

# FERMENTAÇÃO

## E PRODUTOS LÁCTEOS FERMENTADOS



Os produtos lácteos são conhecidos há milênios, e é bastante provável que sejam usados para consumo humano desde os tempos das antigas tribos nômades, devido à grande disponibilidade de leite dos rebanhos que eram deslocados junto com as populações humanas. Com o passar dos anos descobriu-se a fermentação, que é o processo em que os microorganismos retiram do meio em que vivem o material nutritivo de que necessitam, ao mesmo tempo em que, sob a ação catalítica de enzimas, produzem substâncias das quais se utilizam a indústria. São inúmeros os alimentos obtidos por fermentação láctica. Entre os produtos mais conhecidos estão o creme de leite, os queijos e os iogurtes.

### A FERMENTAÇÃO

A palavra fermentação já teve muitos significados no passado. De acordo com a definição encontrada no dicionário, fermentação é “um processo de variação química com efervescência...”, “um estado de agitação ou sem descanso...”, “qualquer uma das várias transformações de substâncias orgânicas...”. A palavra se tornou popular antes dos estudos de Pasteur com vinhos. A discussão sobre a história do conceito de fermentação concluiu que o sentido geral no qual esse termo é normalmente utilizado é definido como “um processo no qual transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por microorganismos”.

Bioquimicamente, a fermentação é o processo metabólico no qual carboidratos e compostos relacionados são parcialmente oxidados, resultando em liberação de energia, sem qualquer receptor de elétrons externo. Os aceptores finais de elétrons são compostos orgânicos produzidos diretamente da quebra de carboidratos. Consequentemente, ocorre a oxidação incompleta do composto original, resultando em liberação de apenas uma pequena quantidade de energia durante o processo. Os produtos da fermentação consistem em alguns compostos orgânicos, os quais são mais reduzidos do que outros.

Muitos alimentos devem sua produção e suas características às atividades fermentativas dos microorganismos. Vários produtos, como queijos maturados, conservas e linguiças fermentadas, são alimentos que possuem uma vida útil consideravelmente maior do que a matéria-prima da qual foram feitos. Além de serem mais estáveis, todos os alimentos fermentados possuem aroma e sabor característicos que resultam, direta ou indiretamente, dos organismos fermentadores. Em alguns casos, o conteúdo de vitaminas dos alimentos cresce juntamente com o aumento da



digestibilidade da sua matéria-prima. O processo de fermentação reduz a toxicidade de alguns alimentos, enquanto outros podem se tornar extremamente tóxicos durante a fermentação. Nenhum outro grupo ou categoria de alimentos é tão importante ou tem sido tão relacionado ao bem estar nutricional em todo o mundo quanto os produtos fermentados.

A ecologia microbiana dos alimentos e das fermentações relacionadas tem sido estudada há muitos anos em produtos como queijos maturados, chucrute, vinhos e outros. As atividades dos organismos fermentados dependem dos parâmetros intrínsecos de crescimento. Por exemplo, quando o alimento *in natura* contém açúcares livres e é acidificado, leveduras crescem rapidamente e produzem álcool, restringindo as atividades de outros organismos naturalmente presentes. Se, ao invés disso, a acidez de um produto permite um bom crescimento bacteriano e, ao mesmo tempo, tem altas concentrações de açúcares simples, é de se esperar o crescimento de bactérias acidoláticas. A adição de baixas quantidades de NaCl também permitirá o crescimento preferencial das bactérias em relação às leveduras, como ocorre na fermentação do chucrute.

Produtos que contêm polissacarídeos mas não apresentam níveis significativos de açúcares simples são normalmente estáveis às atividades de leveduras e bactérias acidoláticas devido a falta de amilase na maioria desses microorganismos. Para a fermentação ser realizada, uma fonte exógena de enzimas sacarificantes deve ser fornecida. O uso de malte de cevada em cervejarias e indústrias de destilação é um exemplo disso. A fermentação de açúcares até a formação de etanol é resultante da maltagem e ocorre devido as leveduras. O uso de koji na fermentação de produtos com soja é outro exemplo de como fermentações alcoólicas e acidoláticas podem ocorrer em produtos contendo baixos níveis de açúcares e altos níveis de amidos e proteínas. Embora as enzimas sacarificantes do malte de cevada sejam provenientes da germinação de sementes de cevada, as enzimas do koji são produzidas pelo *Aspergillus oryzae*, que cresce em grãos de arroz molhados ou cozidos a vapor, ou em outros cereais. Os hidrolisados do koji podem ser fermentados por bactérias acidoláticas e leveduras, como ocorre no caso do molho de soja, ou suas enzimas podem agir diretamente no grão de soja na produção de produtos como o miso japonês.

### BACTÉRIAS ACIDOLÁTICAS

Este grupo é composto por 12 gêneros de bactérias gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetraenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*.

Uma vez que os *Enterococcus* e os *Lactobacillus* não pertencem mais ao gênero *Streptococcus*, o microorganismo deste último gênero mais importante em alimentos é o *S. thermophilus*. O *S. diacetylactis* foi reclassificado como uma linhagem de *Lactococcus* subespécie *lactis* que utiliza citrato.

