"CONTROLE DE QUALIDADE DE IOGURTE COMERCIAL E ESTUDO DO
PODER ACIDIFICANTE DE SUAS CULTURAS LÁTICAS."

"ROSELI DO CARMO FREITAS DA SILVA"

Química

Orientador: João Gustavo Brasil Caruso

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção de
título de Mestre em Agronomia.
Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1991

Ao Mario Luiz, Maria Carolina, Paulo Henrique, Mônica e a meus pais: Laurindo e Leonirce com muito amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A Deus
- Ao Prof. Dr. João Gustavo Brasil Caruso, pela orientação , amizade, confiança e apoio demonstrados durante a execução deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira pelas sugestões e incentivos ã este trabalho.
- A Cleomar, Roque e Vera pela amizade e boa convivência no laboratório.
- A Célia Regina pela grande amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela bolsa concedida.
- Ao Mario Luiz pelo grande incentivo e amor demonstrado.
- A todos que direta ou indiretamente, contribuíram, na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS DAS TABELAS	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Composição e acidez	5
2. Culturas lácticas do iogurte	10
3. Relação cocos:bastonetes	17
4. Meios de cultura para enumeração dos <i>L. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i>	20
5. Contaminantes	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
Parte I: Análises do iogurte comercial.....	34
1. Coleta das amostras	34
2. Preparo das amostras	34
3. Acidez titulável	35
4. pH	35
5. Peso líquido	35
6. Contagem de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	36
7. Contagem de coliformes totais	36
8. Contagem de fungos e leveduras	37
9. Isolamento e purificação dos microrganismos lácticos	37

10. Identificação dos microrganismos	38
10.1. Identificação de <i>L. bulgaricus</i>	38
10.2. Identificação de <i>S. thermophilus</i>	38
Parte II: Crescimento populacional e produção de <u>áci</u>	
do pelos microrganismos isolados	39
1. Definição de temperatura	39
2. Produção de ácidos pelos pares estreptococo lacto	
bacilo.....	40
3. Acidificação e pós-acidificação	40
4. Crescimento do <i>L. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i>	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
1. Peso líquido, acidez titulável e pH dos iogurtes	
adquiridos no comércio	42
2. Contagens de <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , coliformes	
fungos e leveduras para os iogurtes adquiridos no	
comércio	45
3. Identificação dos <i>L. bulgaricus</i>	48
4. Identificação dos <i>S. thermophilus</i>	49
5. Produção de ácido pelos <i>L. bulgaricus</i> e <i>S. thermophi-</i>	
<i>lus</i> isolados	49
6. Produção de acidez pelos pares estreptococos-lac-	
tobacilos	51
7. Desenvolvimento da acidez durante o período de	
incubação (acidificação) e de armazenamento	
(pós-acidificação), para os três pares de cultu-	
ras selecionadas	53
8. Números de lactobacilos e estreptococos nos iogur	
tes durante o período de incubação e o período	

de armazenamento	57
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

TABELA

1	Valores médios obtidos para peso líquido, acidez titulável e pH, nos iogurtes adquiridos no comércio.....	43
2	Valores médios obtidos para as contagens de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , coliformes, fungos e leveduras para os iogurtes adquiridos no comércio	49
3	Identificação do <i>L. bulgaricus</i>	49
4	Identificação do <i>S. thermophilus</i>	49
5	Desenvolvimento da acidez titulável (% ac. láctico) a 37°C e 42°C pelas culturas isoladas...	50
6	Desenvolvimento da acidez titulável e pH pelas culturas mistas, a 42°C	52
7	Desenvolvimento da acidez titulável e pH durante o período de incubação a 42°C	53
8	Desenvolvimento da acidez titulável e pH durante o período de armazenamento a 7°C	55
9	Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LCSD durante o período de incubação e o período de armazenamento.....	58
10	Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LCSA durante o período de incubação e o período de armazenamento	59
11	Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LASD durante o período de incubação e o período de armazenamento	60

"CONTROLE DE QUALIDADE DE IOGURTE E ESTUDO DO PODER ACIDIFICANTE DE SUAS CULTURAS LÁTICAS."

Autora: Roseli do Carmo Freitas da Silva

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Brasil Caruso

RESUMO

Amostras de quatro marcas diferentes de iogurte disponíveis no comércio de Piracicaba, SP, foram coletadas durante cinco meses para análises de verificação do peso líquido, acidez titulável, pH, número de coliformes, fungos e leveduras, bem como, isolamento, purificação, identificação e estudo do poder acidificante das bactérias lácticas presentes.

Os resultados obtidos demonstraram variação no peso líquido dos iogurtes comerciais, com 75% das amostras abaixo do peso declarado na embalagem. Os valores de acidez titulável variaram entre 1,10 e 1,54% de ácido láctico e o pH entre 3,87 e 4,42.

As análises microbiológicas revelaram que, para uma das marcas, durante os três primeiros meses não foram detectadas bactérias lácticas viáveis, enquanto todas as demais amostras apresentaram números desses microrganismos dentro dos limites relatados na literatura. As contagens de coliformes revelaram que 50% das amostras analisadas apresenta

ram valores acima de 10 u.f.c./ml do produto; para fungos e leveduras, 30% das amostras apresentaram mais que 10 u.f.c./ml do produto.

As bactérias lácticas de cada amostra foram isoladas, purificadas e identificadas, confirmando tratar-se de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em todos os iogurtes amostra dos. As culturas puras isoladas foram testadas quanto ao seu poder acidificante isoladamente e em culturas mistas resultantes dos pareamentos dos lactobacilos com os estreptococos.

As três culturas mistas que apresentaram o melhor poder acidificante foram testadas quanto ao desenvolvimento da acidez durante um período de 4 horas de incubação a 42°C e, a seguir, durante um período de 31 dias de armazenamento a 7°C, utilizando-se leite desnatado, reconstituído com 12% SNG e esterilizado.

**YOGHURT QUALITY CONTROL AND STUDY OF THE ACIDIFYING POWER OF ITS
LACTIC CULTURES.**

Author: Roseli do Carmo Freitas da Silva

Adviser: Prof. Dr. João Gustavo Brasil Caruso

SUMMARY

Samples of four different brands of commercial yoghurt available in Piracicaba, SP, were collected in five months for verification analysis of the net weight, titrable acidity, pH, coliform, mold and yeast numbers, and for isolation, purification, identification of the lactic bacteria presented as well.

The results obtained showed a variation in the commercial yoghurt net weight, with 75% of the samples below the weight declared in the wrappings. The titrable acidity values varied between 1,10 and 1,54% of lactic acid and the pH between 3,87 and 4,42.

The microbiological analysis revealed that, for one of the brands, during the first three months viable lactic bacteria were not detected, while the other samples showed these microorganism numbers within the limits related in the literature. The coliform enumeration revealed that 50% of the analysis samples, showed values over 10 cfc/ml of the product, as to molds and yeasts, 30% of the samples showed more than 10 cfc/ml of the product.

The lactic bacteria of each sample were isolated, purified and identified, confirming to be *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* in all the yoghurts examined. The isolated pure cultures were tested as to its acidifying power isolatedly and in mixed cultures resulting from the pairs of *Lactobacilli* with *Streptococci*.

The three mixed cultures, which showed the best acidifying power, were tested as to the acidity development during a period of four hours of incubation at 42°C and then, during a period of 31 days of storage at 7°C using reconstituted with 12% SNG and sterilized skimmed milk.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vem merecendo lugar de destaque nos meios científicos. Essa preocupação se deve ao grande número de produtos alimentícios existentes e a uma tendência atual de se ingerir produtos naturais.

Experiências feitas em quase todo o mundo, destacando-se a Europa, constatarem que produtos lácteos, acidificados artificialmente através de culturas especiais, são de um valor incalculável para o nosso organismo, pois os microrganismos acidificantes tem a propriedade de desobstruir o intestino, eliminando os resíduos aderentes ao mesmo, facilitando a função intestinal e automaticamente combatendo a fermentação anormal de nosso organismo, geralmente originária do excesso de alimentação.

O iogurte com seus 0,5 a 5 milhões de microrganismo por grama, é um excelente produto vivo (KURMAN,

1977). O iogurte é resultante da fermentação do açúcar do leite, a lactose, por bactérias lácticas, tradicionalmente *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

A elaboração do iogurte é uma técnica que se expande cada vez mais no mundo inteiro, e, de um preparo originalmente simples, vem se transformando em um processo bastante sofisticado. Entretanto, com a rápida incorporação deste produto aos hábitos alimentares, a competição industrial desencadeou a busca de novos processos que possibilitassem a redução dos custos de fabricação, sem prejuízo da qualidade do produto.

A pesquisa objetivando aumentar o período de conservação ultrapassando o prazo normal de 2 a 4 semanas, vai de encontro à imagem do produto fresco e do desejo dos consumidores.

A manufatura do iogurte requer cuidados do começo ao fim. Os fatores importantes para que o produto final seja de qualidade satisfatória, são: frescor do leite, equilíbrio entre as culturas, temperatura de incubação, rapidez no empacotamento e resfriamento. Em adição, o processo de fermentação deve ser monitorado cuidadosamente para que a acidez não atinja um grau inaceitável para o consumidor, WELKER (1986).

A relação de simbiose entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a acidificação do leite por culturas mistas, comumente referidas como bastonetes e cocos, foi

extensivamente estudada (BAUTISTA et alli, 1966 ; DRIESSEN et alli, 1982a; LABRAPOULOS et alli, 1982; PETTE e LOLKEMA, 1950a; SANKAR e DAVIES, 1977b), mas poucos estudos sobre a viabilidade e poder acidificante das culturas durante a estocagem do iogurte foram feitos (SANDINE e MATALON, 1986).

Para se obter um iogurte de boa qualidade as indústrias de laticínios que se dedicam a fabricação de iogurte, necessitam frequentemente renovar suas culturas , ou mesmo recombina-las. A combinação de diferentes linhagens de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* permite conseguir ioгурte com maior ou menor produção de acidez, aroma e retenção de soro.

