

# CRESCIMENTO DE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* E *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS* EM MEIOS DE CULTURA INDUSTRIAIS

Maicon Toldi<sup>1</sup>, Tábata Iasmine Kappler<sup>2</sup>, Rosângela Uhrig Salvatori<sup>3</sup>

**Resumo:** A produção leiteira cresce impulsionada pelo valor agregado do processamento de leite cru. Processos fermentativos são usados para melhorar a conservação, textura, sabor e aroma de derivados lácteos. O iogurte é produzido dessa forma e as bactérias envolvidas na sua produção são *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, que possuem a capacidade de utilizar a lactose como substrato energético produzindo ácido láctico. O objetivo deste trabalho é definir cepas das bactérias ácido-lácticas que tenham melhores características de crescimento em meios de cultura industriais. As seis cepas testadas foram isoladas e identificadas pela *Università degli Studi di Parma* (Itália). Foram testados a produção de biomassa das cepas e os diferentes meios de cultura para produzi-las. Os testes de crescimento foram feitos em meio de cultura líquido. Para quantificar o crescimento das bactérias foram utilizadas medidas de densidade e de pH durante a fermentação. As cepas que apresentaram melhor crescimento foram o *S. thermophilus* BT03 e *L. bulgaricus* BT04. O meio de cultura industrial que apresentou melhor desempenho foi o soro de leite com 0,1% de Fosfato de sódio. O tempo estimado de fermentação em reator foi de cinco horas. Esses resultados indicam como pode ser a produção de culturas na indústria. O trabalho tem caráter inovador, já que as cepas testadas são inéditas no mercado de fermento brasileiro.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido-lácticas. Biotecnologia. Laticínios.

## 1 INTRODUÇÃO

Os laticínios agregam valor ao leite cru ao processá-lo em doce de leite, queijo, leite em pó e iogurte. Dessa forma, o crescimento da produção leiteira é financiado pela industrialização desses derivados (FAO, 2006). Com a pasteurização do leite, necessária para assegurar a qualidade dos produtos lácteos e a segurança do consumidor, o leite perde a sua microbiota natural, sendo necessária a adição intencional de culturas lácticas para realizar o processo fermentativo. As culturas podem ser utilizadas também com o intuito de melhorar a conservação do alimento devido à produção de metabólitos antimicrobianos, uma vez que são eficazes no controle de microrganismos patogênicos e deteriorantes (SULLIVAN et al., 2002).

A bioconservação é uma forma natural de controlar o desenvolvimento microbiano substituindo conservantes químicos. Ela pode ser utilizada juntamente com as boas práticas de fabricação e higienização para evitar o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes

---

1 Bolsista CNPq de iniciação científica no Centro Universitário UNIVATES, tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Biotecnologia.

2 Graduanda no curso de Administração de Empresas pelo Centro Universitário UNIVATES.

3 Mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1999), professora e coordenadora dos cursos de Ciências Biológicas, licenciatura e bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES e integrante da Comissão de Fiscalização e Aperfeiçoamento Profissional (CFAP) do Conselho Regional de Biologia 3ª Região.

(MATAGARAS et al., 2003; NASCIMENTO et al. 2008). As culturas de bactérias adicionadas aos produtos produzem naturalmente bacteriocinas e combatem agentes patogênicos, sendo, assim, uma alternativa promissora ao uso de antibióticos clássicos (GILLOR et al., 2008).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) recebem essa denominação devido à sua capacidade de converter carboidratos em ácido láctico. São caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, não esporulantes, anaeróbios facultativos e ácidos tolerantes. São largamente utilizadas industrialmente, principalmente como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, como: queijos, leites fermentados e manteiga. Elas têm a capacidade de hidrolisar proteínas, açúcares e lipídeos, além de possuírem grande influência sobre o perfil sensorial do produto final, resultando em melhora da textura, do sabor e do aroma (PESCUMA et al., 2008).

A biodiversidade das bactérias envolvidas na produção de iogurtes e de outros derivados lácteos é um fator fundamental para a manutenção das características típicas de sabor e aroma dos produtos (GASPAR et al., 2013). A produção de lácteos fermentados de alta qualidade requer uma estreita atenção para a caracterização, diferenciação e manutenção das culturas de bactérias ácido-lácticas envolvidas (POGACIC et al., 2013).