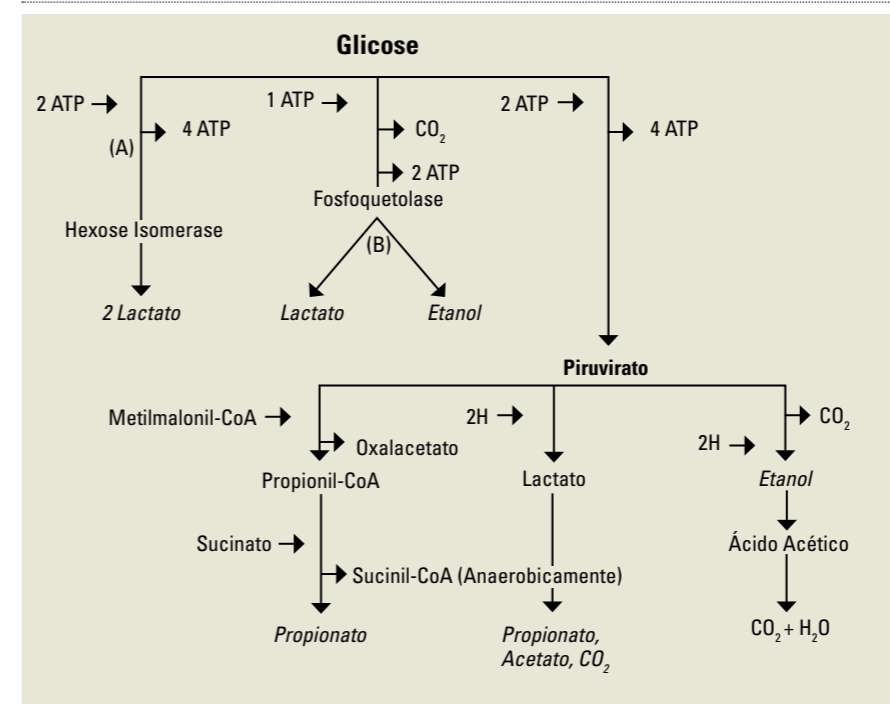
Relacionados às bactérias acidoláticas, mas não pertencentes a esse grupo, estão gêneros como *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium*, entre outros. O gênero *Propionibacterium* foi reduzido, já que algumas de suas espécies foram transferidas para o novo gênero *Propionifera*, o qual produz ácido propiônico como principal ácido carboxílico a partir da glicose.

A matéria vegetal é o habitat natural do grupo dos *Streptococcus* lácticos, embora não existam evidências de que o *Lactococcus cremoris* tenha sua origem nesses materiais. Acredita-se que os *Streptococcus* provenientes de plantas possam ser a fonte ancestral da qual outras espécies e linhagens tenham se desenvolvido.

Embora o grupo das bactérias acidoláticas não tenha seus limites bem definidos, todos os membros desse grupo apresentam a mesma característica de produzir ácido láctico a partir de hexoses. Por serem organismos fermentadores, faltam neles sistemas hemeligiados funcionais de transporte de elétrons ou de citocromos, além do que eles obtêm sua energia a partir da fosforilação de substratos durante a oxidação de carboidratos. Tais microorganismos não apresentam o ciclo de Krebs.

As bactérias acidoláticas são divididas em dois grupos, com base nos produtos finais do metabolismo da glicose. Aquelas que produzem ácido láctico como único ou principal produto da fermentação da glicose foram designadas

FIGURA 1 - ROTAS GERAIS DE PRODUÇÃO DE ALGUNS PRODUTOS FERMENTADOS A PARTIR DA GLICOSE POR VÁRIOS ORGANISMOS. (A) LÁCTICAS HOMO FERMENTATIVAS; (B) LÁCTICAS HETERO FERMENTATIVAS; (C) E (D) PROPIONIBACTERIUM; (E) SACCHAROMYCES SPP; (F) ACETOBACTER SPP; (G) ACETOBACTER



homofermentativas (veja Figura 1A).

As homoláticas podem extrair duas vezes mais energia de uma quantidade definida de glicose do que as heteroláticas. O comportamento homofermentativo é observado quando a glicose é metabolizada, mas na necessariamente quando as pentoses são metabolizadas, já que algumas bactérias homoláticas produzem ácidos acético e láctico quando utilizam pentoses. O caráter homofermentativo de algumas linhagens de bactérias homoláticas pode ser mudado pela alteração das condições de crescimento, tais como concentração de glicose, pH e limitação de nutrientes.

As bactérias lácticas que produzem a mesma quantidade molar de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir de hexoses são chamadas de heterofermentativas (veja Figura 1B).

Todos os membros dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* são homofermentadores, assim como alguns *Lactobacillus*. Os heterofermentadores são *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns *Lactobacillus*. A

FIGURA 2 - ROTA GERAL DA PRODUÇÃO DE ACETOÍNA E DIACETIL A PARTIR DO CITRATO PELO GRUPO N DE LACTOBACILLUS E LEUCONOSTOC SPP. O PIRUVATO PODE SER PRODUZIDO A PARTIR DO LACTATO, E A ACETIL COENZIMA A (COA), A PARTIR DO ACETATO.

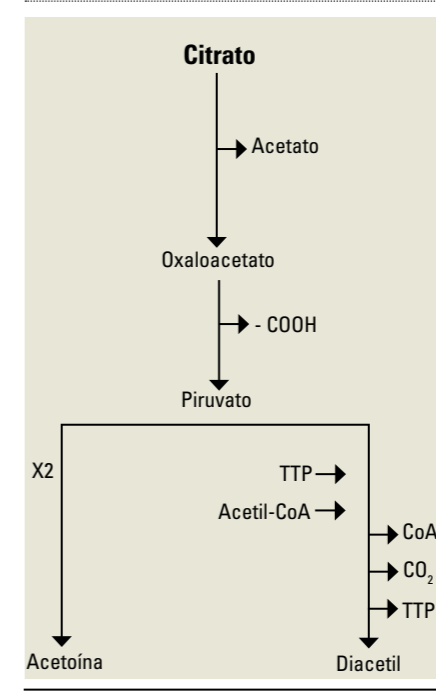


Tabela 7.1 apresenta as bactérias acidoláticas homo e heterofermentativas.

As bactérias heteroláticas são mais importantes do que as homoláticas na produção de componentes de aroma e sabor, tais como o acetaldeído e o diacetil (veja Figura 2).