O processo de fabricação de iogurte, atualmente utilizado consiste no emprego de culturas microbiologicamente puras, selecionadas visando promover a fermentação desejada com um resultado tecnológico muito superior no que se refere à padronização da qualidade do produto resultante. Nesse processo a flora láctica natural normalmente é eliminada pela pasteurização e a fermentação passa a depender exclusivamente da cultura láctica adicionada como inóculo.

Até o presente momento, a indústria de laticínios nacional tem dependido quase que exclusivamente de culturas lácticas importadas, originárias de laboratórios internacionais especializados no isolamento, seleção e comercialização de culturas específicas para cada tipo de

produto desejado. E esses laboratórios são localizados em países de condições ecológicas e tecnológicas bem diferentes do nosso. Portanto, é fácil de se deduzir as dificuldades de adaptação dessas culturas altamente especializadas frente às diferentes condições, não só climáticas mas principalmente higiênicas, onde as mesmas são expostas a mercê de contaminante altamente ativos e naturalmente adaptados as condições adversas.

Com o desenvolvimento de uma tecnologia de isolamento, identificação e estudo do poder acidificante de culturas lácticas, poder-se-á eliminar o ônus que as culturas importadas representam, além de tentar minimizar a pós-acidificação que ocorre em iogurtes comerciais.

Em vista disso, objetivou-se no presente trabalho, o estudo de algumas características químicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas de iogurtes de diferentes marcas comerciais disponíveis no comércio, além do isolamento e caracterização das culturas lácticas desses iogurtes comerciais e o posterior estudo do crescimento e produção de ácido por essas culturas puras e combinadas entre si, para escolha dos melhores pares e então estudar o poder pós-acidificante durante a armazenagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição e acidez

O iogurte dentro da sua zona de origem, península balcânica, era preparado com leite de cabra e com a ajuda de culturas naturais. Pesquisas desde o início do século nos indicam que em fermentos lácticos tais culturas são representadas por *Lactobacillus yugurti* e *Lactobacillus bulgaricus*. A cultura natural foi igualmente substituída por uma associação de bacilos e estreptococos termofílicos e, nos últimos tempos, numerosas pesquisas foram reservadas à explicação das funções de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* na produção e na qualidade do iogurte atual.

Segundo HAMANN e MARTH (1984b), a composição do iogurte é aproximadamente a mesma do leite da qual ele é feito.

Estudos realizados por DUITSCHAEVER et alli (1972) demonstraram grande variação na composição química de iogurtes comerciais. Os autores avaliaram 152 iogurtes de

Ontário, Canadá, e verificaram que geralmente não existe iogurte de composição uniforme. O peso líquido chega a variar até 7,2%. Os valores do pH variam de 3,27 a 4,53 com um valor médio de 3,91.

KROGER e WEAVER (1973), analisaram iogurtes comerciais da região central da Pensilvânia (41 de frutas e 3 naturais). A grande variação da composição química tam bém é problema. O peso líquido tem uma variação em torno de 6,87%. Os estudos também demonstram grandes variações no pH, proteína, sólidos totais, gordura e calorias.

Estudos realizados por RICHMOND et alli (1979) em iogurtes do mercado de Michigan, mostraram para iogurte com frutas, 4,34% de proteína, 2,34% de gordura, 25,88% de sólidos totais e pH 4,01. Para iogurte natural os valores foram 5,68% proteínas, 2,86% de gordura, 16,90% de sólidos totais e pH 4,23. Os dados mostram que apenas 10,6% das amostras tinham o peso líquido abaixo do declarado.

FERREIRA e CHAVES (1981) analisaram iogurte produzido na Zona da Mata, Minas Gerais, quanto aos teores de gordura, sólidos totais, proteína, pH, acidez titulável, valor calórico e peso líquido. Os resultados das análises químicas são comparáveis aos encontrados na literatura, com exceção dos valores relativos a acidez, que estão acima. Segundo esses autores certo grau de acidez é desejável no iogurte, porem super-acidificação do produto é indesejável, visto que conduz a separação de soro e de

terioração da sua consistência e viscosidade.

HUMPHREYS e PLUNKETT (1969) recomendam um pH final em torno de 3,7 - 3,8 e acidez titulável final em torno de 1,0 - 1,25%.

Uma acidez mínima de 0,7% de ácido lático no iogurte é necessária para a sua venda, segundo SELLARS e BABEL (1970). No caso dos sólidos contidos no leite influenciarem na acidez titulável, esses autores recomendam utilização do pH como critério de acidez e um pH 4,0, parece ser o mais aceitável para o consumo.

GINSLOV (1970) sugere uma acidez de 1,2% de ácido lático.

O pH do iogurte comercial geralmente varia em torno de 3,7 a 4,3, segundo DAVIS e McLACHLAN (1974).

De acordo com LÜCK e MOSTERT (1971), iogurte com pH 3,9 - 4,1 tem um péssimo paladar devido à alta acidez.

A acidez do iogurte é devido parte a acidez natural do leite e parte a acidez desenvolvida pela flora bacteriana. É importante que a acidez desenvolvida durante a produção seja cuidadosamente controlada, para que um excesso de acidez não se desenvolva durante a estocagem refrigerada. Estudo desenvolvido por ROBINSON e TAMINE (1976), comparam métodos para determinação de acidez titulável em iogurte. De acordo com esses autores, na "coalhada bulgãra" a acidez varia em torno de 0,9 a 1,48% de ácido láti-

co e no iogurte a acidez é de 0,72 a 1,17% de ácido lático.

Estudos realizados por TERRA et alli (1977) , mostraram que 58,97% das amostras analisadas apresentaram valores de pH superiores a 4,3.

ACCOLAS et alli (1977) realizaram interessantes estudos sobre a variação na produção de ácido no leite por culturas lácticas, sob diversas condições. Os estudos de mostraram que a armazenagem do iogurte a 8°C, como é comercialmente praticada na França, é insatisfatória para a conservação do produto, devido a capacidade das culturas de continuar a acidificação a baixas temperaturas. Muitas bactérias do ácido lático tem a capacidade de continuar a acidificação depois que a fase estacionária de crescimento é alcançada. Possíveis soluções propostas para conter esse efeito foram o resfriamento rápido a temperaturas por volta de 0°C ou o uso de culturas mistas que tenham um baixo poder acidificante a temperaturas de refrigeração.

SALJI e ISMAIL (1983), estudaram a relação entre a acidez inicial do iogurte natural e as mudanças dessa acidez durante o armazenamento refrigerado. O armazenamento foi de 3 semanas a 4°C e 7°C, mudanças na acidez são mais pronunciadas a 7°C quando comparadas a 4°C. Segundo os autores as maiores mudanças na acidez ocorreram na primeira semana de armazenamento.

Estudos realizados por SALINAS (1984a), na microflora de iogurte comercial durante a armazenagem a 7°C

por 12, 20, 30 e 40 dias, mostraram que o tempo máximo de armazenagem para o iogurte comercial é de 3 semanas.

Segundo TAMINE et alli (1987), o pH do iogurte pode ser relacionado com o tipo de leite utilizado.

MARTINS e LUCHESE (1988a) estudaram o comportamento acidificante em temperatura de processamento e em condições de armazenamento, de 30 associações de cepas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, isolados de quatro marcas comerciais de iogurte, visando estabelecer critérios de seleção.

De acordo com JORDANO et alli (1988) as mudanças de pH e acidez titulável são mais marcantes durante os onze primeiros dias, que entre onze e vinte e um dias de armazenamento.

Amostras de iogurte natural foram testadas 48 horas após serem produzidos e depois 15, 24 e 30 dias armazenadas a 5 - 7°C e 11 - 13°C. O pH decresce durante a armazenagem a 5 - 7°C e atinge um mínimo depois de 24 dias; enquanto que para as amostras armazenadas a 11 - 13°C, o pH decresce rapidamente de acordo com DIAZ et alli (1989).

SINHA et alli (1989) enumeraram os fatores que poderiam ser responsáveis pelo excesso de acidez desenvolvido durante a armazenagem de 6 marcas de iogurte comercial mantidos por 4 semanas a 4,7 e 10°C. Foram analisadas mudanças de acidez (pH), contagem de *L. bulgaricus* e

S. thermophilus, coliformes, fungos e leveduras. O pH varia de 4,14 para 3,6 a 4°C; 4,11 para 3,72 a 7°C; 4,08 para 3,68 a 10°C indicando a possibilidade do pH do iogurte ser menor que 4,0. A relação *L. bulgaricus* : *S. thermophilus* varia de 1:1 a 1:8. Coliformes, fungos e leveduras não são detectados durante o tempo de armazenagem. Segundo os autores a acidificação no processamento não deve ser muito intensa quando se trata de produção em larga escala, já que na prática a capacidade de resfriamento de uma usina pode ser limitada, o que não permitiria uma rápida redução na temperatura de todo o produto. A capacidade de acidificação dos microrganismos deve permitir, porém, que o processamento se faça dentro de um tempo razoável. A superacidificação desenvolvida durante a armazenagem resulta em um sabor ácido forte, e isto é considerado um defeito. Os autores sugerem um pH final de 4.4 para o iogurte comercial.

.2. Culturas lácticas do iogurte

O iogurte é resultado da alteração processada no leite através da fermentação da lactose por microrganismos selecionados podendo ser tradicionalmente o *L. bulgaricus* e o *S. thermophilus*, e a estes microrganismos podem ser adicionados outros que com eles cresçam simbioticamente alterando ou conferindo características espera-

das no produto. Durante a fermentação, a lactose se transforma em ácido lático, o pH do leite se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas que então se precipitam, formando assim a massa característica do iogurte. (BOTTAZZI et alli, 1977; FERREIRA, 1978).

O iogurte é fabricado principalmente de leite de vaca empregando cultura mista de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* que se desenvolvem em simbiose. Os microrganismos são responsáveis pela fermentação láctica e formação do aroma típico do produto. O pH e temperatura ótimos para o crescimento do *S. thermophilus* são respectivamente 6,8 e 38°C, ao passo que para o *L. bulgaricus* são 6,0 e 43°C. A simbiose entre as bactérias está relacionada com o quantidade inoculada, temperatura de incubação e tempo de incubação de acordo com SILVA (1974).

