

Estudo do comportamento da fermentação láctica em extrato líquido de arroz tratado enzimaticamente para elaboração de uma bebida fermentada

Flávia Pasini¹ · Miquele Lazarin Padula²

Resumo A população em geral está mais consciente quando se trata do assunto saúde. Sendo assim, as indústrias têm desenvolvido novas alternativas de alimentos capazes de substituir alimentos tradicionais por similares isentos de componentes que possam causar alergias ou intolerâncias. Nesta pesquisa, procurou-se verificar o comportamento da fermentação láctica em extrato líquido de arroz tratado enzimaticamente com a enzima alfa amilase termorresistente, com o objetivo de se obter uma bebida fermentada. Fez-se o acompanhamento da hidrólise enzimática, bem como da fermentação láctica, verificando parâmetros como pH, temperatura, viscosidade, teor de sólidos solúveis e de ácido láctico. O teor de sólidos solúveis no extrato líquido de arroz foi praticamente duplicado durante a hidrólise enzimática. Ao longo da fermentação, observou-se que os valores de pH para o extrato líquido de arroz e para o leite pasteurizado foram semelhantes, e o teor de sólidos solúveis obteve comportamento similar até o período de 4 horas de fermentação, após esse período o teor de sólidos solúveis para o extrato líquido de arroz obteve pouca variação devido, possivelmente, à reativação da enzima. A produção de ácido láctico para o extrato líquido de arroz foi inferior, quando comparada ao leite pasteurizado, devido à baixa produção de glicose e alta produção de maltose no processo de hidrólise enzimática.

Palavras-chave Alfa amilase termorresistente · Bebida fermentada · Extrato líquido de arroz · Hidrólise enzimática · Fermentação láctica.

✉ ¹ flavinhapasini@hotmail.com

✉ ² mlp@unesb.net

1 Introdução

O uso dos alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde e, ao mesmo tempo, como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado (MATSUBARA, 2001 apud GIANETTI

THAMER; LÚCIA; PENNA, 2006). Vem crescendo nos últimos anos, o interesse por alimentos mais saudáveis, o que resulta na ampliação dos estudos na área de bebidas fermentadas.

O leite possui um elevado valor nutritivo, sendo considerado um dos principais alimentos dos seres humanos. Os macrocomponentes do leite bovino são a água (87,30%), a lactose (4,90%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%) e minerais (0,72%) (SGARBIERI, 2004). A ingestão do leite está associada a uma melhor dieta, qualidade, e tem sido associada a um risco reduzido de doenças crônicas, incluindo hipertensão, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, Diabetes tipo 2 e osteoporose (BAILEY et al., 2013). Apesar dos benefícios, existem problemas relacionados ao consumo do leite, sendo um dos motivos para a população evitar o consumo de alimentos a base de produtos lácteos.

A lactose, conhecida como açúcar do leite, é um dissacarídeo composto por glicose e galactose. Esse dissacarídeo é hidrolisado pela enzima intestinal β -D-galactosidase ou lactase, liberando componentes monossacarídeos na corrente sanguínea por absorção. A galactose é enzimaticamente convertida em glicose, que é o principal combustível metabólico de muitos tecidos. (MATTHEWS et al., 2005 apud RANGEL et al., 2016). Uma pequena quantidade de lactose não consegue ser hidrolisada, alcançando o cólon intacta, sendo convertida em ácidos graxos e gases pela flora bacteriana (TEVÊS et al., 2001 apud RANGEL et al., 2016).

Um dos principais problemas causados pelo leite é a intolerância à lactose, que é uma desordem metabólica causada pela ausência de lactase e, portanto, tem a característica de não ser capaz de absorver o açúcar presente no leite (RANGEL et al., 2016). Essa desordem acaba gerando um mal estar nas pessoas, fazendo com que as mesmas diminuam a ingestão de produtos lácteos, optando muitas vezes por produtos de origem vegetal.

O leite de arroz é uma bebida de origem 100% vegetal. É rica em carboidratos e não contém glúten e lactose. É uma bebida de baixo valor proteico, não podendo ser considerada como um substituto completo do leite de vaca. Geralmente é enriquecida com cálcio, vitaminas e ferro podendo ultrapassar as quantidades destes micronutrientes do leite de animal. A bebida vegetal contém um baixo teor de gordura, sendo uma de suas principais vantagens.

Entende-se por “leite fermentado”, o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado por fermentos lácticos próprios. Compreende vários tipos: o “quefir”, o “iogurte”, o “leite acidófilo”, o “leitinho” e a “coalhada”, os quais podem ser obtidos de matéria-prima procedente de qualquer espécie leiteira (AQUARONE et al., 2001).

A bebida fermentada é um tipo de leite fermentado que vem se destacando como um substituto para o iogurte, podendo ser produzido a partir de leite vegetal, animal e seus derivados.