O gênero *Lactobacillus* foi subdividido classicamente em três subgêneros: *Beutobacterium*, *Streptobacterium* e *Thermobacterium*. Todos os *Lactobacillus* heteroláticos apresentado na Tabela 1 pertencem ao subgênero *Streptobacterium* (por exemplo, *L. casei* e *L. plantarum*) produzem mais de 1,5% de ácido láctico em uma temperatura ótima de crescimento de 30°C, enquanto as bactérias do subgênero *thermobacterium* (como a *L. acidophilus* e a *L. bulgaricus*) podem produzir mais de 3% de ácido láctico em uma temperatura ótima de crescimento de 40°C.

Mais recentemente, o gênero *Lactobacillus* foi organizado em três grupos baseados basicamente nas características fermentativas. O grupo 1 inclui as espécies *homofermentativas obrigatórias* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, etc.). Estas são as *termobactérias* e não fermentam pentoses. O grupo 2 é formado pelas espécies *heterofermentativas facultativas* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*, etc.), e os membros deste grupo fermentam pentoses. O grupo 3 é o das espécies *heterofermentativas obrigatórias* e inclui *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco* e outros. Eles produzem CO<sub>2</sub> a partir da glicose. Os *Lactobacillus* podem produzir um pH de 4,0 em alimentos que contêm carboidratos fermentáveis e também podem alcançar um pH de aproximadamente 7,1.

Quanto às necessidades para o crescimento, as bactérias acidoláticas precisam de aminoácidos, vitamina B e bases púricas e pirimidínicas, o que explica a sua utilização em análises microbiológicas. Embora essas bactérias sejam mesófilicas, algumas delas podem crescer sob temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. Com relação ao pH, algumas podem crescer abaixo de 3,2, outras acima de 9,6, mas a maioria cresce em uma faixa de pH entre 4,5 e 4,5. As bactérias acidoláticas são pouco proteolíticas e lipolíticas.



ADITIVOS & INGREDIENTES

ADITIVOS & INGREDIENTES

TABELA 1 - BACTÉRIAS ACIDOLÁCTICAS HOMO E HETEROFERMENTATIVAS

Homofermentativas			Heterofermentativas		
Organismos	Configuração do lactato	% G + G	Organismo	Configuração do lactato	% G + G
<i>Lactobacillus</i>			<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>	DL	36,7	<i>L. brevis</i>	DL	42,7 - 46,4
<i>L. alimentarius</i>	L(D)	36 - 37	<i>L. buchneri</i>	DL	44,8
<i>L. bulgaricus</i>	D(-)	50,3	<i>L. cellobiosus</i>	DL	53
<i>L. casei</i>	L(+)	46,4	<i>L. coprophilus</i>	DL	41,0
<i>L. coryniformis</i>	DL	45	<i>L. fermentum</i>	DL	53,4
<i>L. curvatus</i>	DL	43,9	<i>L. hilgardii</i>	DL	40,3
<i>L. delbrueckii</i>	D(-)	50	<i>L. sanfrancisco</i>	DL	38,1 - 30,7
<i>L. helveticus</i>	DL	39,3	<i>L. trichoides</i>	DL	42,7
<i>L. jugurti</i>	DL	36,5 - 39,0	<i>L. fructivorans</i>	DL	38 - 41
<i>L. jensenii</i>	D(-)	36,1	<i>L. pontis</i>	DL	53 - 56
<i>L. lactis</i>	D(-)	50,3	<i>Leuconostoc</i>		
<i>L. leichmaninii</i>	D(-)	50,8	<i>L. cremoris</i>	D(-)	39 - 42
<i>L. plantarum</i>	DL	45	<i>L. dextranicum</i>	D(-)	38 - 39
<i>L. salivarius</i>	L(+)	34,7	<i>L. lactis</i>	D(-)	43 - 44
<i>Pediococcus</i>			<i>L. mesenteroides</i>	D(-)	39 - 42
<i>Pacidilactici</i>	DL	44,0	<i>L. gelidum</i>	D(-)	37
<i>P. cerevisiae</i>	DL		<i>L. carnosum</i>	D(-)	39
<i>P. pentosaceus</i>	DL	38	<i>L. mesenteroides</i>		
<i>P. damnosus</i>			subsp. <i>mesenteroides</i>		
<i>P. dextrinicus</i>			subsp. <i>cremoris</i>		
<i>P. inopinatus</i>			subsp. <i>dextranicum</i>		
<i>P. parcutus</i>			<i>L. argentinum</i>		
<i>Tetragenococcus</i>			<i>L. citreum</i>		
<i>T. halophilus</i>	L	36,5	<i>L. fallax</i>		
<i>T. muriaticus</i>			<i>L. pseudomesenteroides</i>		
<i>Streptococcus</i>			<i>Carnobacterium</i>		
<i>S. bovis</i>	D(-)	38 - 42	<i>C. divergens</i>		33,0 - 36,4
<i>S. thermophilus</i>	D(-)	40	<i>C. mobile</i>		35,5 - 37,2
<i>Lactococcus</i>			<i>C. gallinarum</i>		34,3 - 36,4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>			<i>C. psicicola</i>		33,7 - 36,4
Biovar <i>diacetylactis</i>	L(+)	38,4 - 38,6	<i>Weissella</i>		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	L(+)	38,0 - 40,0	<i>W. confusa</i>	DL	44,5 - 45,0
<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>		35,2	<i>W. hellenica</i>	D(-)	37 - 47
<i>L. garvieae</i>		38,3 - 38,7	<i>W. halotolerans</i>	DL	45
<i>L. plantarum</i>		36,9 - 38,1	<i>W. kandleri</i>	DL	39
<i>L. raffinolactis</i>		40,0 - 43	<i>W. minor</i>	DL	44
<i>Vagococcus</i>			<i>W. paramesenteroides</i>	D(-)	38 - 39
<i>V. fluvialis</i>		33,6	<i>W. viridescens</i>	DL	43
<i>V. salmoninarum</i>		36,0 - 36,5	<i>Oenococcus</i>		
			<i>O. oeni</i>	DL	38 - 42

PRODUTOS LÁCTEOS

Entre os produtos lácteos fermentados, destacamos neste artigo o leite, os produtos que utilizam culturas starter, como a manteiga e o iogurte, e os queijos.