As bactérias clássicas na produção de iogurte são *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. As espécies microbianas mais acidificantes são a *S. thermophilus*, enquanto as cepas *L. bulgaricus* são mais proteolíticas, influenciando o sabor, a textura e o aroma dos iogurtes (MARINO et al., 2003). Elas não resistem às condições adversas do trato digestório, são sensíveis à bile e incapazes de colonizar o intestino humano. Já as culturas probióticas fornecem efeitos terapêuticos ao homem ao se fixarem na parede do cólon, porém precisam estar viáveis no alimento e serem ingeridas com frequência. Os microrganismos mais utilizados para iogurtes funcionais são *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacteria ssp.* (ANTUNES et al., 2008).

O soro de leite, um subproduto da indústria do queijo, normalmente é eliminado como resíduo; entretanto, é uma valiosa fonte de proteínas. Cepas de bactérias ácido-lácticas podem crescer bem em meios à base de soro (PESCUMA et al., 2008), porém esse soro deve ser enriquecido para atender as necessidades nutricionais das bactérias. Esses microrganismos têm necessidades nutricionais complexas e, por esse motivo, pequenas variações do meio de cultura oferecido podem acelerar, retardar ou mesmo inibir seu crescimento (HEBERT et al., 2000).

As indústrias que utilizam os processos biotecnológicos encontram uma barreira para ampliação de mercado. Isso ocorre pois há uma carência na produção nacional e na comercialização de insumos, como os fermentos lácteos, assim designadas as bactérias utilizadas na fermentação. Atualmente, os fermentos lácteos são importados, e possibilitar a produção desse insumo em nível nacional gera um mercado promissor. Esses fermentos importados, muitas vezes, não atendem as demandas das empresas de laticínios e de consumidores, que estão cada vez mais informados sobre os benefícios dos produtos lácteos fermentados. Um fator relevante que compromete o desempenho dos produtos importados são as diferenças encontradas no leite cru. Assim, é importante definir cepas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* que tenham as características de maior crescimento em meios de cultura baratos.

O objetivo deste trabalho é definir cepas de bactérias ácido-lácticas, que apresentem melhores características de crescimento e definir índices de escala de produção dos fermentos, aperfeiçoando a sua produção. Neste trabalho foram analisadas cepas isoladas pela *Università degli Studi di Parma* (Itália).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de bactérias recebidas da *Università degli Studi di Parma* (Itália) foram manipuladas no Laboratório de Microbiologia da Univates. Elas foram armazenadas em *ultrafreezer* em *eppendorf*, contendo 1 ml de glicerol e 1 ml de meio de cultura com o crescimento das diferentes cepas. Foram utilizados os meios de cultura complexos indicados pela *Università degli Studi di Parma*, que isolou as bactérias. Para *S. thermophilus*, o meio indicado foi o M17, composto, em g/L, de: peptona, 10; extrato de carne, 10; extrato de levedura, 5; dextrose, 20; polisorbato, 1; citrato de amônio, 2; acetato de sódio, 5; sulfato de magnésio, 0.10; sulfato de manganês, 0.05; e fosfato dipotássico, 2. Para o *L. bulgaricus*, utilizou-se o meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe) composto, em g/L, de: digestão peptídica de tecido animal, 5; digestão papaíca de farinha de soja, 5; extrato de levedura, 2.50; extrato de bife, 5; ácido ascórbico, 0.50; sulfato de magnésio, 0.25; e lactose, 5. Foram testados seis biótipos cedidos pela empresa Biotech, adquiridos por meio de contrato de licenciamento, garantindo o uso das mesmas para fins industriais e comerciais. Para identificá-los, foram chamados de BT (Biotech) 01, 02, 03, 04 05 e 06, sendo as três primeiras BT01, BT02, BT03 de *S. thermophilus* e BT04, BT05, BT06 de *L. bulgaricus*.

Os primeiros testes foram feitos em meio de cultura M17 para *S. thermophilus* e MRS para *L. bulgaricus*. Nesses testes foi comparado o crescimento das cepas BT01, BT02 e BT03 de *S. thermophilus* e das cepas BT04, BT05, BT06 de *L. bulgaricus*. Para o experimento foram inoculados, com as cepas do *ultrafreezer*, 10 ml de meio de cultura em crescimento *overnight* a 42°C. Desse crescimento foram diluídos 2 ml de cada cepa em 200 ml de meio. Esses 200 ml permaneceram em *shaker* por cinco horas, em que foram mantidas a temperatura de 42°C e baixa rotação. A cada hora foram avaliados o pH e o valor fotométrico no espectrofotômetro, comprimento de onda 400 mn, para comparativos de crescimento das cepas. Foram avaliadas cinco horas de fermentação.