Na literatura, o crescimento associativo das duas bactérias do iogurte é chamado simbiose, mas de acordo com GALESLOOT et alli (1968), só existem trabalhos demonstrando a estimulação do *S. thermophilus* pelo *L. bulgaricus* e não a estimulação do *L. bulgaricus* pelo *S. thermophilus*.

Os autores demonstraram que *S. thermophilus* também estimula o *L. bulgaricus* pela produção de um fator que é equivalente ou pode ser substituído pelo ácido fórmico.

A existência de interação entre as duas bactérias do iogurte, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, favo-

ráveis ao desenvolvimento da associação bacteriana, à acidi ficação e à formação do aroma, além da formação de coagulo, foi demonstrada por ACCOLAS et alli (1971), BAUTISTA et alli (1966), GALESLOOT et alli (1968), HAMDAM et alli (1971) MEILKEJOHN (1977), MOON e REINBOLD (1976) e VERINGA et alli (1968).

O *L. bulgaricus*, atuando sobre as proteínas do leite, libera aminoácidos que estimulam o desenvolvimento de *S. thermophilus* (LEE et alli, 1974; PETTE e LOLKEMA, 1950c) , que por sua vez produz ácido fórmico (SURIYARACHCHI e FLEET, 1981; VERINGA et alli, 1968) e dióxido de carbono (DRIESSEN et alli, 1982a) necessário ao desenvolvimento do *L. bulgaricus*. A reciprocidade desta simbiose parece estar ligados à proporção das duas espécies, durante a fermentação, alcançando na primeira etapa a proporção de 3:1 de *Streptococcus* para *Lactobacillus*, começando o último a predominar nas fases seguintes (SURIYARACHCHI e FLEET, 1981).

Segundo DAVIS (1975), o *S. thermophilus* elimi na o oxigênio e produz condições favoráveis de acidez para o *L. bulgaricus*. Em geral os estreptococos do leite crescem melhor a pH 6,5, com o crescimento parando quando o pH atinge 4,2 - 4,4 e os lactobacilos crescem melhor a pH 5,5 com o crescimento parando em pH 3,5 - 3,8. Segundo o autor a questão do padrão microbiológico é muito difícil, mas como muitos consumidores esperam que o iogurte seja uma cultura viva, um padrão razoável seria não menos que 10^7 de

L. bulgaricus e *S. thermophilus* colônias/grama. Sem se levar em conta a diferença na composição química, o iogurte natural e o iogurte com frutas são basicamente os mesmos, do ponto de vista microbiológico.

As culturas de iogurte podem ser selecionadas pela sua habilidade de crescer em associação e de produzir o sabor balanceado desejado. Esse sabor é geralmente adquirido tanto pelo controle de crescimento, como pela razão entre os dois microrganismos que deve ser mantida na ordem de 1:2 - 2:1. Um procedimento simples é controlar o crescimento pela temperatura e o tempo de incubação; temperaturas mais altas e tempo de incubação longo favorecem o *Lactobacillus*.

O trabalho realizado por ACCOLAS et alli (1977) sobre culturas individuais de *Streptococcus* e *Lactobacillus* mostram que a atividade acidificante máxima ocorre a uma temperatura de 42 - 45°C, para o *Streptococcus* e ao redor de 44 - 46°C para o *Lactobacillus*. A cultura mista composta por *Streptococcus* e *Lactobacillus* apresenta atividade acidificante máxima no intervalo de temperatura correspondente a 35 - 43°C. A acidificação ocorre exponencialmente durante o crescimento da cultura mista e prossegue ainda ativamente quando cada um dos organismos atinge a população máxima. Segundo os autores a concentração da cultura a ser utilizada será função: do seu poder acidificante; do tempo de incubação desejado; da riqueza em células bacterianas; da fase de crescimen-

to na qual se encontra a cultura; da relação *Lactobacillus* : *Streptococcus*; do teor de sólidos, uma vez que, quando este valor é muito elevado, a acidificação se faz mais rapidamente e a porcentagem de inoculação deve ser mínima, com o objetivo de impedir uma acidificação muito intensa, e normalmente se trabalha com 3% ou menos.

De acordo com os autores, os fabricantes buscam, de preferência, culturas mistas ativas de modo que possam obter uma acidificação mais rápida possível (90°D a 100°D em 3 à 4 horas) à uma temperatura elevada próxima de 45°C .

De acordo com KURMANN (1977), para a incubação é necessário procurar um tempo mínimo de 3 horas, para assegurar a formação de substâncias aromáticas suficientes e para não arriscar uma super acidificação até o resfriamento do iogurte. Teoricamente a temperatura de cultivo simbiótico é de 45°C . Na prática trabalha-se com temperaturas mais baixas, de 40 a 45°C . Segundo os autores qualquer pesquisa no sentido de melhorar a qualidade do iogurte, deve ser realizado pela adaptação a mutação das culturas originais, como por exemplo, a produção de diacetil, de mucus, a multiplicação a uma temperatura abaixo da ordinária, uma fraca pós-acidificação. Uma exceção poderia ser feita pela substituição do *L. bulgaricus* por *L. acidophilus* e/ou *L. bifidus*, com a finalidade de melhor controlar a pós-acidificação do iogurte.

De acordo com TAMINE e DEETH (1980), o *S. thermophilus* cresce rapidamente no início da fermentação utilizando aminoácidos essenciais produzidos pelo *L. bulgaricus*. *S. thermophilus* produz ácido lático, que diminui o pH e torna o meio ideal para o crescimento de *L. bulgaricus*, além de produzir ácido fórmico que estimula o crescimento do *L. bulgaricus*.

Várias razões são apresentadas por VIEIRA (1981) ressaltando a importância das bactérias lácticas na formação do iogurte: a formação do ácido lático dá uma proteção as substâncias alimentícias devido à inibição das bactérias que causam a putrefação, o ácido lático é um agente de conservação; a fermentação láctica "aromatizante" permite a obtenção de produtos ácidos com sabor agradável; produção de substâncias inibidoras, responsáveis pela seleção das espécies e a produção de viscosidade.

BOVILLANE E DESMAZEAUD (1981) estudaram o comportamento de associações de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em relação à acidificação no processamento, no armazenamento e produção de substâncias aromáticas, concluíram que as respostas obtidas podem ser muito variáveis, podendo algumas associações serem muito acidificantes no processamento e não no armazenamento, e vice-versa.

Trabalhos realizados por SINGH e SHARMA (1982) ressaltaram a importância da seleção adequada dos microrganismos para a obtenção de uniformidade e estabi-

lidade no produto, especialmente em termos de proteólise e ácido lático. A produção de ácido lático no processamento do iogurte deve ser observada em dois planos diferentes; em um existe aquela acidificação necessária ao processamento do produto, em outro existe a pós-acidificação, ou seja, aquela acidificação que ocorre de modo lento, no armazenamento refrigerado.

Normalmente a população de microrganismos vivos no iogurte aumenta logo após a fabricação, diminuindo posteriormente durante o armazenamento refrigerado. A população viva de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* está em torno de 100 milhões/g no iogurte natural e no iogurte de morango, quando armazenados a 5°C por 60 dias segundo HAMANN e MARTH (1984b). Quando o produto é armazenado a 10°C esse número cai muito, segundo os autores.

Segundo GARCIA e OLIVEIRA (1985) no processo de fermentação atualmente utilizado emprega-se culturas microbiologicamente puras selecionadas, visando promover a fermentação desejada com um resultado tecnológico muito superior no que se refere a padronização da qualidade do produto resultante. Nesse processo, a flora do leite é eliminada pela pasteurização e a fermentação passa a depender exclusivamente da cultura láctica adicionada como inóculo.

Segundo RADKE-MITCHELL e SANDINE (1986) a compatibilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o crescimento associativo é dependente de uma temperatura óti

ma de crescimento.

De acordo com MARTINS e LUCHESE (1988b) as bactérias do iogurte podem ser desenvolvidas separadamente e inoculadas em proporções definidas ao leite a ser processado. A manipulação destas culturas requer especialização, técnica e conhecimento de vários fatores intrínsecos aos diferentes microrganismos, como as diferentes temperaturas ótimas de crescimento, a capacidade de crescimento associativo, as diferentes velocidades de crescimento e as condições necessárias para que se mantenha o balanço essencial entre os dois microrganismos. Segundo os autores na seleção de linhagens de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* a determinação da compatibilidade de crescimento associativo é muito importante, pois deste modo pode-se evitar a utilização concomitante de linhagens que apresentem associação antagônica, o que prejudicaria a qualidade do produto final.

3. Relação cocos:bastonetes

Na indústria de derivados do leite *S. thermophilus* é comumente referido como "cocos" e *L. bulgaricus* como "bastonetes".

Alguns países europeus tem proposto padrões para o conteúdo bacteriológico do iogurte. Dessa maneira, padrões para viabilidade de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e a razão bastonetes: cocos são importantes na determinação das propriedades organolépticas do iogurte. Essa razão

deve ser de 1:1 para que a qualidade do produto seja alta (ACCOLAS, 1977; HAMANN e MARTH, 1984a e 1984b; HUMPHREYS e PLUNKETT, 1969; LABRAPOULOS et alli, 1982; LEE et alli, 1974; RADKE-MITCHELL e SANDINE, 1984; RASIC e KURMANN, 1978),

PETTE e LOLKEMA (1950d) sugerem uma relação de 1:1, bastonetes : cocos para o iogurte depois da incubação e resfriamento. SELLARS e BABEL (1970) recomendam uma similar relação para as bactérias do iogurte.

De acordo com PETTE e LOLKEMA (1950b) a proporção de bastonetes e cocos no produto final é influenciada pela temperatura de incubação, acidez da cultura e taxa de inoculação.

PETTE e LOLKEMA (1951), estudando os fatores que afetam a proporção dos componentes da cultura lática, concluíram que a manutenção de um bom equilíbrio entre as duas espécies bacterianas de culturas mistas, durante as sucessivas repicagens, é uma técnica desejável, e uma relação 1:1 de *Lactobacillus* e *Streptococcus* é geralmente considerada ótima (DAVIS et alli, 1971; MOON et alli, 1975; PETTE e LOLKEMA, 1950b).