Leite

Os microorganismos presentes no leite cru de vaca são os mesmos

encontrados no úbere e na pele desse animal, nos utensílios da ordenha ou nas tubulações da coleta. Sob boas condições de manuseio e conservação, a biota predominante é gram positiva. O leite cru mantido sob temperaturas de refrigeração por muitos dias apresenta, inevitavelmente, várias ou todas as bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacte-*

*rium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes de pelo menos um dos gêneros dos coliformes. A biota incapaz de crescer nas baixas temperaturas habituais de armazenamento tende a apresentar números muito reduzidos. Alguns estudos têm demonstrado a presença de bactérias psicrotróficas formadoras de esporos e de microbactérias no leite cru. Por exemplo, em um estudo, o *Bacillus spp.* psicrotróficos foram encontrados em 25% a 36% de 97 amostras de leite cru, tendo mostrado capacidade de crescer a 7°C ou menos. Em outro estudo, o *Clostridium* psicrotróficos foram isolados em quatro de 48 amostras de leite cru. *Mycobacterium* e *Nocardia spp.* foram isolados em aproximadamente 69% das 51 amostras de leite cru em outro estudo. O processo de pasteurização elimina todas essas bactérias, menos linhagens termodúricas, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e bactérias formadoras de esporos do gênero *Bacillus* (e *Clostridium*, se presente no leite).

O leite é o veículo de algumas doenças. O consumo de leite cru geralmente está relacionado com os surtos registrados, incluindo leites crus inspecionados. Sorvetes preparados em casa contendo ovos, leite em pó ou leite pasteurizado contaminado após os processos de aquecimento têm sido associados aos surtos alimentares. A campilobacteriose e as salmoneloses são reconhecidas como doenças que podem ser transmitidas pelo leite ou por produtos lácteos. Casos de listeriose e colite hemorrágica têm sido relacionados ao leite. Alguns questionamentos foram levantados a respeito da eficácia da pasteurização na destruição do *Mycobacterium paratuberculosis*. O interesse vem do fato de que essa bactéria causa a doença de Johne no gado e parece exercer alguma função na doença de Crohn em humanos. Em um estudo, nenhum dos métodos de pasteurização



Streptococcus

(alta temperatura por curtos períodos - HTST - e baixa temperatura por longos períodos - LTLT) destruiu 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC/mL em todas as amostras de leite, mas, em outro estudo, mais de 10<sup>6</sup> UFC/mL foram destruídas pelo HTST (72°C por 15 segundos). A doença de Crohn é uma doença inflamatória do intestino (inflamação na região do íleo), na qual o íleo terminal e, as vezes, o ceco e o cólon ascendente se tornam espessos e ulcerados. O lúmen da região afetada torna-se muito estreito, resultando em uma obstrução intestinal.

A deterioração de produtos contendo leite pasteurizado tem duas origens comuns. A primeira é o crescimento e a atividade metabólica de organismos psicrotróficos, como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *flavobacterium spp.* Esses bastonetes gram negativos, que normalmente são lipolíticos e proteolíticos, são contaminantes após a pasteurização. Os organismos proteolíticos podem causar a desestabilização das micelas de caseína e uma “coagulação doce” no leite. No entanto, a deterioração predominante se manifesta por meio de odores acres e frutuosos. A segunda é o crescimento de organismos resistentes ao calor que podem fermentar a lactose até ácido láctico. Quando o pH é reduzido para 4,6, o leite coagula. Se esporos de bolores estão presentes, podem germinar e crescer na superfície do leite azedo e elevar o pH até torná-lo neutro, propiciando o

crescimento de bactérias proteolíticas, como a *Pseudomonas spp.* e a liquefação dos coágulos do leite.

Em produtos lácteos com uma vida de prateleira mais longa, a deterioração por bactérias psicrotróficas formadoras de esporos é um problema sério. Organismos como o *Bacillus cereus* podem sobreviver ao processo UHT e, devido a longa vida de prateleira, crescer e produzir toxinas, além de também poderem causar uma “coagulação doce” nos produtos.

A deterioração microbiana do leite cru é similar à deterioração anteriormente descrita, no caso do produto ser mantido sob refrigeração. A viscosidade presente, as vezes, no leite cru é causada pelo *Alcaligenes viscolactis*. Seu crescimento é favorecido pela manutenção do leite cru em baixas temperaturas por muitos dias. A viscosidade ocorre devido a produção bacteriana de uma camada viscosa, a qual dá ao produto uma consistência pegajosa.

Culturas starter

Uma cultura starter láctea é essencial na indústria de laticínios. Para a produção de qualquer tipo de queijo, é fundamental que haja uma produção de ácido láctico, e a cultura starter láctea é adicionada com essa finalidade. As culturas starter lácteas também são utilizadas em manteigas, queijos *cottage*, *buttermilk* e *sour cream* e

são frequentemente citadas nos produtos. Sempre incluem bactérias que convertem lactose em ácido láctico, normalmente o *L. lactis* subespécie *lactis*, o *L. lactis* subespécie *cremoris* ou o *L. lactis* subespécie *lactis* biótipo *diacetylactis*. Quando compostos com aroma e sabor de diacetil são necessários, a cultura starter láctea inclui bactérias heterolácticas, tais como o *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *cremoris*, o *L. lactis* subespécie *lactis* biótipo *diacetylactis* ou o *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *dextranicum*. As culturas starter podem ser formadas por uma ou várias linhagens. Podem ser produzidas em grandes quantidades e congeladas em nitrogênio líquido para sua preservação ou congeladas a seco. Os *Lactococcus* normalmente constituem cerca de 90% da população de uma cultura starter láctea, e uma boa cultura láctea pode converter quase toda a lactose em ácido láctico. A acidez titulável pode aumentar para 0,8% a 1,0%, calculada como ácido láctico, e o pH normalmente diminui para 4,3 a 4,5.