O extrato líquido de arroz tem presença de amido, onde são necessárias duas etapas para desenvolver uma bebida fermentada, a sacarificação em açúcar realizada através da hidrólise de enzimas e a fermentação por microrganismos.

As enzimas são biocatalisadores, aumentam a velocidade das reações químicas que ocorrem dentro de células vivas, sem sofrer qualquer alteração geral dos agentes envolvidos (SCIPIONI, 2011).

Para a produção de bebidas fermentadas a partir de matérias-primas amiláceas faz-se necessária a hidrólise do amido, pois este não é fermentado pelos microrganismos. A hidrólise dos biopolímeros constituintes dos grânulos de amido, quebra as ligações glicosídicas progressivamente, gerando cadeias mais curtas de dextrina, maltose e glicose (URBANO, 2012).

O mecanismo mais simples para explicar a ação enzimática é o modelo de Michaelis-Menten:



Neste modelo a enzima (E) liga-se ao substrato (S) para formar um complexo enzima-substrato (ES). Este pode separar-se novamente em enzima e substrato livre ou transformar o substrato em produto (P). Como em qualquer reação elementar (SILVA, 2002).

Enzimas cujo mecanismo obedeça às duas reações anteriores (equação 1), podemos dizer que o valor de K_m está relacionado com a afinidade da enzima para o substrato, e logo é diferente de substrato para substrato e de enzima para enzima (AMADOR, 2008).

O processo fermentativo conta com a presença de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que são os microrganismos mais utilizados na fabricação de leites fermentados. São culturas bioajustadoras de pH empregadas na fabricação de produtos lácteos fermentados, para que estas possam atingir uma acidez segura no período aceitável (FERREIRA, 1999 apud FUCHS et al., 2005).

No início da fermentação, a baixa acidez do meio (<20°Dornic) favorece o desenvolvimento do *S. thermophilus*, estimulado por alguns aminoácidos livres (especialmente a valina), produzidos pelo *L. bulgaricus*, provocando um aumento da acidez. Nessa fase, o *S. thermophilus* libera ácido fórmico, que é estimulante do desenvolvimento do *L. bulgaricus*. Ao se atingir

aproximadamente 46°D, o meio se torna pouco propício ao *S. thermophilus*, favorecendo o rápido desenvolvimento do *L. bulgaricus* com a produção de acetaldeído, principal responsável pelo aroma característico (AQUARONE et al., 2001).

As culturas lácticas são utilizadas para aumentar a vida de prateleira do leite, devido à formação de componentes metabólicos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório nas bactérias Gram-negativas, um dos responsáveis pela deterioração do produto (MARTINS e LUCHESE, 1988; VEDAMUTHU, 1991; VOSNIAKOS et al., 1991 apud RODAS et al., 2001).

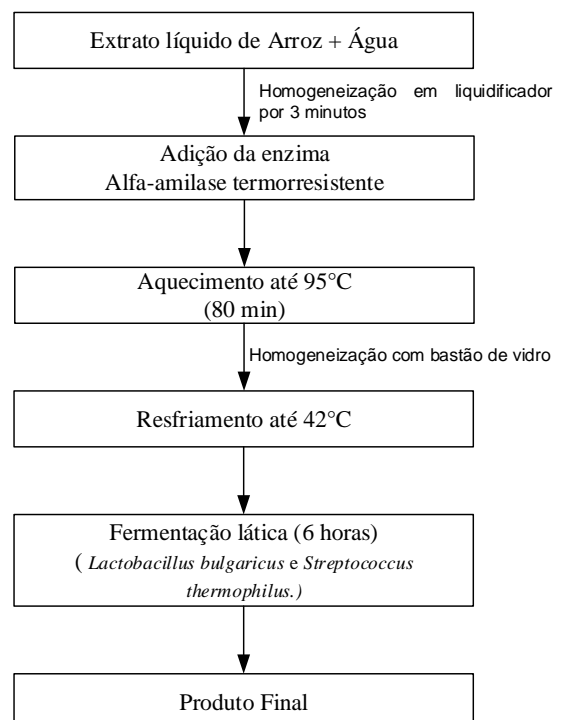
A bebida fermentada de arroz pode se mostrar uma alternativa aos produtos lácteos fermentados tradicionais, por preservar os benefícios atribuídos às bactérias lácticas, porém, com ausência de lactose.

Objetivou-se nesta pesquisa, verificar o comportamento da fermentação láctica em extrato líquido de arroz tratado enzimaticamente com alfa amilase termorresistente para abtenção de uma bebida fermentada.

2 Materiais e Métodos

A bebida fermentada foi desenvolvida no Laboratório de Química da Universidade do Extremo Sul Catarinense- UNESC, e as etapas de obtenção estão apresentadas no fluxograma da figura 1.

Figura 1 - Fluxograma de produção da bebida fermentada.