Após, foram feitos testes para comparação de diferentes meios de cultura à base de soro de leite, considerado como rejeito dos laticínios, conforme o trabalho de Pescuma et al., (2008). Para esses testes foi utilizada a cepa de *S. thermophilus* BT03, pois teve melhor desempenho no primeiro experimento. A Tabela 1 mostra a composição dos diferentes meios testados. Os ingredientes adicionados foram baseados no meio M17, sendo esse utilizado como meio controle. O soro de leite foi coletado na produção de queijo prato de laticínios da região.

Tabela 1 - Composição dos meios testados

Ingredientes	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Soro de leite	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Extrato de levedura	0	0	0	1 g
Peptona	0	0	0	1 g
Lactose	0	1 g	1 g	1 g
Glicose	0	1 g	1 g	1 g
Polissorbato	0	0	0	0,1 g
Fosfato Na	0,1 g	0	0,1 g	0,1 g
Citrato de sódio	0	0	0	0,1 g
Sulfato de Mg	0	0	0	0,02 g

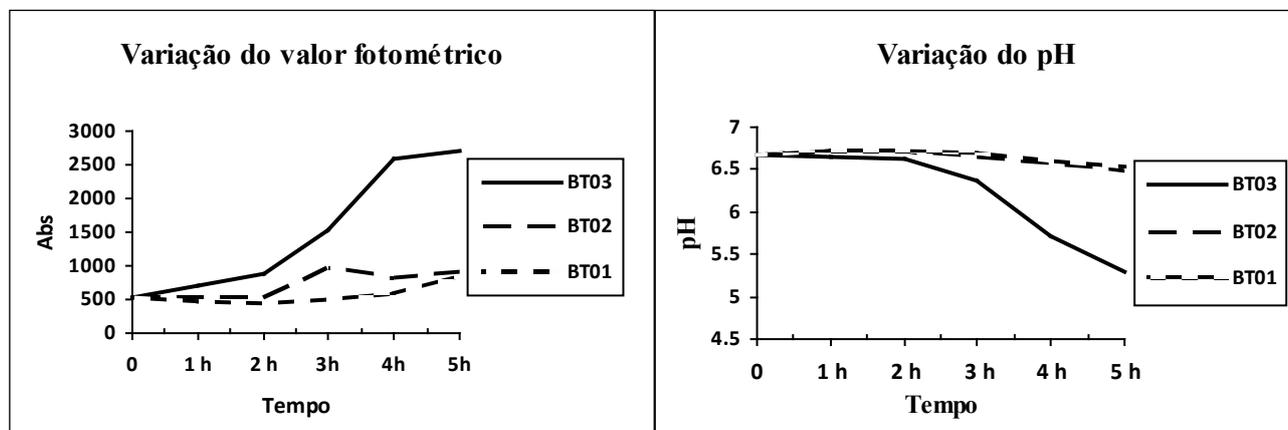
Para iniciar o experimento, foram inoculados, com as cepas do ultrafreezer, 10 ml de meio de cultura para crescer *overnight* a 42°C. Desse crescimento, foram diluídos 2 ml em 200 ml dos diferentes meios. Eles ficaram em *shaker*, em que foram mantidas, por cinco horas a temperatura de 42°C e baixa rotação. A cada hora foi avaliado o pH para comparativos de crescimento dos meios. Foram avaliadas sete horas de fermentação.

Também foi feito teste em reator, com capacidade para 5 L, utilizando a cepa BT03 e meio de cultura composto por soro de leite enriquecido com 0,1% de Fosfato de sódio. A escolha dessa cepa e desse meio foi feita após análise dos testes anteriores, apresentados neste trabalho. Foram inoculados 10 ml de meio de cultura, com as cepas do ultrafreezer, para crescer *overnight* a 42°C. Desse crescimento foram coletados 2 ml e diluídos em 200 ml do meio. Após, 40 ml desse crescimento foram adicionados ao reator com 4 L de meio. A partir desse ponto, a cada hora foram avaliadas o pH e o valor fotométrico no espectrofotômetro, comprimento de onda 400 mn. O pH foi mantido próximo de 6 adicionando hidróxido de amônia 50%, conforme estudo de Balduino et al. (1999). Também referente ao trabalho desse autor, em momentos que se percebeu queda no crescimento da cepa, foi preparada uma solução para alimentar o reator, composta por 1% do volume de glicose e 1% do volume de lactose. Foram avaliadas cinco horas de fermentação.

### 3 RESULTADOS

Observa-se que o melhor crescimento de massa foi da cepa BT03, seguido pela cepa BT02 (FIGURA 1). A diminuição do pH seguiu inversamente ao crescimento de massa. A cepa BT03 diminuiu mais o pH, seguida pela BT02.

Figura 1 - Fermentação de três biotipos de *S. thermophilus*



Os valores fotométricos e do pH das três cepas de *S. thermophilus*, BT01, BT02 e BT03, podem ser vistos na Tabela 2.