A manteiga, o *buttermilk* e o *sour cream* são produzidos normalmente pela inoculação de nata ou leite pasteurizado com uma cultura starter láctea. Após a inoculação, tais produtos são mantidos em temperaturas apropriadas até que atinjam a acidez desejada. No caso da manteiga, o creme é inoculado e deixado acidificar, sendo então agitado até a formação da manteiga, a qual é lavada, salgada e, então, embalada. O *buttermilk*, como o nome sugere, é o leite que sobra depois que a nata é batida para a produção da manteiga. A sua produção comercial geralmente é realizada inoculando-se o leite desnatado como culturas starter lácteas ou culturas próprias para *buttermilk*, as quais são mantidas em temperatura apropriada para a acidificação. Os coágulos resultantes são quebrados em finas partículas por meio de agitação; este produto é chamado de *buttermilk* cultivado. O *sour cream* feito com culturas starter é geralmente preparado pela fermentação da nata pasteurizada e homogeneizada com pouca gordura. Esses produtos devem o seu sabor azedo ao ácido láctico e o seu aroma e gosto de manteiga ao diacetil.

O iogurte é produzido com culturas *starter* específicas, as quais as culturas mistas de *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* em uma proporção de 1:1. Na presença dos *Lactobacillus*, os cocos crescem mais rápido do que os bastonetes e produzem uma quantidade maior de ácido do que se estivessem sozinhos. Há uma maior produção de acetaldeído



Lactobacillus bulgaricus

(o componente volátil mais importante no sabor do iogurte) quando o *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* cresce em associação com o *S. thermophilus*. Os cocos podem produzir aproximadamente 0,5% de ácido láctico, e os bastonetes, de 0,6% a 0,8% (pH de 4,2 a 4,5). Contudo, se o tempo de incubação for maior, o pH pode baixar para aproximadamente 3,5, e o ácido láctico, aumentar para 2%.

O iogurte é preparado reduzindo-se o conteúdo de água do leite integral ou desnatado em pelo menos um quarto. Isso pode ser feito em um recipiente a vácuo, depois da esterilização do leite, ou adicionando-se cerca de 5% de sólidos lácteos, sendo a água então reduzida (condensação). O leite concentrado é aquecido a 82°C a 93°C, por 30 a 60 minutos, e refrigerado a 45°C. A cultura *starter* é adicionada em concentração de aproximadamente 2% do volume, sendo em seguida incubada a 45°C por três a cinco horas e, então, resfriada a 5°C. A acidez de um produto final de boa qualidade é de 0,85% a 0,90%. Para atingir tal nível de acidez, o produto fermentado deve ser removido da incubação a 45°C quando a acidez está ao redor de 0,65% a 0,70%. Um bom iogurte se mantém em boas condições de consumo a 5°C por uma a duas semanas. Os

cocos crescem antes dos bastonetes durante a fermentação, mas depois de três horas o número desses dois microorganismos deve ser quase igual. Índices maiores de acidez, como 4%, podem ser obtidos deixando-se o produto fermentar por mais tempo, fazendo com que o número de bastonetes exceda o número de cocos. O *Streptococcus* tende a ser inibido quando o pH fica entre 4,2 e 4,4; já o *Lactobacillus* pode tolerar valores de pH entre 3,5 e 3,8. O ácido láctico do iogurte é produzido em maior quantidade pela glicose proveniente da lactose do que da galactose.

Iogurtes recém produzidos contêm aproximadamente 10<sup>9</sup> organismos/g, mas, durante o seu armazenamento, esse número pode baixar para 10<sup>6</sup>/g, especialmente quando mantidos a 5°C por mais de 60 dias. O número de bastonetes geralmente diminui mais rapidamente do que o número de cocos. A adição de frutas ao iogurte parece não afetar o número de microorganismos

enquanto as leveduras produzem álcool. A concentração final de ácido láctico e álcool pode ser maior do que 1%. O *kumiss* é semelhante ao *kefir*, exceto pelo fato de que o leite utilizado é o de égua, os microorganismos não formam grãos e a quantidade de álcool pode atingir 2%.

O leite acidificado é produzido mediante a inoculação da linhagem de *L. acidophilus* em leite desnatado estéril. Depois no inóculo de 15 a 2% ser preparado, o produto é submetido a uma temperatura de 37°C até que o leite coagule. Uma variação muito popular desse produto é comercializada nos Estados Unidos e consiste na adição de uma linhagem concentrada de *L. acidophilus* a um tanque de leite integral pasteurizado e frio (ou leite desnatado ou com 2% de gordura). O produto é imediatamente engarrafado. Apresenta pH de leite normal e é mais saboroso do que os produtos mais ácidos. O número de *L. acidophilus* varia entre 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup>/mL. O *buttermilk búlgaro* é produzido de forma similar, mas utilizando a linhagem de *L. bulgaricus* como cultura *starter*. Ao contrário do *L. acidophilus*, o *L. bulgaricus* não coloniza o intestino humano. Uma relação de leites fermentados é apresentada na Tabela 2. A manteiga contém cerca de

fermentadores. A norma da Federação Internacional de Produtos Lácteos para iogurtes é de 10<sup>7</sup>/g ou mais.

