L. G.M. Food preservation by hurdle technology. **Trends in Food Science & Technology February**. V. 6. 1995.

LUZZI, G.A., **Influence of Yogurt and Cheese Reformulation Strategies on Microbial Ecology and Product Characteristic**. Tese (Doutorado em rer. nat) – *Federal Research Institute of Nutrition and Food*, Kiel, 2020.

MARTIN, A. F. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção de bactérias lácticas**. Dissertação de mestrado. ESALQ/USP, Centro de ciências e tecnologia de alimentos. Piracicaba, SP. 2002.

MICHAEL, R., SADINE, W. E. Influence of Temperature on Associative Growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**. Ed. 69, p. 2558-2568. 1986.

- MOON, N. J., REINBOLD, G. W. Commensalism and Competition in Mixed Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **J. Milk Food Technol.** v.39. n° 5. p. 337-341. 1976.
- MORENO, V., KOSIKOWSKI, F. V. Peptides, aminoacids and amines liberated from B-casein by micrococcal cell-free preparations. **Journal of Dairy Science**, v.56, n.19, p. 39, 1973.
- O'NEIL, J. M., DICK, H. K., HARE, L. B. Consistency and compositional characteristics of commercial yogurts. **Dairy Science**, v.62, p. 1032-1036. 1979.
- ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. et al. Tecnologia de Alimentos – Volume 2: **Alimentos de Origem Animal**. Tradução Fátima Murad. Editora Artmed, Porto Alegre, 2005.
- PUHAN, Z., FLUELER, O., BANHEGYI, M. **Composition of lactic acid bacterial flora and lactic acid configuration in commercial Swiss yogurt**. Proceedings of the XIX International Dairy Congress, IE 451. 1974.
- ROSS T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. **The Journal of Applied Bacteriology**. Nov;81(5):501-508. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x . 1996.
- ROSSO, L., LOBRY, J.R., BAJARD, S., FLANDROIS, J.P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and environmental microbiology**. V.61, n.2, p.610 – 616. 1995
- SIEUWERTS, SANDER. Microbial interactions in the yoghurt consortium: current status and product implications. **SOJ Microbiology & Infectious Diseases**. 4(2): 1-5. 2016.
- SILVA, A.M.T. et al. Elaboração de iogurte com propriedades funcionais utilizando *Bifidobacterium lactis* e fibra solúvel. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.16, n.3, p. 291-298, 2014.
- SPREER, E. Technologie der Milchverarbeitung. **B. Behr's Verlag**. 2011.
- TAMINE, A. Y. ROBINSON, R. K. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. **Journal of Dairy Research**, v. 55, n. 2, p. 281-307, 1988.
- TETRA PAK. Dairy Processing Handbook. Disponível em: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/cultures-and-starter-manufacture>. Acesso em: 15/04/2021.
- VAN IMPE, J. F. et al. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**. 25. p 227 – 249. 1995.
- ROHATGI, Ankit. WEBPLOTDIGITIZER. Disponível em: <<https://automeris.io/WebPlotDigitizer>>. Acesso em: 22/04/2021.

WHITING, R.C., BUCHANAN, R.L. Letter to the editor: A classification of models in predictive microbiology - a reply to K. R. Davey. **Food Microbiol.** v.10. p.175-177. 1993.

YEROGOV, I. et al. Optimal control of bacterial growth for the maximization of metabolite production. *Journal of Mathematical Biology.* v. 78. p. 985 – 1032. 2019