O controle de proporção entre *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* segundo DEMETER (1969) é de especial importância, devendo ser encontrado ao redor de 100 *Lactobacillus* para cada 120 - 200 *Streptococcus*. Esta proporção se altera em favor das termobactérias, ao serem semeadas maiores

quantidades destas ou ainda devido ao aumento de temperatura, determinando uma acidez bem mais intensa.

STOCKLIN (1969) recomenda que a relação de bastonetes e cocos pode ser mantido em 1:1 ou 1:1,2.

Devido a importância da manutenção da relação desejável de 1:1 de bastonetes:cocos para a boa qualidade na fabricação do iogurte são necessárias certas técnicas para determinação relativa das proporções de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em crescimento simbiótico (DAVIS et alli, 1971; LEE et alli, 1974).

Estudos sobre o equilíbrio da flora, pH e acidez de iogurte comercializado em Santa Maria, RS, foi realizado por TERRA et alli (1977). Das amostras 39,73% apresentaram uma flora equilibrada, 41,02% predominou *S. thermophilus* e 19,23% predominou *L. bulgaricus*.

A manutenção de um bom equilíbrio entre as duas espécies bacterianas das culturas mistas, durante sucessivas substituições, é um processo de tentativas. Uma proporção lactobacilo/estreptococo próxima de 1 é, geralmente, considerada como ótima por ACCOLAS et alli (1977) e procura-se mantê-la dentro das culturas sucessivas limitrófas do fermento e dentro do iogurte propriamente dito. Segundo os autores a conservação do equilíbrio entre lactobacilo/estreptococo, a produção de ácido e o aroma da cultura mista depende da escolha das linhagens, do ajustamento do inóculo, do tempo e da temperatura de incubação e eventualmente, do

número de repicagens.

Estudos de MOON e REINBOLD (1976) concluíram que culturas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* produzem maior quantidade de ácido quando juntos, que quando crescem separadamente. A competitividade e o comensalismo entre esses microrganismos : ocorre a uma temperatura ótima de 37°C e quando a relação entre lactobacilos e estreptococos é de 2:1 na inoculação.

A compatibilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o crescimento associativo foi determinado por RADKE - MITCHELL e SANDINE (1986), a contagem foi realizada em placas de Petri. Linhagens de *S. thermophilus* crescem em maior número de células que o *L. bulgaricus* a 37, 42 ou 45°C, em 93.3% dos testes realizados com culturas mistas. A relação bastonetes: cocos obtida a 37, 42 e 45°C é 1:2,2 ; 1:1,18 e 1:2,4 respectivamente.

GREEN e IBE (1987) sugerem uma relação de 1:1 para a relação de *L. bulgaricus* : *S. thermophilus* e recomendam um crescimento máximo em torno de 10^7 a 10^8 u.f.c./ml depois de 4 a 8 dias de armazenamento a 10°C.

4. Meios de cultura para enumeração dos *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*

É interessante que se tenha disponível um método simples e seguro para enumeração diferencial de bactérias de ácido lático em iogurte.

EVANS e NIVEN (1951) desenvolveram um meio para microrganismos que requerem altos teores de tiamina, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. O meio continha "tween 80" para reduzir a lag-fase ou a fase adaptativa dos microrganismos. Este meio foi inicialmente usado para lactobacilos heterofermentativos, atualmente, no entanto, tem sido usado para contagem e isolamento de outros microrganismos do grupo láctico.

O meio de cultura desenvolvido por ELLIKER et alli (1956) tem sido considerado como o mais seletivo dos meios para contagem e isolamento de microrganismos lácticos, provenientes de várias fontes.

Alterando a tradição da utilização de extratos proteicos vegetais nos meios de cultura para lactobacilos, DEMAN et alli (1960) propuseram um meio denominado MRS, a base de extratos de carne e levedura, proteose e peptona, como substratos nitrogenados. Esse meio tem sido, até hoje, amplamente aceito como um dos melhores meios de cultura para os integrantes do gênero *Lactobacillus*, por permitir o desenvolvimento de quase todas as linhagens do gênero. No entanto, sua seletividade é pequena, possibilitando o crescimento de outros microrganismos como estreptococos, leveduras, etc.

SELLARS e BABEL (1970), MOCQUOT e HUREL (1970) sugerem contagem em microscópio de culturas de iogurte para determinar a relação bastonetes:cocos.

Para a enumeração de bactérias do iogurte, a contagem em microscópio é falha, pois não distingue bactéria morta de viva (DAVIS et alli, 1971; LEE et alli, 1974). Métodos microscópicos, entretanto, podem ser utilizados para determinação da razão de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (DAVIS, 1970; JACQMAIN-GOLDSMIT e DARAR-LHOIS (1984)).

DAVIS (1970), utilizou o meio LAB para plaqueamento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* do iogurte para estudar a viabilidade dos mesmos quando estocados a 5°C por 28 dias. Segundo o autor apesar do meio ser satisfatório para enumeração e diferenciação das bactérias do ácido láctico, ele não as identifica.

PORUBCAN e SELLARS (1973) estudaram a influência da temperatura no tamanho e morfologia das colônias. Descreveram um meio preparado por adição de uma mistura de açúcares a um meio basal, antes do plaqueamento. Neste meio, *L. bulgaricus* formava colônias pequenas e difusas, enquanto o *S. thermophilus* formava colônias densas e bem separadas. Enumeração diferencial de bastonetes e cocos nesse meio, se torna difícil, pois é baseada na morfologia da colônia (MERMELSTEIN, 1982).

Um fator decisivo no isolamento de bactérias lácticas é a escolha e utilização do meio de cultura a serem empregados. Existe um número muito grande de meios de culturas que permitem o desenvolvimento de tais microrganismos (DAVIDSON e CRONIN, 1973 ; MARTH, 1978). No entanto, por

serem muito ricos em nutrientes e conterem vários fatores de crescimento esses meios possibilitam o desenvolvimento de outros microrganismos não pertencentes ao grupo láctico (MARTH, 1978).

LEE et alli (1974) descreveram um meio que contém sacarose (maioria das linhagens de *L. bulgaricus* não fermenta sacarose), e lactose (que pode ser fermentado por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*). A adição adequada da combinação desses dois dissacarídeos a um meio basal, acentuou o crescimento de *S. thermophilus*, que é capaz de mudar a cor de um indicador ácido-base, dando acentuada cor amarela às colônias. O *L. bulgaricus* cresce mais lentamente, pelo fato de poder fermentar apenas um dos açúcares e com isso produz menos ácido, formando colônias brancas. Enumeração diferencial de culturas bastonetes:cocos neste meio entretanto, era insatisfatória devido a variação das linhagens e difusão do ácido no meio.

DEAK (1974) propôs, para contagem e isolamento de bactérias lácticas, o Lacto-agar, no qual, além de triptona, extrato de levedura, glicose e carbonato de cálcio, acrescentava-se sorbato de potássio (0,7 g/l) para inibir os microrganismos catalase-positiva e verde de bromocresol como indicador da produção de ácido.

ROBINSON e TAMINE (1976) realizaram importante trabalho sobre a qualidade microbiológica do iogurte, onde testam diferentes métodos e meios de culturas para as

bactérias do iogurte, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, e organismos patogênicos.

Para o isolamento de organismos do gênero *Lactobacillus* existe um número muito grande de meios de cultura já descritos, os quais apresentam uma grande variação de substâncias destinadas a aumentar sua seletividade. Muitos dos meios propostos para esse fim, como o agar suco de tomate, agar suco de laranja e meio V.8 (SPECK, 1976), baseiam sua formulação em extratos vegetais acrescidos de fatores de crescimento e redução do pH para faixas abaixo de 5,8 - 6,0. No entanto, ROGOSA et alli (1951) tinha proposto um meio contendo 2,5% de acetato de sódio, além de ácido acético, o que resultou num meio com boa seletividade.

HARRIGAN e McCANCE (1976) indicaram o meio MRS para contagem e isolamento de lactobacilos de fontes que possuem uma grande variedade de microrganismos. Para isolamento de *Streptococcus*, os autores citam o meio agar lactato-vermelho neutro, cuja seletividade e eficiência podem ser aumentados pela adição de 50 ppm de acetato de tálio, composto que inibe o crescimento de coliformes.

Um meio diferencial para *S. thermophilus*, baseado na adição de sal de tetrazolium e tirosina ao agar ST foi descrito por OTTOGALLI e GALLI (1978).

Quando incorporado glicerofosfato, ao agar, ocorria inibição no crescimento de *L. bulgaricus*, mas não de *S. thermophilus*. Enumeração diferencial baseada neste princí

pio foi proposto por SHANKAR e DAVIES (1977a, 1978).

MORAES e PASSOS (1979) utilizaram métodos convencionais de isolamento para separação dos microorganismos do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, dos contaminantes normalmente presentes no produto comercial. A metodologia empregada permitiu o isolamento e a identificação destes microorganismos a partir de iogurte comercial ou de culturas mistas. No isolamento do *L. bulgaricus* foi utilizado caldo Rogosa e agar Rogosa e na identificação efetuou-se provas de fermentação de açúcares sobre caldo MRS e prova de crescimento em meio de 2% e 4% de cloreto de sódio. O isolamento do *S. thermophilus* foi realizado em caldo vermelho neutro-lactose-acetato de tálio e agar-vermelho neutro-lactose acetato de tálio e para identificação efetuaram-se provas de limite de crescimento a 45^oC sobre caldo-levedura-glicose-extrato de carne, fermentação de maltose sobre caldo MRS contendo 2% de cloreto de sódio.

TAMINE e DEETH (1980) desenvolveram um meio onde foi adicionado cloreto de trifeniltetrazolium e cisteína ao meio basal de leite, na tentativa de realizar a enumeração diferencial da associação bastonetes e cocos.