2.1 Preparo do extrato líquido de arroz

O extrato líquido de arroz utilizado neste trabalho foi obtido artesanalmente. O arroz branco, em uma quantidade de 200g, foi lavado, e em seguida, cozido. Após o cozimento, o arroz foi adicionado com 1 litro de água em um liquidificador doméstico, homogeneizando a mistura por 3 minutos.

2.2 Hidrólise enzimática

O extrato líquido de arroz contendo amido, foi hidrolisado enzimaticamente utilizando enzima alfa amilase termorresistente (Tecnoglobo, AYVD0058). Fez-se a adição de 120 ppm de enzima alfa amilase termorresistente ao extrato líquido de arroz, aquecendo-o na chapa até uma temperatura de 95°C. Após 80 minutos de aquecimento houve a conversão de amido em açúcares, e foi iniciado o processo de fermentação.

2.3 Cinética enzimática

O estudo da cinética enzimática foi realizado variando as concentrações do extrato líquido de arroz (50 g/L, 100g/L, 200 g/L e 300 g/L).

O modelo cinético utilizado foi o de Michaelis-Menten que propuseram uma equação da velocidade que explica o comportamento cinético das enzimas. A representação gráfica da velocidade da reação em função da concentração de substrato é, portanto, uma hipérbole, essa velocidade é expressa na equação 2 (SILVA, 2002).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Onde v = velocidade da reação enzimática, $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima de reação, K_m é a constante de Michaelis-Menten e $[S]$ é a concentração de substrato.

A equação de Michaelis-Menten é muito útil para determinar os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ das reações. Esses valores são calculados a partir da inversão da equação de Michaelis-Menten, conforme a equação 3, que é chamada equação de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco (AMADOR, 2008).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Onde V_o = velocidade inicial da reação enzimática, $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima de reação, K_m é a constante

de Michaelis-Menten e $[S]$ é a concentração de substrato.

Os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos a partir da intersecção da reta no eixo $1/V_o$ que corresponde ao valor $1/V_{m\acute{a}x}$ e a intersecção com o eixo $1/[S]$ corresponde a $-1/K_m$ (AMADOR, 2008).

2.4 Fermentação

Após o resfriamento do extrato líquido de arroz hidrolisado até a temperatura de 42°C, foi adicionado ao substrato 12 mg do cultivo láctico liofilizado, contendo *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (Biolatte, 0574448-5) e o tempo de fermentação foi de 6 horas. Para fins de comparação, leite pasteurizado foi fermentado sob as mesmas condições do extrato líquido de arroz e seus parâmetros determinados.

2.5 Parâmetros analisados

O acompanhamento da hidrólise enzimática, bem como da fermentação láctica, foi realizado verificando parâmetros como pH, temperatura, viscosidade, teor de sólidos solúveis e de ácido láctico, determinados em triplicata, com posterior cálculo de médias e desvios-padrão.

- **Valor do pH**

As determinações dos valores de pH foram realizadas a cada 30 minutos ao longo da fermentação, através de um pHmetro digital (Quimis, Q400AS), previamente calibrado.

- **Acidez titulável em ácido láctico**

Os teores de acidez foram determinados por titulação em solução de NaOH 0,1 M, utilizando a fenolftaleína com indicador, e expressa em % de ácido láctico de acordo com a Equação 4 (IAL, 2008).

$$\frac{V \times f \times 0,9}{P} = \text{Ácido láctico por cento } m/v \quad (4)$$

Onde V = número de mL da solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação; f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M; P = número de mL da amostra e 0,9 é o fator de conversão para ácido láctico.

- **Viscosidade cinemática**

A viscosidade cinemática foi determinada através de copo Ford número 4, com o auxílio de um cronômetro, e expressa em cSt através da equação 5 (ASTM D1200,1994).

$$\nu = 3,836 \times t - 17,3 \quad (5)$$

Onde ν = viscosidade cinemática em centistokes; t = tempo em segundos.

- **Densidade**

A densidade foi obtida através de picnômetro de 25 mL, com o auxílio de uma balança analítica, onde foi determinada através da equação 6 (IAL, 2008).

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (6)$$

Onde ρ é a densidade do produto; m é a massa em g; e V é o volume em mL.

- **Viscosidade dinâmica**

A viscosidade dinâmica foi obtida através da viscosidade cinemática e da densidade, demonstrada na equação 7 (MUNSON et al., 2009).

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (7)$$

Onde μ = viscosidade dinâmica em cP; ρ é a densidade do produto em g/mL.

- **Teor de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis foi determinado durante o processo de hidrólise e fermentação láctica, com uso de refratômetro de ABBE (Quimis, Q109D2), previamente calibrado.

- **Temperatura**

A verificação da temperatura foi realizada durante todo o experimento, por meio de termômetro (Incoterm, 158142/16).