O *kefir* é produzido a partir de grânulos que contêm os microorganismos *L. lactis*, *L. bulgaricus* e leveduras fermentadoras de lactose, os quais são mantidos juntos por camadas de proteínas coaguladas. A produção e ácido é realizada pelas bactérias,

15% de água, 81% de gordura e geralmente menos de 0,5% de carboidratos e proteínas. Embora não seja um produto altamente perecível, é deteriorada por bactérias e fungos. A maior fonte para os microorganismos na manteiga é a nata, seja doce ou azeda, pasteurizada ou não pasteurizada. A flora do leite integral é observada na nata, pois os microorganismos se encontram nas gotículas de gordura que sobem para a superfície do leite. O processo de obtenção de manteiga por meio da nata, seja natural ou pasteurizada, reduz o número total de microorganismos. Os valores para o produto acabado variam de algumas centenas até mais de 100.000/g em amostras de manteiga salgada. A manteiga salgada pode conter mais de 2% de sal, o que significa que as gotículas de água podem conter um nível efetivo de cerca de 10%, fazendo com que o produto seja menos susceptível à deterioração microbiana.

As bactérias causam dois tipos de deterioração na manteiga. O primeiro é conhecido como “mancha de superfície” ou putrefação. Essa deterioração é causada pela *Pseudomonas putrefaciens* e ocorre devido ao seu crescimento na superfície da manteiga pronta. Ela se desenvolve em temperaturas que variam entre 4°C e 7°C e se torna visível entre 7 e 10 dias. O odor se deve, aparentemente, a certos ácidos orgânicos, especialmente ao ácido isovalérico. A segunda deterioração bacteriana mais comum da manteiga é a rancidez. Esta é causada pela hidrólise da gordura com a liberação de ácidos graxos livres. As lípases provenientes de fontes não microbiológicas podem causar essa deterioração. O microorganismo responsável é o *Pseudomonas fragi*, embora as vezes a *P. fluorescens* também esteja envolvida. As bactérias podem causar outros três tipos de deterioração menos comuns na manteiga. Um sabor maltado é causado pelo crescimento do *Lactococcus lactis*, var. *maltigenes*. Um odor “semelhante a gambá” é causado pela *Pseudomonas mephitica*, e a *P. nigrificans* tem sido apontada como a causadora de manchas negras na manteiga.

A deterioração por fungos é menos comum, mas acontece devido a espécies como *Clostridium*, *Alternaria*, *Asper-*



*gillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Geotrichum*, especialmente o *G. candidum* (*Oospora lactis*). Esses microorganismos podem ser encontrados na superfície da manteiga, onde produzem colorações referentes às cores dos seus esporos. Leveduras negras do gênero *Torula* também causam manchas na manteiga. Exames microscópicos revelaram a presença de micélios de bolores um pouco distantes dos pontos de crescimento visíveis. O alto teor lipídico e a baixa concentração de água fazem com que a manteiga seja mais susceptível à deterioração por bolores do que por bactérias.

O queijo *cottage* sofre deterioração por bactérias, leveduras e bolores. O exemplo mais comum de deterioração bacteriana é conhecido como “coágulos viscosos”. O *Alcaligenes spp.* tem sido apontado como um dos microorganismos mais frequentemente encontrados, embora *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Acinetobacter spp.*, também tenham sido implicados. *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria* e *Geotrichum* apresentam um bom crescimento no queijo *cottage*, dando a ele um sabor “mofado” ou que lembra leveduras.

**Queijos**

A maioria dos queijos resulta de uma fermentação láctica. Em geral, o processo de manufatura consiste em dois passos importantes. Em um dos passos, o leite é preparado e inoculado com uma cultura *starter* láctica apropriada. A cultura *starter* produz ácido láctico que, juntamente com a renina, forma a coalhada. A cultura *starter* para a produção do queijo pode ser diferente, dependendo da quantidade de calor aplicada à coalhada. O *S. thermophilus* é empregado na produção de ácido láctico em coalhadas cozidas, pois é mais tolerante ao calor do que a maioria das outras culturas *starter*; uma combinação de *S. thermophilus* e *L. lactis* subsp. *lactis* é empregada em coalhadas que passam por um cozimento intermediário. No outro passo, a coalhada é comprimida, pressionada e depois salgada. Em casos nos quais há a maturação, esse processo é realizado em condições apropriadas ao queijo em questão.

Embora muitos queijos maturados sejam produtos da atividade metabólica das bactérias acidolácticas, diversos queijos bem conhecidos devem as suas

TABELA 2 - ALGUNS PRODUTOS FERMENTADOS

Alimentos e produtos	Matéria-prima	Organismos fermentadores	Local de produção
Buttermilk búlgara		<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Balcãs
Iogurte	Leite, sólidos do leite	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Todo o mundo
Kefir	Leite	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , “ <i>Torula</i> ” spp.	Sudoeste asiático
Kumiss	Leite cru de égua	<i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgarica</i> , “ <i>Torula</i> ” spp.	Rússia
Leite acidificado	Leite	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Vários países
Queijos (maturados)	Leite coalhado	Culturas <i>starter</i> lácticas	Todo o mundo
Taette	Leite	<i>S. lactis</i> var. <i>taette</i>	Península escandinava
Tarhana*	Farinha de trigo e iogurte	Lácticos	Turquia

\* Similar ao lishk na Síria e ao kushuk no Ira

características a outros organismos. No caso do queijo suíço, uma mistura de culturas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* normalmente é empregada juntamente com uma cultura de *Propionibacterium shermanii*, a qual é adicionada ao queijo durante o processo de maturação para o desenvolvimento do sabor e a formação das “olhaduras”.