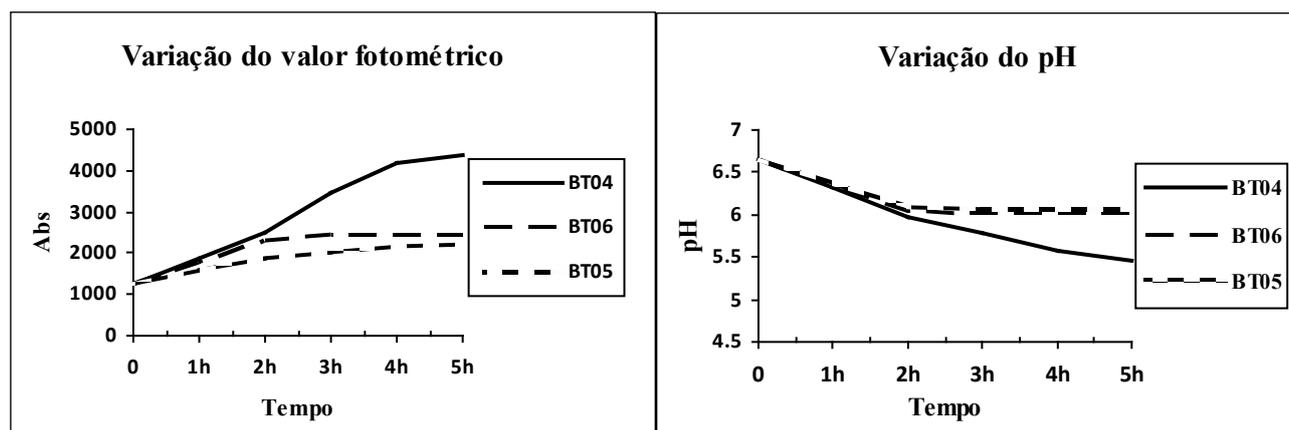
Tabela 2 - Valores de absorvância e pH medidos na fermentação de três cepas de *Streptococcus thermophilus*

	Tempo de fermentação									
	Inicial		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas	
	Abs*	pH	Abs	pH	Abs	pH	Abs	pH	Abs	pH
BT03	521	6,68	884	6,63	1522	6,36	2580	5,71	2712	5,29
BT02	521	6,68	519	6,73	976	6,65	832	6,57	917	6,48
BT01	521	6,68	436	6,73	488	6,7	592	6,61	848	6,53

\* Absorvância, valor fotométrico.

Na Figura 2 podemos observar que o melhor crescimento de massa foi da cepa BT04, seguida pela cepa BT06. A diminuição do pH seguiu inversamente ao crescimento de massa. A cepa BT04 diminuiu mais o pH, seguida pelo biótipo BT06.

Figura 2 - Fermentação de três biótipos de *L. bulgaricus*



Os valores fotométricos e do pH das três cepas de *L. bulgaricus*, BT04, BT05, BT06, podem ser vistos na Tabela 3.

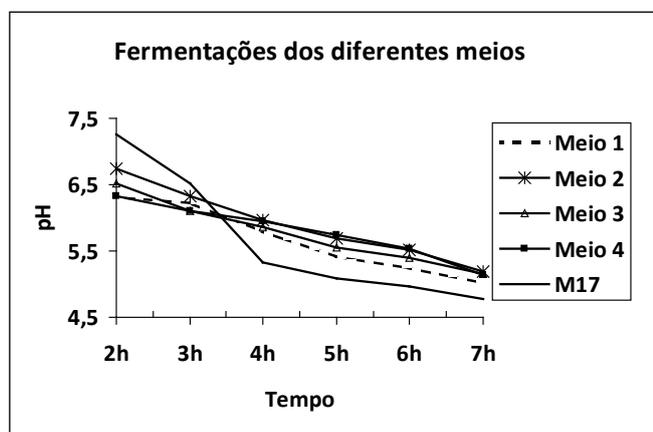
Tabela 3 - Valores de absorvância e pH medidos na fermentação de três cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

	Tempo de fermentação									
	Inicial		2 horas		3 horas		4 horas		5 horas	
	Abs*	pH	Abs	pH	Abs	pH	Abs	pH	Abs	pH
BT04	1248	6,66	2479	5,97	3463	5,79	4169	5,58	4375	5,45
BT06	1248	6,66	2304	6,04	2444	6,03	2464	6,01	2439	6,02
BT05	1248	6,66	1879	6,09	2003	6,06	2184	6,07	2214	6,07

\* Absorvância, valor fotométrico.