3. Resultados e Discussões

Para a hidrólise enzimática utilizou-se o extrato líquido de arroz com concentração de 200 g/L e

determinou-se o teor de sólidos solúveis a cada 5 minutos até obter-se um valor próximo ao do leite pasteurizado, o que aconteceu após 80 minutos. Os valores adquiridos estão expressos na tabela 1.

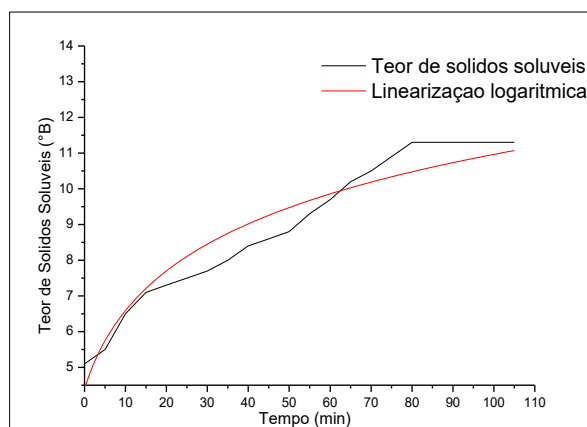
Acompanhou-se a hidrólise durante um período de 80 minutos. Porém, para melhor ajuste da equação, foi demonstrado graficamente até o tempo de 105 minutos.

Tabela 1 - Teor de sólidos solúveis durante a hidrólise.

Tempo (min)	Teor de Sólidos Solúveis (°B) Média ± Desvio Padrão
0	5,1 ± 0,06
5	5,5 ± 0,10
10	6,5 ± 0,12
15	7,1 ± 0,10
20	7,3 ± 0,00
25	7,5 ± 0,00
30	7,7 ± 0,06
35	8,0 ± 0,12
40	8,4 ± 0,06
45	8,6 ± 0,00
50	8,8 ± 0,06
55	9,3 ± 0,10
60	9,7 ± 0,06
65	10,2 ± 0,06
70	10,5 ± 0,06
75	10,9 ± 0,06
80	11,3 ± 0,00

Os resultados apresentados na tabela 1, estão dispostos graficamente na figura 2, onde pode-se visualizar melhor o comportamento da ação da enzima alfa amilase termorresistente no extrato líquido de arroz.

Figura 2 - Comportamento do teor de sólidos solúveis ao longo do tempo.



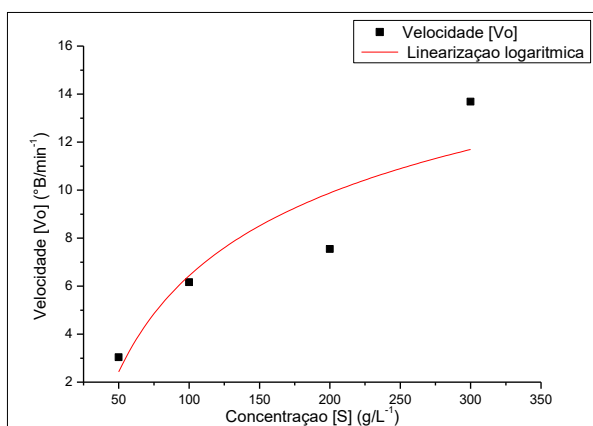
Observa-se que a transformação de amido em açúcares por hidrólise enzimática com a enzima foi crescente. Portanto, a utilização da enzima alfa amilase termorresistente é eficaz em aumentar o teor de açúcares, com consequente aumento de substrato (SILVA, 2009).

Para a análise do estudo cinético da hidrólise enzimática, utilizou-se o extrato líquido de arroz a diferentes concentrações, a fim de se obter os parâmetros necessários.

Para melhor ajuste dos valores dos experimentos utilizou-se a linearização dos pontos de forma logarítmica, que apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,8593$.

A figura 3 expressa a variação da concentração pela velocidade obtida através dos ajustes logarítmicos das curvas.

Figura 3 - Linearização logarítmica da velocidade e concentração.

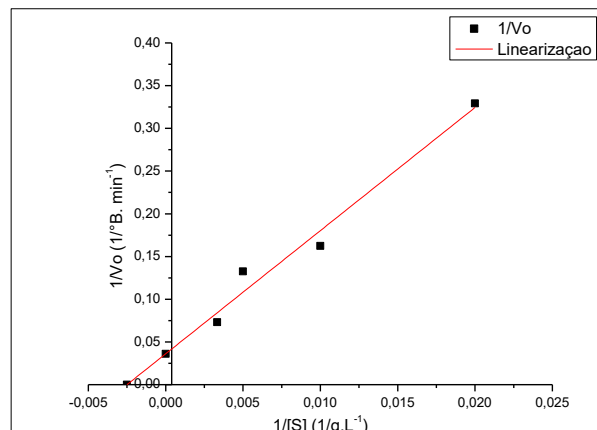


Para determinar os parâmetros cinéticos, utilizou-se a inversão dos dois lados da equação de Michaelis-Menten, chamada de equação de Lineweaver-Burk ou duplo recíproco (ALVES, 2009).