Para produzir queijos azuis, como o *Roquefort*, a coalhada é inoculada com esporos de *Penicillium roqueforti*, os quais ajudam na maturação e conferem o aspecto de veias azuis característico desse tipo de queijo. De uma maneira semelhante, o leite ou a superfície do queijo Camembert são inoculados com esporos de *Penicillium camemberti*.

Existem mais de 400 variedades de queijos, representando menos de 20 tipos, os quais são agrupados ou classificados de acordo com a sua textura, seu teor de umidade e sua maturação ou não. No caso dos maturados, estes também são classificados conforme a realização do processo, ou seja, por bactérias ou bolores. Os três tipos de textura dos queijos são duro, semiduro e mole. Exemplos de queijos duros são o cheddar, provolone, romano e Edam. Todos os queijos duros são maturados por bactérias por um período que varia entre dois e 16 meses. Os queijos semiduros incluem o Muenster e o Gouda e são maturados por bactérias durante períodos de um a oito meses. O Blue e o Roquefort são dois exemplos de queijos semiduros maturados por bolores por dois a 12 meses. O Limburger é um exemplo de queijo mole maturado por bactérias; o Brie e o Camembert são exemplos de queijos moles maturados por bolores. Entre os queijos não maturados estão o cottage, o cream cheese e o Neufchatel.

O baixo teor de umidade dos queijos duros e semiduros faz com que



não sejam deteriorados pela maioria dos microorganismos, embora os bolores possam crescer nesses produtos. Alguns queijos maturados têm um potencial de oxirredução (O/R) suficientemente baixo para o crescimento de microorganismos anaeróbios. Assim, quando a atividade de água permite o crescimento, as bactérias anaeróbias são as responsáveis pela deterioração desses produtos. Os *Clostridium spp.*, especialmente o *C. pasteurianum*, o *C. butyricum*, o *C. sporogenes* e o *C. tyrobutyricum*, causam estufamento nos queijos. O *C. tyrobutyricum* é conhecido por causar a fermentação do ácido butírico, provocando o defeito conhecido como “estufamento tardio” em queijos como o Gouda. O *Bacillus polymyxa*, uma bactéria aeróbia formadora de esporos, foi apontado como causa de estufamentos. O estufamento resulta da utilização de ácido láctico com a produção de CO<sub>2</sub>. A atividade dessa bactéria pode ser retardada por várias semanas com a utilização de 0,5% de polifosfato alimentar de cadeia longa e completamente inibida por 1,0% do mesmo produto.

## LEITES FERMENTADOS

Os benefícios à saúde dos consumidores proporcionados por certos alimentos fermentados e/ou organismos fermentadores são avaliados segundo descobertas contra e a favor dos mesmos. Alguns estudos apóiam os benefícios à saúde, entretanto, outros dizem o contrário. Os três tópicos de interesse são os possíveis benefícios a indivíduos com intolerância à lactose, a diminuição do colesterol e as atividades contra o câncer.

A intolerância à lactose (má absorção da lactose, hipolactemia intestinal) é uma condição normal dos mamíferos adultos, incluindo a maioria dos adultos humanos. Pesquisas constataram que as pessoas que têm intolerância à lactose podem consumir alguns tipos de produtos lácteos fermentados sem efeitos nocivos; outros estudos, no entanto, não encontraram efeitos benéficos. Quando se observam efeitos benéficos, estes são atribuídos ao baixo nível de lactose do produto fermentado e a produção de -galactosidase pelos organismos fermentadores depois da ingestão desses

produtos. Em um estudo, a quantidade de lactose de um iogurte armazenado por 11 dias diminuiu pela metade (de 4,8g/100g em leite não fermentado para 2,3g/100g). Durante o mesmo período, a galactose que apresentava apenas resquícios no leite aumentou para 1,3g/100g no iogurte; resultados similares foram obtidos em leites acidificados e leites com bifidus.

Alguns estudos mostram que o leite acidificado “adoceicado” previne os sintomas da intolerância à lactose, enquanto outros estudos não encontraram nenhum benefício efetivo.

Embora hajam estudos contraditórios, a melhoria dos sintomas da intolerância à lactose devido a bactérias acidoláticas está bem documentado.

Já os estudos dos efeitos do leite fermentado sobre o colesterol teve início em uma tribo africana de Masai, onde, embora o consumo de carne fosse alto, havia um baixo nível de colesterol e de doenças coronárias. Esse fato foi associado ao consumo diário de 4 a 5 litros de leite integral fermentado. Estudos posteriores não explicaram o verdadeiro efeito dos organismos fermentadores nos níveis de colesterol em humanos, embora as evidências levassem a crer que há um efeito positivo. Em um estudo realizado com 26 pessoas, por

exemplo, uma dieta rica em iogurte mostrou uma diminuição nos níveis de colesterol. Tais resultados sugerem que o iogurte contém um fator que inibe a síntese de colesterol do fígado a partir do acetato. Esse fator pode ser tanto o ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico como o ácido orótico acrescido do leite termófilo com compostos solúveis em metanol. Descobriu-se que esses dois ácidos reduziram o nível de colesterol do fígado em comparação com as amostras-controle. Em outro estudo, ratos alimentados com uma ração acrescida de 10% de leite fermentado com *L. acidophilus* por quatro semanas apresentaram uma redução significativa no colesterol quando comparados a ratos que foram submetidos a dietas sem leite fermentado. Embora em alguns estudos a baixa nos níveis de colesterol seja atribuída à redução na síntese, outros pesquisadores acreditam que as bactérias eliminam o colesterol ou os seus precursores do trato gastrointestinal. Em outro estudo, duas linhagens de *L. acidophilus* (provenientes de suínos) cresceram na presença de bile. Uma linhagem assimilou o colesterol de um meio de cultura na presença de bile, em condições anaeróbias, e inibiu significativamente o aumento dos níveis de colesterol em suínos, os quais foram submetidos a uma dieta

rica em colesterol. A outra linhagem não removeu o colesterol do meio de cultura e não reduziu os níveis de colesterol em suínos. Os pesquisadores apresentaram evidências de que algumas linhagens de *L. acidophilus* reduzem o colesterol, agindo diretamente sobre ele no trato gastrointestinal. Mais recentemente, a taxa de colesterol foi reduzida em 50% em um meio de cultura mantido por 10 a 14 dias a 32°C, contendo *Propionibacterium freudenreichii*. Esse microorganismo não degradou o composto, uma vez que mais de 70% pôde ser recuperado das células lavadas.