Enumeração de bactérias de iogurte em meio agar é muitas vezes baseada na morfologia da colônia. Alguns meios de culturas para enumeração de bactérias de iogurte tem sido desenvolvidos (SURIYARACHCHI E FLEET, 1981) entretanto poucos métodos para enumeração diferencial de

culturas bastonetes:cocos são descritos (DAVIS et alli, 1971).

Para BRACQUART (1981) existem poucos métodos desenvolvidos que permitem uma boa diferenciação das bactérias do iogurte. A contagem diferenciada das bactérias do iogurte pode ser feita de duas maneiras diferentes. Na primeira, cada microrganismo é cultivado separadamente em um meio seletivo, como os sugeridos por DEMAN et alli (1960), JOHNS et alli (1978), TERGAZHI e SANDINE (1975) e SHANKAR e DAVIES (1977a). Pode-se também utilizar um meio em que ambas bactérias cresçam, como o agar TPPY eriocromo-T; neste meio a diferenciação baseia-se na coloração com negro de eriocromo-T das colônias de *S. thermophilus*, mas não das colônias de *L. bulgaricus*.

CHAMBA et alli (1981) confirmaram a eficiência do acetato de tálio quando adicionado a diferentes meios para contagem da microflora acidificante de leite cru.

Dois meios para enumeração separada de bastonetes e cocos em iogurte foi desenvolvido por DRIESSEN et alli (1982b). *S. thermophilus* cresce em agar ST que contém sacarose, enquanto que, *L. bulgaricus* forma colônias difusas, irregulares, em agar LB.

Segundo COKER e MARTLEY (1982) numerosos meios de cultura tem sido propostos para a contagem seletiva de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. As características usa

das para a diferenciação entre os dois microrganismos são a morfologia da colônia, açúcar fermentado e o pH do meio. De acordo com os autores o agar MRS pode ser modificado substituindo-se a glicose pela maltose como carboidrato fermentável. Pelo fato do *S. thermophilus* não fermentar a maltose e alguns lactobacilos termofílos fermentarem, este meio pode ser usado para enumeração seletiva.

RADKE-MITCHELL e SANDINE (1984) reportaram que nenhum meio diferencial desenvolvido deram resultados satisfatórios para todas as linhagens de *Streptococcus* e *Lactobacillus* quando testados em diferentes laboratórios.

HULL et alli (1984), utilizaram o meio M17 a pH 6,8 para contagem de *S. thermophilus* e agar Rogosa para *L. bulgaricus* e *L. helveticus* var. *jugurti*.

O meio agar Elliker's e o agar Rogosa SL, são meios de cultura seletivas para *L. bulgaricus*, quando usados para determinar o número de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em iogurte comercial e iogurte manufaturados em laboratório, segundo HAMANN e MARTH (1984b).

Esses mesmos autores, HAMANN e MARTH (1984a) verificaram que os meios agar Elliker's e o "Hansen's Yogurt Agar" modificado permitiram contagens comparáveis nos dois meios, com uma boa diferenciação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

De acordo com GARCIA (1984), os procedimentos desenvolvidos para isolamento de bactérias lácticas são

muito parecidos, iniciando-se por um enriquecimento em caldo, leite ou leite suplementado por fatores de crescimento, indicadores, etc; sendo possível fazer alterações na faixa de pH para beneficiar determinados grupos (ex lactobacilos), tratamento térmico (para *S. thermophilus*), plaqueamento e incubação em temperaturas que variam para os diversos grupos.

Para isolamento das bactérias láticas termofílas (estreptococos e lactobacilos), após várias tentativas com diferentes meios e diferentes condições de incubação, o meio agar APT foi o que apresentou os melhores resultados. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Após crescimento, colônias isoladas eram transferidas para leite tornassolado, seguindo-se incubação a 45°C até coagulação que normalmente ocorria dentro de 10 horas de acordo com GARCIA e OLIVEIRA (1985).

Segundo ANTUNES (1985), o meio de cultura APT, embora seja indicado para lactobacilos, permite o desenvolvimento de outros microrganismos. Para o isolamento de bactérias láticas o autor, utilizou o meio de cultura agar APT-S, desenvolvido a partir do agar APT, pela incorporação de 0,1% de sorbato de potássio, 0,5% de agar e concomitante redução do pH para 6,0 pela adição de ácido lático comprovou-se que este meio teve um bom comportamento para contagem e isolamento dos microrganismos do grupo lático, apresentando uma eficiência seletiva nas condições utico.

lizadas.

A hidrólise do amido por *S. thermophilus* foi investigada por RADKE-MITCHELL e SANDINE (1986), mas essa característica é insatisfatória para desenvolvimento de um meio diferencial para bastonetes e cocos. Enumeração diferencial baseada na hidrólise da uréia por *S. thermophilus* era também investigada nesse estudo.

MATALON e SANDINE (1986) utilizaram agar Elliker's suplementado de 0,1% de Tween 80 e 2, 3, 5-cloreto de trifeniltetrazolium a 50 µg/ml para contagem e diferenciação de bactérias do iogurte e cultura mistas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. O *S. thermophilus* produz colônia pequena e vermelha, enquanto o *L. bulgaricus* produz colônias grandes e brancas.

MARTINS e LUCHESE (1988b) realizaram estudos para seleção de linhagens de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* para produção de iogurte, através da adaptação da técnica da sobre-camada semi-sólida para a detecção de antibiose entre linhagens de *L. bulgaricus* e três linhagens de *S. thermophilus* utilizando como meios de cultura agar MRS, agar LEE e agar M17.

Segundo ROHM et alli (1990) o número de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* do iogurte natural varia em torno de 10^8 u.f.c./g quando armazenado a 10°C por 10 e 20 dias depois da fabricação. Quando a temperatura e o tempo de armazenamento são elevados, há uma redução marcante na

sobrevivência das bactérias do iogurte. A contagem do *S. thermophilus* é determinada por plaqueamento de amostras diluídas em agar M17, incubadas a 37°C por 48 h, *L. bulgaricus* é controlado em agar MRS e incubado anaerobicamente a 48°C por 72 horas.

5. Contaminantes

SOULIDES (1986) reporta que leveduras que fermentam lactose do gênero *Torulopsis* são predominante — mente responsáveis pela deterioração do iogurte natural.

Estudos realizados por RASIC e MITIC (1963) demonstraram que há um efeito mais forte de antagonismo de culturas bastonetes e cocos com linhagens de *E. coli* , *S. aureus* e *B. subtilis* do que cada linhagem sozinha.

Segundo DAVIS (1970) a fabricação do iogurte é de excelente qualidade e o armazenamento sob refrigeração é feita corretamente (5°C), quando encontra-se uma célula de levedura por grama.

Um estudo sobre a sobrevivência de coliformes e *S. aureus* em iogurte revelou que estes organismos são rapidamente inativados neste produto (GOEL et alli , 1971; MINOR e MARTH, 1972).

De acordo com DAVIS (1975) as leveduras são os mais sérios contaminantes do iogurte com frutas e os fungos do iogurte natural.

O controle da deterioração do iogurte por levedura torna-se um dos pontos principais em sua manufatura. Esta deterioração geralmente é reconhecida pelo desenvolvimento de levedura sem flavor, baixa qualidade na textura devido a produção de gás e estufamento do recipiente (DAVIS e McLACHLAN, 1974; KROGER, 1976).

Em virtude de ser um produto resultante da acidificação do leite por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, o iogurte tem efeito antagônico no crescimento de numerosos organismos in vitro (RASIC e KURMANN, 1978; SINGH, 1983 ; YAZICIOGLU e YILMAZ, 1966).

De acordo com SURIYARACHCHI e FLEET (1981), 45% do iogurte comercial encontrado no mercado, contêm acima de 10^3 células por grama de levedura e um total de 73 linhagens de leveduras foram isoladas e identificadas. O crescimento de leveduras em iogurte está relacionado com a capacidade das leveduras crescerem a temperatura de refrigeração, de fermentarem lactose e sacarose e de hidrolizarem a caseína do leite. Segundo os autores, pelo fato de seu baixo pH, o iogurte é um meio ideal para o crescimento de leveduras, e inúmeros estudos são realizados tendo como objetivo a deterioração de iogurte por levedura.

ALEKSIEVA e MIRKOV (1981), reportaram sobre a ocorrência e crescimento de fungos e leveduras em iogurte.

Em estudos realizado por SINGH (1983), fil

trado de culturas de *S. thermophilus* revelaram nenhum antagonismo com linhagens de *S. aureus*, *E. coli*, *P. fragi* e *M. flavus*, enquanto filtrados de *L. bulgaricus* e uma mistura de cultura bastonetes e cocos inibiam o crescimento dos microrganismos testados. O mesmo resultado foi obtido numa investigação similar usando-se *L. acidophilus* em lugar de *L. bulgaricus* (SINGH e SHARMA, 1982).

GARCIA e FERNANDEZ (1984) estudaram a contaminação de iogurte por fungos. A presença, quantidade e espécies de fungos em iogurtes é muito variável. Os fungos encontrados geralmente são do gênero *Penicillium*, *Monilla*, *Cladosporium*, *Micelia sterilia*, *Alternaria*, *Rhizopuz*, *Aspergillus*, leveduras também são encontradas. Segundo os autores o agar extraído de malte é o meio de cultura mais favorável para o desenvolvimento de linhagens de *Penicillium* isolados do iogurte.

Segundo SALINAS (1984b), leveduras são detectadas (> 10 colônias/g) em até 70% de iogurte natural de 2 marcas da Espanha (50 amostras cada) analisados até 24 horas depois de produzidos; fungos também são encontrados.

GREEN e IBE (1987) estudaram os contaminantes de iogurte produzido na Nigéria. Os autores sugerem que a alta contaminação encontrada é devido a um alto índice de contaminação inicial e uma refrigeração imprópria do iogurte comercial. Foram encontradas, leveduras (contagem da ordem de $10^4 - 10^6$ u.f.c./ml), coliformes e estafilococos (10

u.f.c./ml), fungos e psicotróficos (10^3 u.f.c./ml).