A inversão segundo Lineweaver-Burk, está expressa de forma gráfica na figura 4, e apresentou coeficiente de correlação $R^2 = 0,9847$.

No gráfico gerado por esta equação, expresso na figura 4, $\frac{k_m}{V_{máx}}$ corresponde à inclinação da reta, $\frac{1}{V_{máx}}$, ao intercepto no eixo $\frac{1}{V_o}$ e $\frac{-1}{k_m}$, ao intercepto no eixo $\frac{1}{[S]}$ (BIANCONI, 2006).

Figura 4 - Linearização através da equação de Lineweaver-Burk.



Através da linearização logarítmica obteve-se a equação de ajuste para a obtenção dos parâmetros cinéticos. De acordo com essa equação foram determinados a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a $V_{máx}$, que estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros obtidos através da cinética de Michaelis-Menten.

Parâmetros	Valores	Unidades
$1/V_o$	0,0361	$1/°B. \text{min}^{-1}$
$1/[S]$	-0,0025	$1/g. L^{-1}$
K_m	399,52	$g. L^{-1}$
$V_{máx}$	27,700	$°B. \text{min}^{-1}$

Como observado na tabela 2, a constante de Michaelis-Menten (K_m) foi bastante elevada, isso pode ser explicado pelo fato de que o substrato não teve muita afinidade com a enzima alfa amilase termorresistente, pois a mesma é utilizada para determinação de fibra alimentar e não necessariamente usada para hidrólise do amido.

O K_m é equivalente a concentração do substrato necessária para atingir a metade da velocidade máxima da reação ($V_{máx}$) e indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto maior o valor de K_m menor a afinidade da enzima pelo substrato, isto é, mais substrato é necessário para atingir a metade da velocidade máxima (BRONDANI, 2013).

Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos do extrato líquido de arroz e do leite pasteurizado durante o processo de fermentação são apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Os parâmetros analisados para o extrato líquido de arroz foram comparados aos valores do leite pasteurizado, utilizado como referência no trabalho.

Observa-se que o extrato líquido de arroz apresentou na fermentação um pH inicial de 6,34, onde as condições ótimas para o desenvolvimento específico dos microrganismos envolvidos na produção de bebidas fermentadas, são entre os valores de 6,2 a 6,5 (AQUARONE et al., 2001). Pode-se observar que

durante o processo fermentativo o pH do extrato líquido de arroz obteve um comportamento semelhante ao do leite pasteurizado, que deve-se ao crescimento das duas bactérias, produzindo ácido láctico e compostos aromáticos, onde ocorre o aumento da acidez, com o pH se aproximando de 4,6 (AQUARONE et al., 2001).

Tabela 3 - Parâmetros analisados durante a fermentação do extrato líquido de arroz.

Tempo (h)	pH	Teor de Sólidos Solúveis	Ácido Láctico (%m/v)
	Média ± Desvio Padrão	(°B) Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
0	6,34 ± 0,09	11,3 ± 0,10	0,023 ± 0,00
0,5	6,31 ± 0,05	11,2 ± 0,12	0,027 ± 0,00
1,0	6,31 ± 0,05	11,0 ± 0,06	0,032 ± 0,00
1,5	6,31 ± 0,05	10,8 ± 0,06	0,036 ± 0,00
2,0	6,30 ± 0,05	10,6 ± 0,06	0,041 ± 0,00
2,5	6,27 ± 0,04	10,4 ± 0,06	0,045 ± 0,00
3,0	6,20 ± 0,01	10,3 ± 0,00	0,054 ± 0,00
3,5	6,17 ± 0,02	10,1 ± 0,06	0,059 ± 0,00
4,0	5,97 ± 0,03	10,0 ± 0,06	0,063 ± 0,00
4,5	5,62 ± 0,04	10,0 ± 0,10	0,072 ± 0,00
5,0	5,14 ± 0,04	9,90 ± 0,06	0,081 ± 0,00
5,5	4,90 ± 0,02	9,80 ± 0,00	0,086 ± 0,00
6,0	4,65 ± 0,03	9,70 ± 0,06	0,090 ± 0,00

Tabela 4 - Parâmetros analisados durante a fermentação do leite pasteurizado.