Na Figura 3, observa-se que o meio de cultura M17 teve a maior queda no valor de pH, seguido pelo meio com soro de leite enriquecido com 0,01 g/L de fosfato de sódio.

Figura 3 - Fermentação de diferentes meios de cultura.



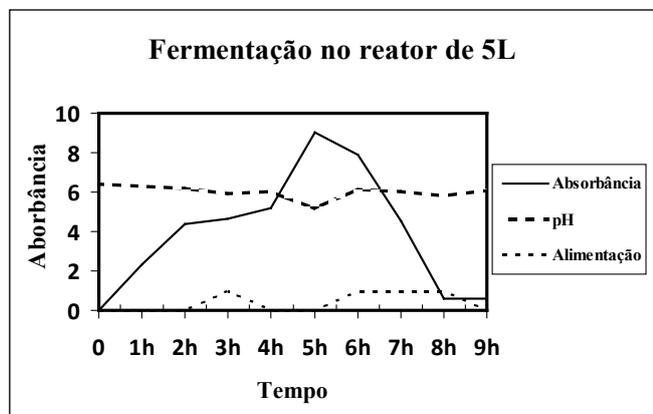
Na Tabela 4 vemos os valores de pH dos diferentes meios.

Tabela 4 - Valores de pH medidos na fermentação *Streptococcus thermophilus* BT03, em diferentes meios de cultura.

	Tempo de fermentação					
	0	3 horas	4 horas	5 horas	6 horas	7 horas
Meio1	6,31	6,23	5,8	5,42	5,24	5,01
Meio2	6,74	6,33	5,96	5,69	5,51	5,19
Meio3	6,52	6,18	5,86	5,56	5,4	5,16
Meio4	6,33	6,1	5,95	5,75	5,54	5,13
M17	7,26	6,52	5,33	5,08	4,96	4,78

A Figura 4 mostra a fermentação em reator da cepa *L. bulgaricus* BT03. O meio de cultura usado foi soro de leite com adição de fosfato de sódio 0,1g/L. A alimentação foi feita quando o crescimento das bactérias estava diminuindo. Entre as 6h e 7h observamos o maior crescimento das bactérias, dificultando o controle de pH conforme mostra a figura. A alimentação feita após cinco horas de fermentação teve a resposta esperada nas medições seguintes, já as alimentações feitas após 8 horas de fermentação não induziram novo crescimento. Esses resultados estão de acordo com os de Balduino et al., (1999), que mostram que as cepas utilizadas, as condições de cultivo e a formulação do meio interferem no desenvolvimento da fermentação láctica.

Figura 4 - Variação dos valores fotométrico e de pH da fermentação de *Streptococcus thermophilus* BT03 em reator com meio de soro de leite enriquecido



A variação do valor fotométrico e do pH na fermentação do reator podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5: Variação dos valores fotométrico e de pH da fermentação de *Streptococcus thermophilus* BT03, em reator com meio de soro de leite enriquecido.

	Tempo de fermentação									
	0	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h
Absorbância	0	2,3	4,4	4,63	5,2	9,04	7,89	4,56	0,6	0,6
pH	6,44	6,32	6,23	5,93	6,08	5,17	6,16	6,06	5,85	6,1
Alimentação	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0

#### 4 CONCLUSÃO

A cepa de *S. thermophilus* que demonstrou melhor crescimento foi a BT03; já a de *L. bulgaricus* foi a BT04. O meio de cultura industrial que se mostrou mais adequado foi soro de leite enriquecido com 0,01 g/L de fosfato de sódio. O tempo de fermentação, no reator, que teve maior crescimento, foi de cinco horas. Estes resultados podem ser objeto de estudo para trabalhos futuros, em que poderão ser testadas as características do iogurte produzido com as seis cepas estudadas.

#### REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; BOLINI, H. M. A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2008.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S. de; HAULY, M. C. de O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol.19, n.3, p. 363-366, 1999.

FAO. **Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system in raw milk preservation:** of an FAO/WHO technical meeting. FAO/WHO 2006.

GASPAR, P. et al. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, 2013.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

HEBERT, E.M., RAYA, R.R., DE GIORI, G.S., Nutritional requirements

and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactoba-*

*cillus helveticus* CRL 1062. **Appl. Environ. Microbiol**, v.66, p. 5316–5321, 2000.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montaisa cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.

MATAGARAS, M.; DORSINOS, E. H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4+/-2C. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 259-265, 2003.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. **International Journal of Dairy Tecnology**, v. 61, n. 4, p. 352-357, 2008.

PESCUMA, M. et al. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 442-451, 2008.

POGACIC, T. et al. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 207-215, 2013.

SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.