PREIXENS e SANCHO (1987), concluíram que o meio ácido do iogurte é desfavorável para o crescimento de coliformes, mas algumas linhagens de *E. coli* podem se adaptar a presença de ácido lático.

A contagem total de coliformes é menor que 10 u.f.c./ml de acordo com TAMINE et alli (1987).

De acordo com DIAZ et alli (1989), coliformes são detectadas em amostras de iogurte com menos de 48 horas e não durante o armazenamento. Leveduras sobrevivem em amostras com mais de 30 dias a temperaturas de armazenamento de 5 - 7°C e 11 - 13°C. Fungos raramente sobrevivem por mais de 15 dias em iogurte natural.

Estudos realizados por SINHA et alli (1989), na microflora de iogurte comercial, não foram encontrados coliformes, fungos e leveduras quando estocados a 4,7 e 10°C.

Segundo ROHM et alli (1990), dependendo da origem da amostra a população de leveduras aumenta de 10 u.f.c./g para 10^6 u.f.c./g quando o iogurte é estocado a 10°C. O meio de cultura utilizado para contagem de leveduras é agar extrato de levedura glicose-clorofenicol (YGCA - Merck), incubado a 25°C por 96 horas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Parte I: Análises do iogurte comercial

1. Coleta das amostras

As amostras de iogurte foram adquiridas no comércio da região de Piracicaba, SP, correspondentes a 4 diferentes marcas comerciais de iogurte natural e foram transportadas ao laboratório em recipientes com gelo, assegurando assim, a refrigeração às amostras. Para cada marca, foram coletadas 3 amostras com a mesma data de fabricação, entre 7 a 15 dias de vida de prateleira, a cada mes e durante 5 meses. As amostras foram apresentadas como A, B, C e D.

2. Preparo das amostras

As amostras foram mantidas sob refrigeração a $\pm 7^{\circ}\text{C}$, até o momento da análise, o que foi sempre realizado no mesmo dia da coleta. Os frascos foram abertos com assepsia e transferidos para um liquidificador esterilizado.

A homogeneização foi feita tomando-se o cuidado de ligar e desligar o aparelho 3 vezes por 20 segundos com a finalidade de padronização do processo, segundo FERREIRA e CHAVES (1981).

3. Acidez titulável

A acidez titulável das amostras foi determinada através da titulação de 5 g de amostra com NaOH 0,1N, até o ponto de viragem do indicador fenolftaleína, segundo o LANARA (1981a).

Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido lático.

4. pH

A leitura dos valores de pH das amostras, foi realizada de acordo com o LANARA (1981a) utilizando-se para isso um potenciômetro, marca Digimed, devidamente calibrado.

5. Peso líquido

O peso líquido foi determinado pesando-se inicialmente os frascos com o produto e, posteriormente, as embalagens vazias, limpas e secas, de acordo com FERREIRA e CHAVES (1981).

Os resultados foram expressos em grâmas.

6. Contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*

Para a contagem dessas bactérias, utilizou-se o método de contagem em placas de Petri, com meio específico.

Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c./ml) em meio TPPY - eriocromo-T agar, segundo BRACQUART (1981) e utilizando-se sobre-camada de meio nas placas de Petri.

Séries de diluições do iogurte foram feitas com solução estéril de triptona 0,1%. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram utilizadas para semeadura por profundidade em placas de Petri contendo o meio diferencial. Logo após o endurecimento do meio de cultura sobrepunha-se uma outra camada do mesmo meio. As placas foram incubadas a 42°C em Jarra Gaspak, "sistema anaeróbico" por 48 horas e a contagem foi feita utilizando-se um contador do tipo Quebec.

7. Contagem de coliformes totais

Para esse grupo de microrganismos foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c./ml) em meio sólido, utilizando-se agar cristal violeta vermelho neutro Bile (VRBL - agar - Merck), através de semeadura por profundidade e incubação a uma temperatura de 32°C por 48 horas, tal como recomenda o LANARA (1981b).

8. Contagem de fungos e leveduras

Para estes grupos foram feitas as contagens de unidades formadoras de colônias (u.f.c./ml) em BDA (Batata-dextrose-agar), preparado de acordo com o LANARA (1981b). Após a semeadura a incubação foi feita a uma temperatura de 32°C por 48 horas.

9. Isolamento e purificação dos microrganismos lácticos

Inicialmente escolhia-se dentre as placas contadas no item 6, aquelas que tivessem colônias dos dois microrganismos bem separadas. Estas colônias escolhidas eram inoculadas separadamente em leite desnatado reconstituído e esterilizado (12% SNG) e incubadas a 42°C por 24 horas.

A seguir transferiu-se para TPPY - eriocromo-T agar por meio de estrias na superfície do meio sólido sobrepondo-se outra camada do mesmo meio. Incubou-se a 42°C por 48 horas em Jarra Gaspak. Nesse meio, as colônias de *L. bulgaricus* apresentam-se transparentes, difusas (4 a 6 mm) de forma indefinida e extremidade irregular. As colônias de *S. thermophilus* apresentam-se circular, 1 a 3 mm de diâmetro, convexas, opacas, branco violeta, centro escuro.

As colônias características foram então transferidas novamente para leite esterilizado (12% SNG) e

incubadas a 42°C por 24 horas.

Fez-se coloração de gram, para se verificar a pureza dos isolados.

Foi feita novamente a incubação em TPPY-erio cromo-T agar e então transferidos para leite esterilizado (12% SNG), adicionado de 1% de extrato de levedura DIFCO, para manutenção e testes de identificação. O isolamento das bactérias foi feito para todas as marcas de iogurte em estudo.

10. Identificação dos microrganismos

10.1. Identificação de L. bulgaricus

Foram efetuadas provas de fermentação de açúcares em caldo MRS, utilizando-se os seguintes carboidratos: sacarose, ramnose, manitol, maltose, lactose, glicose e arabinose. Foram realizadas também provas de crescimento em caldo MRS contendo 2% e 4% de cloreto de sódio. Os testes com carboidratos e cloreto de sódio foram efetuados a 37°C por 7 dias, os quais foram realizados segundo MORAES e PASSOS (1979).

10.2. Identificação de S. thermophilus

Foram efetuadas provas de crescimento a 45°C em caldo de levedura - glicose - extrato de carne, durante 48 horas. Conjuntamente, realizou-se fermentação de maltose em caldo MRS e crescimento em caldo MRS contendo 2% de clo-

reto de sódio. Os testes do carboidrato e cloreto de sódio foram efetuados por 7 dias a 37°C de acordo com MORAES e PASSOS (1979).

Parte II: Crescimento populacional e produção de ácido pelos microrganismos isolados.

Nesta parte do trabalho foram utilizadas as culturas isoladas na parte I, item 9. Antes de se utilizar as culturas, estas foram submetidas a três repicagem sucessivas para reativação completa, em leite desnatado reconstituído, com 12% SNG e esterilizado.

1. Definição da temperatura

Através da determinação da acidez titulável foram avaliadas as produções de ácido pelos microrganismos isolados, utilizando-se duas temperaturas, 37°C e 42°C, em leite esterilizado (12% SNG) e partindo-se sempre de um inóculo de 0,5% de cada uma das duas culturas reativadas e um tempo de desenvolvimento de 6 horas.

Neste ensaio, e em todos que se seguem o leite desnatado reconstituído com 12% de SNG, esterilizado foi inoculado com as culturas reativadas (0,5% de *S. thermophilus* e 0,5% de *L. bulgaricus*) e depois transferidos assepticamente ± 40 ml, para tubos de ensaios de 12x220 mm esterilizados, para que ocorresse o desenvolvimento.

2. Produção de ácido pelos pares estreptococo lactobacilo

As culturas foram pareadas, um estreptococo e um lactobacilo, em todas as combinações possíveis considerando-se as diferentes marcas das amostras das quais elas se originaram.

Estes pares foram inoculados a 1% em leite esterilizado (12% SNG), na melhor temperatura, determinada no ítem anterior, por 6 horas e após este tempo foram realizadas análises de acidez titulável e pH. As análises foram realizadas em triplicatas, segundo ACCOLAS et alii (1977).

3. Acidificação e pós-acidificação

De acordo com os resultados obtidos no teste de produção de ácido pelos pares estreptococo-lactobacilo, foram selecionados os três pares melhores produtores de ácido para o estudo do desenvolvimento da acidez até a coagulação do leite e também após essa coagulação, durante a manutenção do produto em refrigerador.

Esses pares foram inoculados a 1% em leite esterilizado (12% SNG) e incubados na melhor temperatura até a coagulação, com análise de acidez titulável e pH a cada hora. Após a coagulação, os iogurtes sofreram dois tratamentos distintos:

Resfriamento lento: os frascos saíram da estufa e foram diretamente para o refrigerador a uma temperatura en-

tre 7 e 10°C.

Resfriamento rápido: os frascos saíram da estufa e foram colocados rapidamente em um banho de gelo até atingirem a temperatura de 7°C, então os frascos foram levados ao refrigerador a uma temperatura entre 7 e 10°C.

Para os dois tratamentos, os frascos ficaram no refrigerador por 30 dias, para o estudo da pós-acidificação através da análise da acidez titulável e pH nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 horas e, a seguir, de 48 em 48 horas até completar 30 dias. O tempo do resfriamento, corresponde ao momento em que os frascos são colocados no refrigerador.

4. Crescimento do L. bulgaricus e S. thermophilus

Foram realizadas contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c./ml) em meio TPPY-eriocromo-T agar, de acordo com BRACQUART (1981), e essa contagem foi realizada de hora em hora, até a coagulação. Após isso, no período de pós-acidificação no refrigerador, a contagem foi realizada nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 horas e depois, de 48 em 48 horas, até atingir os 30 dias, segundo ACCOLAS et alli (1977).

As análises foram sempre realizadas em triplicatas e os experimentos em duplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Peso líquido, acidez titulável e pH dos iogurtes adquiridos no comércio.

Os valores médios observados para o peso líquido, acidez titulável e pH nas amostras de iogurte adquiridas no comércio encontram-se expressos na tabela 1.