Tempo (h)	pH	Teor de Sólidos Solúveis	Ácido Láctico (%m/v)
	Média ± Desvio Padrão	(°B) Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
0	6,64 ± 0,02	11,5 ± 0,06	0,153 ± 0,00
0,5	6,62 ± 0,02	11,4 ± 0,12	0,158 ± 0,00
1,0	6,66 ± 0,00	11,3 ± 0,12	0,162 ± 0,01
1,5	6,62 ± 0,01	11,3 ± 0,17	0,167 ± 0,00
2,0	6,60 ± 0,02	11,1 ± 0,06	0,171 ± 0,00
2,5	6,45 ± 0,04	11,0 ± 0,10	0,185 ± 0,00
3,0	6,33 ± 0,04	10,8 ± 0,10	0,216 ± 0,01
3,5	6,27 ± 0,03	10,6 ± 0,10	0,243 ± 0,01
4,0	6,18 ± 0,02	10,4 ± 0,06	0,270 ± 0,01
4,5	5,80 ± 0,03	10,2 ± 0,00	0,351 ± 0,01
5,0	5,38 ± 0,03	9,70 ± 0,00	0,450 ± 0,01
5,5	5,05 ± 0,02	9,30 ± 0,06	0,531 ± 0,01
6,0	4,94 ± 0,03	8,60 ± 0,10	0,594 ± 0,01

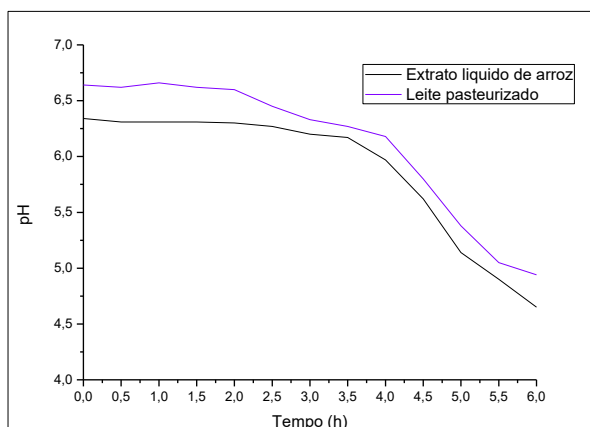
Os resultados apresentados para os valores de pH na tabela 3 e 4, são expressos de forma gráfica na figura 5, onde apresenta o seu comportamento ao longo do tempo de fermentação. Observa-se que os dados obtidos foram bastantes expressivos quando comparados ao leite pasteurizado, comprovando o decaimento do pH conforme consta na literatura.

Ao desenvolver bebidas fermentadas com o mesmo tipo de cultura mista comercial, como a utilizada neste trabalho, com um tempo de fermentação de 6 horas, encontra-se valores de pH entre 4,5 e 5,0 (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001), muito próximo aos resultados obtidos neste estudo.

O valor do pH tem sua importância relacionada também com o aspecto visual do produto final durante sua

conservação em temperaturas baixas. É fundamental que haja um controle rigoroso para que não ocorram possíveis separações de fases, acidificação elevada, influenciada pelo tempo de fermentação, além de alterações nas características sensoriais que poderão tornar o produto indesejável (GIANETTI THAMER et al., 2006).

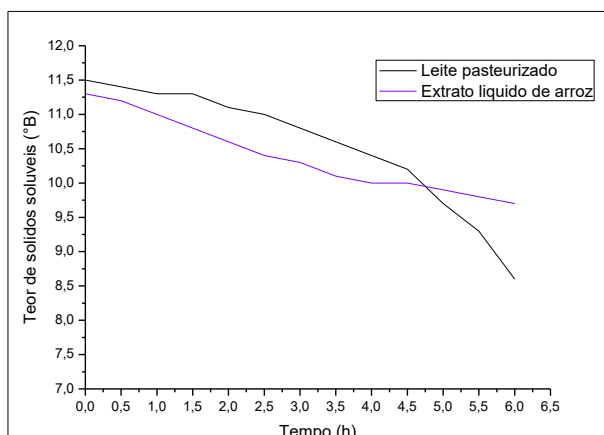
Figura 5 - Comportamento do pH ao longo da fermentação.



Os valores obtidos para o teor de sólidos solúveis do extrato líquido de arroz e leite pasteurizado estão expressos nas tabelas 3 e 4, e ilustrados na figura 6.

A análise do teor de sólidos solúveis totais através de um refratômetro na escala °Brix se constitui um método aceito pela comunidade acadêmica, pois a leitura deve ser semelhante com a concentração real de açúcar existente nas soluções analisadas (MORAIS, 2006 apud LEITE et al., 2006). O teor médio de sólidos solúveis obtidos nos produtos analisados variou de 11,3 a 9,70 °B para o extrato líquido de arroz e de 11,5 a 8,60 °B para o leite pasteurizado.

Figura 6 - Comportamento do teor de sólidos solúveis ao longo da fermentação.