Em um estudo com humanos, um total de 68 voluntários em idades entre 18 e 26 anos, dividido em grupos de 10 ou 13 pessoas, fez uma dieta com suplementos de leite cru, leite integral, leite desnatado, iogurte, *buttermilk* e leite acidificado “adoceicado”. A dieta foi mantida por três semanas. As conclusões foram de que o *buttermilk*, o iogurte e o leite acidificado não apresentaram efeitos significativos no colesterol. Um estudo realizado por seis semanas com 58 homens saudáveis de origem dinamarquesa mostrou que houve uma redução significativa no colesterol daqueles que se alimentaram com produtos lácteos fermentados por *Enterococcus faecium* e duas linhagens de *Streptococcus thermophilus*. O produto fermentado continha 2 x 10<sup>8</sup>/mL de *E. faecium* e cerca de 7 x 10<sup>8</sup>/mL de *S. thermophilus*.

Com relação aos efeitos anticarcinogênicos, aparentemente, a primeira observação da atividade anticancerígena das bactérias acidoláticas foi realizada na União Soviética em 1962, onde foi demonstrado um efeito contra o sarcoma e o carcinoma. As atividades anticancerígenas têm sido demonstradas em animais por um grande número de pesquisadores que empregam iogurte e extratos de iogurte de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. casei*, além de extratos desses microorganismos.

Para estudar o efeito de suplementos orais de *L. acidophilus* na atividade enzimática das bactérias fecais, pesquisadores utilizaram 21 voluntários humanos. As enzimas analisadas foram β-galacturonidase, nitrorredutase e azorredutase, pois elas podem converter in-



diretamente carcinomas ativos em carcinomas proximais. A dieta consistiu em um período de quatro semanas de controle, seguidas por quatro semanas de leite comum, quatro semanas de controle, quatro semanas de leite contendo  $2 \times 10^6/\text{mL}$  de *L. acidophilus* e quatro semanas de controle. Reduções de duas a quatro vezes nas atividades das três enzimas foram observadas em todos os voluntários durante o período da dieta com *Lactobacillus*; os níveis das enzimas voltaram ao normal durante as quatro semanas finais no período de controle. Estudos semelhantes, porém, mais limitados têm sido realizados por outros pesquisadores. Descobertas como essas podem ser significativas no caso de câncer do cólon, em que as evidências suportam a importância da dieta.

## OS PROBIÓTICOS

O termo probiótico, de acordo com a Legislação Brasileira, é definido como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta de maneira benéfica o organismo pela melhora no seu balanço microbiano.

Os primeiros estudos científicos sobre microorganismos e suas interações com o hospedeiro humano, embora sob uma perspectiva negativa, ocorreram na segunda metade do século 19. Já em 1885, o pediatra e bacteriologista



alemão Theodor Escherich (1857-1911) descreveu a microbiota e, em 1886, a colonização do trato gastrointestinal (GIT) infantil, sugerindo o efeito benéfico de certas bactérias na digestão. Porém, foi o obstetra alemão Albert Döderlein (1860-1941) o primeiro cientista a sugerir a associação benéfica das bactérias vaginais pela produção de ácido láctico de açúcares, prevenindo ou inibindo o crescimento de bactérias patogênicas. As bactérias do gênero *Lactobacillus*, que formam a flora vaginal normal, são designadas com o nome de bacilo de Döderlein ou de flora de Döderlein. Recentes pesquisas destacam a importância vital de uma população microbiana “saudável” no GIT. Particularmente, a associação benéfica da bactéria ácido láctica com o hospedeiro humano.

O zoologista e microbiologista russo Ilya Ilich Mechnikov (1845-1916), apelidado em inglês de Elie Metschnikoff, foi o primeiro a postular o benefício à saúde da bactéria ácido láctica associada com produtos de leite fermentado.

A influência benéfica dos probióticos na microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos e efeitos imuno-

lógicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro.

Vários microorganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos.

A utilização de probióticos é recomendada a qualquer pessoa que queira favorecer o equilíbrio da microbiota intestinal.

Os diferentes probióticos são estudados e comercializados na forma de preparações contendo um único ou uma combinação de microorganismos. São comercializados na forma de preparações farmacêuticas, em cápsulas ou sachês, ou naturais, como leite fermentado ou iogurtes.

O grande uso das bactérias do gênero *Lactobacillus* em alimentos, decorre dos resultados de seu comportamento nos mesmos, como capacidade de fermentar açúcares, formando ácido láctico abundantemente; capacidade termodúrica, tornando-a resistente a tratamentos térmicos mais baixos; alta elaboração de ácido láctico, eliminando de seus substratos microorganismos competitivos; capacidade de formar substância voláteis, alterando valores sensoriais de determinados alimentos; e incapacidade de sintetizar a maioria das vitaminas exigidas, impedindo seu crescimento em meios carentes desses nutrientes reguladores.

Atualmente, os alimentos probióticos disponíveis no mercado incluem sobremesas à base de leite, leite fermentado, leite em pó, sorvete, iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, sucos fortificados, alimentos de origem vegetal fermentados e maioneses.