O valor para o peso líquido, declarado nas embalagens, é de 200,0 gramas e pelos valores apresentados na tabela 1 constata-se que o iogurte C apresentou sempre valores abaixo do declarado, com um peso líquido médio de 194,8g para as análises dos cinco meses, ou seja, 2,58% menos iogurte do que o declarado. O iogurte B, por outro lado, apresentou em três meses valores superiores ao declarado e nos outros dois meses valores ligeiramente inferiores, resultando em um valor médio, para os cinco meses, 0,32% acima do declarado na embalagem. Os iogurtes A e D apresentaram em um mês, cada um deles, peso líquido superior ao declarado enquanto que nos outros meses os valores estiveram um pouco abaixo desse, o que resultou em pesos médios para

TABELA 1 - Valores médios obtidos para peso líquido, acidez titulável e pH, nos iogurtes adquiridos no comércio.

Iogurte	Peso Líquido (g)				Acidez Titulável (% Ácido Lático)				pH			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1º mês	197,3	203,0	198,0	199,7	1,34	1,10	1,45	1,30	4,18	4,42	4,04	4,02
2º mês	199,3	201,0	197,5	195,8	1,46	1,28	1,30	1,42	4,10	4,14	3,87	3,92
3º mês	200,6	201,6	191,9	194,8	1,45	1,26	1,43	1,28	4,10	4,34	4,13	4,14
4º mês	199,4	198,4	190,8	202,5	1,38	1,20	1,45	1,28	4,16	4,38	4,02	4,02
5º mês	197,6	199,2	196,0	199,3	1,54	1,26	1,40	1,37	4,13	4,32	4,15	3,92
Média	198,84	200,64	194,84	198,42	1,43	1,22	1,41	1,33				

os cinco meses, respectivamente, 0,58 e 0,79% abaixo das duzentas gramas declaradas nas embalagens.

Para todos os iogurtes avaliados verifica-se uma variação, em relação ao peso indicado na embalagem, de -4,6% (iogurte C, 4º mes) a +1,5% (iogurte B, 1º mes). Além da variação negativa ser bem maior que a positiva, nota-se que 75% dos valores estão abaixo do peso declarado na embalagem.

Esses resultados contrastam bastante com aqueles obtidos por RICHMOND et alli (1979) para a região de Michigam, EUA, onde apenas 10,6% das amostras apresentaram peso líquido abaixo do valor indicado na embalagem e a variação verificada foi de -1,5% a +12,6%. Também apresentam um quadro bem distinto daquele encontrado por FERREIRA e CHAVES (1981) para cinco meses de amostragens em iogurtes comercializados na Zona da Mata, MG, quando apenas um tipo dos oito avaliados, apresentou resultado médio abaixo do peso declarado; interessante lembrar que, provavelmente, as marcas comercializadas em Minas Gerais não devem diferir muito das comercializadas em Piracicaba.

Os valores médios obtidos para a acidez titulável e pH dos iogurtes amostrados, constantes da tabela 1, mostram que o iogurte B apresentou os menores índices de acidez e, conseqüentemente, os maiores valores de pH dentre as amostras analisadas enquanto os iogurtes A e C apresentaram maior acidez, com valores mais baixos de pH.

Segundo FERREIRA e CHAVES (1981) um certo grau de acidez é desejável no iogurte, porém, superacidificação leva à separação do sôro e deterioração de sua consistência e viscosidade. ROBINSON e TAMINE (1976) sugerem uma acidez de 0,72 a 1,17% ácido lático para o iogurte e, dentro desse intervalo situa-se a grande maioria dos valores encontrados ou recomendados por diferentes pesquisadores. Os valores encontrados para os iogurtes analisados neste trabalho mostram que apenas o iogurte B poder-se-ia enquadrar nesses valores enquanto os demais apresentam acidez superior sem, entretanto, apresentarem valores tão elevados quanto aos encontrados por FERREIRA e CHAVES (1981) para os iogurtes comercializados na Zona de Mata, MG.

2. Contagens de L. bulgaricus, S. thermophilus, coliformes, fungos e leveduras para os iogurtes adquiridos no comércio.

Na tabela 2 encontram-se os valores médios obtidos para as contagens de L. bulgaricus, S. thermophilus, coliformes, fungos e leveduras e também as relações bastonete:cocos, para as amostras analisadas.

Os resultados obtidos para as contagens das bactérias lácticas nos iogurtes A, C e C estão de acordo com os resultados relatados por DAVIS (1975), GREEN e IBE (1987) e ROHM et alli (1990). Para o iogurte D, nos três, primeiros meses de amostragem, não foram detectados L. bulgaricus e S. thermophilus viáveis no produto, comprometen-

TABELA 2 - Valores médios obtidos para as contagens de S.thermophilus, L.bulgaricus, coliformes, fungos e leveduras para os iogurtes adquiridos no comércio.

Iogurte	<u>L. bulgaricus</u>				<u>S.thermophilus</u>				<u>Relação</u>				<u>Coliformes</u>				<u>Fungos e</u>			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
	<u>(x10⁷ ufc/ml)</u>				<u>(x10⁷ ufc/ml)</u>				<u>bastonetes:cocos</u>				<u>(ufc/ml)</u>				<u>leveduras(ufc/ml)</u>			
1º mês	38	40	18	-	41	68	35	-	1:1,1	1:1,7	1:1,9	-	-	8	-	27	-	5	10	-
2º mês	21	52	15	-	21	85	33	-	1:1	1:1,6	1:2,2	-	-	80	23	-	-	-	7	-
3º mês	22	30	5,5	-	24	51	11	-	1:1,1	1:1,7	1:2	-	-	77	31	3x10 ⁴	-	10	2x10 ³	4x10 ⁴
4º mês	82	22	22	10	76	40	48	11	1:0,9	1:1,8	1:2,2	1:0,9	30	6	-	-	35	-	-	-
5º mês	70	38	21	7	86	56	44	8	1:1,2	1:1,5	1:2,1	1:0,9	40	12	22	4x10 ²	42	-	25	6x10 ²

do a qualidade natural desse iogurte, podendo inclusive, sugerir que algum tratamento não recomendado foi utilizado para destruição dessas bactérias. Nos outros dois meses, embora se detectasse a presença de bactérias lácticas viáveis nas amostras do iogurte D, os valores foram acentuadamente inferiores aos obtidos para as outras marcas.

Uma relação bastonetes:cocos de 1:1 é geralmente citada pela maioria dos pesquisadores como ideal para que o iogurte apresente as melhores qualidades organolépticas (ACCOLAS et alli, 1977; LEE et alli, 1974; LABRAPOULOS et alli, 1982; HAMANN e MARTH, 1984 e outros). Observando-se os resultados expressos na tabela 2 nota-se que dentre os iogurtes comerciais analisados apenas os da marca A apresentam relação bastonetes:cocos muito próxima daquela citada como ideal, o mesmo ocorrendo para as amostras da marca D no 4º e 5º mes, já os iogurtes das marcas B e C apresentaram número de cocos bem maior que o de bastonetes entretanto estes resultados estão de acordo com os encontrados por DEMETER (1969) e RADKE-MITCHELL e SANDINE (1986).

As contagens para coliformes, fungos e leveduras, nos iogurtes amostrados (tabela 2) revelaram que a marca A nos três primeiros meses, a marca C no 4º mês e a marca D no 2º mês e 4º mês não apresentaram nenhum desses contaminantes. Coliformes, quando presentes, em 9 amostras (45% do total) superou o número de 10 u.f.c./ml encontrado por GREEN e IBE (1987) e também TAMINE et alli (1987). As con

tagens para leveduras e fungos revelaram, pelo menos, três valores bastante elevados (amostra C, 3º mês e amostra D, 3º e 5º meses) praticamente igualando ou superando os valores mais elevados, 10^3 células por grama, encontrados na literatura (SURIYARACHCHI e FLEET, 1981).

3. Identificação dos L. bulgaricus

As culturas puras provenientes da colônias separadas no meio diferencial e consideradas *L. bulgaricus*, foram submetidas a uma série de provas de fermentação de diferentes carboidratos e provas de crescimento em meio a 2 e 4% de cloreto de sódio.

Os resultados obtidos para as quatro culturas bem como as características do *L. bulgaricus*, conforme MORAES e PASSOS (1979), encontram-se na tabela 3. Verifica-se pelos resultados que as quatro culturas testadas eram realmente *L. bulgaricus*.

4. Identificação dos S. thermophilus

As culturas puras provenientes das colônias separadas no meio diferencial e consideradas *S. thermophilus* foram submetidas a provas de fermentação da maltose e de crescimento a 45°C em meio a 4% de cloreto de sódio e os resultados encontram-se na tabela 4 juntamente com as características do *S. thermophilus* conforme MORAES e PASSOS (1979). Os resultados obtidos confirmaram tratar-se realmente de *S. thermophilus*.

Tabela 3 - Identificação do *L. bulgaricus*

	<i>L. bulgaricus</i>				MORAES e PAS- SOS (1979)
	A	B	C	D	
NaCl 4%	-	-	-	-	-
NaCl 2%	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-

Tabela 4 - Identificação do *S. thermophilus*

					MORAES e PAS- SOS (1979)
	A	B	C	D	
Crescimen- to a 45°C	+	+	+	+	+
Fermenta- ção de mal- tose	-	-	-	-	-
Crescimen- to em NaCl a 2%	-	-	-	-	-

5. Produção de ácido pelos *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* isolados.

O poder acidificante das culturas de *S.*

thermophilus e *L. bulgaricus* isoladas dos iogurtes comerciais, expresso pelos valores da acidez titulável obtida após 6 horas de incubação em leite desnatado (12% SNG) esterilizado, encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Desenvolvimento da acidez titulável (% ac. láctico) a 37°C e 42°C pelas culturas isoladas.

	<i>L. bulgaricus</i>		<i>S. thermophilus</i>	
	37°C	42°C	37°C	42°C
Iogurte A	0,46	0,65	0,17	0,21
Iogurte B	0,24	0,50	0,16	0,17
Iogurte C	0,38	0,72	0,16	0,18
Iogurte D	0,36	0,48	0,17	0,17

As quatro culturas de *S. thermophilus* comportaram-se de modo bastante semelhante quanto ao desenvolvimento da acidez, tanto a 37°C como a 42°C, e essas produções foram bastante inferiores às aquelas apresentadas pelos *L. bulgaricus* os quais, por sua vez, apresentaram variações bem maiores na acidez produzida pelas diferentes culturas.