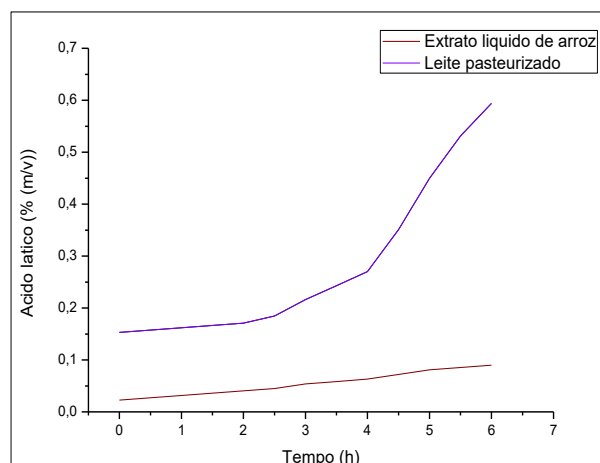


É possível perceber que há uma diminuição da concentração de sólidos solúveis, indicando o consumo de substrato para o desenvolvimento da cultura láctica (MALDONADO, 2014). Tal fato também foi observado neste estudo.

O comportamento do teor de sólidos solúveis para o extrato líquido de arroz, demonstrou-se decrescente nas primeiras horas de fermentação, após 4 horas de fermentação a taxa de consumo de substrato obteve pouca variação. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que ao mesmo tempo que ocorre o consumo do substrato pelas bactérias lácticas, ocorre a hidrólise enzimática do amido, ainda presente no extrato de arroz, devido a reativação da enzima alfa amilase termorresistente na temperatura de fermentação.

Os resultados apresentados para os valores de ácido láctico obtidos durante os experimentos são apresentados nas tabelas 3 e 4, e ilustrados na figura 7.

Figura 7 - Produção de ácido láctico durante fermentação.



Observa-se através da figura 7, que o comportamento da produção de ácido láctico do extrato líquido de arroz diferenciou-se do leite pasteurizado. Esse resultado pode ser justificado pelo fato do extrato líquido de arroz conter baixa formação de glicose e alta formação de maltose, pois a ação da alfa amilase termorresistente sobre o amido acontece em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose enquanto a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose. Essas bactérias lácticas, degradam monossacarídeos, nesse caso a glicose, oriundos da reação de sacarificação do amido, produzindo ácido láctico, elas não possuem a capacidade de quebrar a molécula de maltose presentes no extrato, pois para isso seria necessária outra hidrólise enzimática no processo (AQUARONE et al., 2001).

Outro fator pelo qual esse resultado pode ser justificado consiste no fato do extrato líquido de arroz ter deficiência em cálcio na sua composição. O cálcio

presente no leite pasteurizado controla o pH por neutralização contínua, permitindo uma completa fermentação e elevada produção de ácido láctico no meio fermentativo (AQUARONE et al., 2001).

Os resultados obtidos através da determinação da viscosidade cinemática, densidade e viscosidade

dinâmica, antes e depois da fermentação para o extrato líquido de arroz e leite pasteurizado, são apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Densidade e viscosidades do extrato líquido de arroz.

Período da fermentação	Densidade (g/mL)	Viscosidade cinemática	Viscosidade dinâmica
	Média ± Desvio	(cS) Média ± Desvio	(cP) Média ± Desvio
Inicial	1,09 ± 0,00	44,1 ± 2,21	40,4 ± 2,03
Final	1,10 ± 3,63.10 ⁻⁵	63,3 ± 2,21	57,5 ± 2,01

Tabela 6 - Densidade e viscosidades do leite pasteurizado.

Período da fermentação	Densidade (g/mL)	Viscosidade cinemática	Viscosidade dinâmica
	Média ± Desvio	(cS) Média ± Desvio	(cP) Média ± Desvio
Inicial	1,09 ± 0,00	17,2 ± 0,00	15,8 ± 0,01
Final	1,09 ± 3,33.10 ⁻⁵	117 ± 3,84	107 ± 3,51

O extrato líquido de arroz apresentou uma viscosidade maior no início da fermentação em relação ao leite pasteurizado, que pode ter ocorrido devido a presença do amido. Entretanto, apresentou uma viscosidade baixa ao final da fermentação, quando comparado ao leite pasteurizado, pois este contém proteína, que com o aumento da acidez, e o pH se aproximando de 4,6, formam-se coágulos, deixando o produto de fermentação mais viscoso (AQUARONE et al., 2001).

4. Conclusão

Os resultados obtidos nos experimentos de hidrólise enzimática apresentaram os parâmetros de teor de sólidos solúveis crescente conforme consta na literatura. O modelo cinético de ordem logarítmica, ajustou melhor os dados experimentais cinéticos, apresentando coeficientes de correlação linear próximos a 1. O estudo cinético também permitiu verificar os valores da constante de Michaelis-Menten (Km) e a velocidade máxima de reação. Para Km o valor foi de 399,52 g.L⁻¹, bastante elevado, retratando uma baixa afinidade entre o substrato e a enzima alfa amilase termorresistente. No processo de fermentação os experimentos apresentaram parâmetros de pH e teor de sólidos solúveis de acordo com a amostra padrão. Houve produção de ácido láctico, porém em pequenas quantidades quando comparadas ao experimento padrão, devido a produção de maltose em

maior quantidade que a glicose. O estudo mostrou-se de grande importância para o conhecimento do comportamento da fermentação láctica em extrato líquido de arroz tratado enzimaticamente, com vistas à possível produção de uma bebida fermentada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à UNESC, pela infraestrutura e apoio financeiro para realização dos experimentos, em especial, ao Laboratório Físico-Químico de Alimentos, e à empresa Biolatte pelo fornecimento das enzimas e fermento láctico.

Referências

- AMADOR, M. et al. Cinética e regulação enzimática. Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2008.
- ALMEIDA, K. E., BONASSI, I. A., ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 187-192, 2001.
- ALVES, Lucia Maria Carareto. **Cinética Enzimática**: São Paulo: 2009. 31 slides, color. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/Home/>

departamentos/tecnologia/luciamariacararetoalves/aula-7---cinetica enzimatica.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2017.

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos. **Blücher**, São Paulo, v.3, 2001.

AQUARONE, E. et al. Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos. **Blücher**, São Paulo, v.4, 2001.

ASTM D1200 Standard Test Method for Viscosity by Ford Viscosity Cup - 1994.

BAILEY, R. K. et al. Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: an updated consensus statement. **Journal of the National Medical Association**, v. 105, n. 2, p. 112–27, 2013.

BIANCONI, M. L. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática. **Instituto de bioquímica médica**, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/concn_subst.htm>. Acesso em: 18 de jun. 2017.

BRONDANI, A. et al. Mundo molecular: O que é constante de Michaelis-Menten e qual a relação do seu valor e a afinidade da enzima pelo seu substrato. 2013. Disponível em: <<http://www.qued.com.br/site/index.php/duvidas/O-que-e-constante-de-Michaelis-Menten-e-qual-a-relacao-do-seu-val>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

FERREIRA, C. L. L. F. Acidez em leites e produtos lácteos: aspectos fundamentais. Viçosa: UFV, p.26, 1999.

FUCHS, R. H. B. et al. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 175–181, 2005.

GIANETTI THAMER, K.; LÚCIA, A.; PENNA, B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por Probióticos e acrescidas de Prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589–595, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed. 1ª Edição digital. São Paulo, 2008. 1020 p. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000057/000057FD.pdf>>. Acesso em: 02 mai. 2017.

LEITE, C.A. et al. Determinação dos Sólidos Solúveis Totais (°Brix) e pH em Bebidas Lácteas e Sucos de

Frutas Industrializados. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, Paraíba, p. 57–64, 2006.

MALDONADO, R.R. et al. Fermentação láctica de frutas tropicais. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Campinas, 2014.

MARTINS, J.F.P.; LUCHESE, R.H. Determinação da compatibilidade de crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 43, n. 256, p. 11-13, 1988.

MATSUBARA, S. Alimentos Funcionais: uma tendência que abre perspectivas aos laticínios. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 10–18, 2001.

MATTHEWS, S. B., et. al. Intolerância à lactose sistêmico: uma nova perspectiva sobre um velho problema. **Revista médica de pós-graduação**, p. 167–173, 2005.

MORAES, R. R. Refratometria. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

MUNSON, B. R. et al. **Fundamentals of Fluid Mechanics**, 6 edição, Wiley, 2009.

RANGEL, A. H. N. et al. Lactose intolerance and cow's milk protein allergy. **Food Science and Technology**, Campinas, 2016.

RODAS, M. A. D. B. et al. Caracterização Físico-Química, Histológica E Viabilidade De Bactérias Lácticas Em Iogurtes Com Frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 304–309, 2001.

SCIPIONI, G. C. Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas. Rio Grande do Sul, p. 95, 2011.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397–409, 2004.

SILVA, M. B. L. et al. Qualidade físico-química e sensorial de aguardentes de polpa de banana e banana integral submetidas à hidrólise enzimática. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.2, p.217-221, 2009.

SILVA, P. Catálise enzimática. Universidade Fernando Pessoa, Portugal, 2002. Disponível em: < <http://homepage.ufp.pt/pedros/bq/Enzimas.htm>>. Acesso em : 15 jun. 2017.

TEVÊS, M. P., et al. Análise de la prueba de tolerancia a la lactosa. **Revista de Gastroenterologia del Peru**, p. 282-286, 2001.

URBANO, L. H. Fermentação etanólica em mostos de hidrolisados de amido de mandioca. Tese de mestrado em agronomia - Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, São Paulo, 2012.

VEDAMUTHU, E.R. The yogurt story – past, present and future. Part. VI. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 11, n. 9, p. 513-514, 1991.

VOSNIAKOS, F. et al. Effect of ¹³¹I on lactic acid microflora of yoghurt. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 8, n 11, p. 433-435, 1991.