Quanto às temperaturas, nota-se pelos resultados obtidos que a acidez foi mais elevada a 42°C que a 37°C em todos os casos e, por esse motivo, em todos os experimentos subsequentes neste trabalho, a temperatura de 42°C foi a utilizada. Maiores variações no desenvolvimento da acidez entre diferentes culturas de *L. bulgaricus* quando comparadas

com as variações entre culturas de *S. thermophilus* também foram observadas por ACCOLAS et alli. Esses autores também verificaram que tanto *L. bulgaricus* como *S. thermophilus* produzem mais acidez a 42°C que a 37°C.

6. Produção de acidez pelos pares estreptococos-lactobacilos

Na tabela 6 são apresentados os resultados obtidos para acidez titulável e pH desenvolvidos pelas culturas mistas (1 estreptococo e 1 lactobacilo) incubadas a 42°C por 6 horas, em leite desnatado (12% SNG) e esterilizado. Nessa tabela aparecem também os resultados da soma da acidez produzida pelas culturas simples (tabela 5), que compõe cada par estudado.

Ao avaliar-se as produções de ácido pelas culturas mistas comparando-as com os resultados da tabela 5, verifica-se que as culturas mistas produziram notadamente mais ácido que qualquer uma de suas duas culturas componentes, quando consideradas isoladamente. Entretanto, quando se compara a soma da acidez das culturas simples, e acidez de cultura mista correspondentes, constata-se que para duas culturas mistas (LASD e LDSC) esses valores são iguais, enquanto que para quatro culturas mistas (LCSA, LCSD, LDSA e LDSD) houve maior produção de ácido quando as culturas estavam juntas. Esses resultados são comparáveis aos obtidos por ACCOLLAS et alli (1977).

Observando-se ainda a produção total de aci

Tabela 6 - Desenvolvimento da acidez titulável e pH pelas culturas mistas, a 42°C.

Cultura Mista	Acidez Titulável (% ac. lático)	Soma acidez Culturas Simples
LASA	0,70	0,86
LASB	0,48	0,82
LASC	0,54	0,83
LASD	0,82	0,82
LBSA	0,70	0,71
LBSB	0,37	0,67
LBSC	0,35	0,68
LBSD	0,60	0,67
LCSA	1,03	0,93
LCSB	0,78	0,89
LCSC	0,80	0,90
LCSD	1,10	0,89
LDSA	0,78	0,63
LDSB	0,54	0,59
LDSC	0,60	0,60
LDSD	0,79	0,59

L - *Lactobacillus bulgaricus*

S - *Streptococcus thermophilus*

A, B, C, D - marcas do iogurte de origem da cultura.

do pelas culturas mistas, e tomando-se como referência o valor arbitrário, sugerido por MARTINS e LUCHESE (1988), de 0,70% de ácido lático como valor mínimo de acidez a ser atingido pela cultura mista para ser aproveitada industrialmente, constata-se que nove, dos vinte pares testados neste trabalho, igualaram ou ultrapassaram esse mínimo. Desses

pares, foram selecionados os pares LCSD, LCSA e LASD para estudos posteriores de acidificação e pós-acidificação, por terem se mostrado os melhores produtores de ácido, neste experimento.

7. Desenvolvimento da acidez durante o período de incubação (acidificação) e de armazenamento (pós-acidificação), para os três pares de culturas selecionadas.

Os valores de acidez titulável expressos em porcentagem de ácido lático e pH das três culturas mistas incubadas durante 4h a 42°C em leite desnatado (12% SNG) esterilizado, encontra-se na tabela 7.

Tabela 7 - Desenvolvimento da acidez titulável e pH durante o período de incubação a 42°C.

Tempo	LCSD		LCSA		LASD	
	acidez titulável (% ac. lático)	pH	acidez titulável (% ac. lático)	pH	acidez titulável (% ac. lático)	pH
0	0,17	6,17	0,19	6,24	0,18	6,30
1	0,19	6,05	0,20	6,16	0,21	6,15
2	0,24	5,78	0,22	5,92	0,25	5,98
3	0,45	4,89	0,44	5,11	0,45	5,32
4	0,80	4,31	0,88	4,26	0,70	4,80

Verifica-se, pelos resultados obtidos, que a variação na acidez e pH para os três pares testados comportou-se de modo semelhante, com variação discreta nas duas

primeiras horas e variação acentuada nas duas últimas horas de incubação.

Os resultados obtidos para acidez titulável (% de ácido lático) e pH após a transferência dos iogurtes para o refrigerador, com e sem resfriamento em banho de gelo (resfriamento rápido e resfriamento lento), encontra-se na tabela 8.

Pelos valores apresentados nessa tabela, nota-se que o resfriamento rápido retarda bastante o desenvolvimento da pós-acidificação, principalmente para os iogurtes LCSD e LCSA que, com resfriamento lento, após 11 dias (264 horas) já haviam atingido uma acidez comparável à apresentada após 1 mês (744 horas), quando submetidos ao resfriamento rápido.

No início do período de armazenamento, o iogurte LCSD apresentou o menor valor para a acidez titulável (0,70%), dentre os três iogurtes testados, mas, durante o armazenamento foi o que apresentou desenvolvimento de acidez mais acentuado, com um valor final de acidez titulável de 1,71% quando se utiliza resfriamento lento e 1,52% quando o resfriamento foi rápido, valores esses, superiores aos dos outros dois iogurtes. Por outro lado, o iogurte LASD no início do armazenamento, apresentava acidez titulável de 0,80%, acidez essa superior à do iogurte LCSD, porém por apresentar uma pós-acidificação menos acentuada, os valores de acidez final foram os mais baixos

TABELA 8 - Desenvolvimento da acidez titulável e pH durante o período de armazenamento a 7°C.

Tempo de armazenamento (h)	L C S D				L C S A				L A S D			
	resfr. lento acidez titulável (% ac. láctico)	pH	resfr. rápido acidez titulável (% ac. láctico)	pH	resfr. lento acidez titulável (% ac. láctico)	pH	resfr. rápido acidez titulável (% ac. láctico)	pH	resfr. lento acidez titulável (% ac. láctico)	pH	resfr. rápido acidez titulável (% ac. láctico)	pH
0	0,70	4,80	0,70	4,80	0,88	4,26	0,88	4,26	0,80	4,31	0,80	4,31
6	0,80	4,72	0,70	4,81	1,01	4,19	0,89	4,22	0,96	4,23	0,82	4,32
12	0,83	4,60	0,72	4,79	1,12	4,11	0,90	4,22	1,05	4,14	0,85	4,32
18	0,98	4,44	0,71	4,80	1,11	4,10	0,91	4,24	1,06	4,05	0,90	4,30
24	0,99	4,44	0,71	4,75	1,17	4,03	0,95	4,27	1,05	4,05	0,90	4,31
72	1,03	4,21	0,94	4,39	1,26	4,05	1,15	4,12	1,06	4,01	1,00	4,05
120	1,06	4,24	0,94	4,36	1,35	3,97	1,15	4,09	1,13	4,00	1,05	3,95
168	1,17	4,15	1,00	4,26	1,36	3,88	1,17	4,03	1,15	3,95	1,09	3,95
216	1,18	4,13	1,13	4,13	1,36	3,88	1,21	3,97	1,23	3,98	1,16	3,98
264	1,24	4,08	1,14	4,15	1,34	3,89	1,24	3,98	1,30	3,92	1,16	3,96
312	1,16	4,14	1,08	4,28	1,41	3,84	1,30	3,93	1,25	3,91	1,23	3,95
360	1,30	4,04	1,08	4,25	1,48	3,75	1,29	3,87	1,30	3,86	1,30	3,87
408	1,18	4,11	1,10	4,08	1,53	3,76	1,29	3,87	1,42	3,82	1,28	3,90
456	1,38	3,94	1,16	4,07	1,54	3,77	1,32	3,86	1,38	3,82	1,28	3,87
504	1,28	4,00	1,17	4,15	1,52	3,75	1,34	3,84	1,44	3,79	1,30	3,86
552	1,28	3,99	1,25	4,08	1,53	3,79	1,36	3,82	1,43	3,80	1,30	3,89
600	1,42	3,89	1,19	4,01	1,56	3,75	1,39	3,79	1,40	3,81	1,29	3,90
648	1,56	3,88	1,38	4,00	1,59	3,70	1,44	3,71	1,40	3,82	1,26	3,89
696	1,58	3,81	1,38	3,98	1,52	3,76	1,41	3,85	1,44	3,75	1,29	3,89
744	1,71	3,80	1,52	3,92	1,50	3,78	1,40	3,82	1,46	3,70	1,30	3,86

dentre os três iogurtes testados.

O desenvolvimento da acidez para os três iogurtes testados, comportou-se de forma semelhante à relatada por JORDANO et alli (1988), que verificaram um desenvolvimento de acidez mais acentuado durante os primeiros onze dias, que entre onze e vinte e um dias de armazenamento.

Os valores finais de acidez, tanto para o iogurte com resfriamento lento, como para o resfriamento rápido, estão bem acima dos valores 1,0 e 1,25% recomendados por HUMPHREY e PLUNKETT (1969) e 0,72 a 1,17% conforme ROBINSON e TAMINE (1976). Entretanto, os valores obtidos neste trabalho são condizentes com aqueles apresentados por TERRA et alli (1977) que analisaram três marcas de iogurte comercializado em Santa Maria, RS, encontrando para duas marcas, acidez sempre acima de 1,20% de ácido lático, e sendo que, 30,76 e 46,15% das amostras dessas marcas apresentaram acidez acima de 1,40% de ácido lático.

Os valores de pH observados ao final do período de armazenamento estão dentro dos limites apresentados por DUITSCHEVER et alli (1972) de 3,27 a 4,53 e DAVIS e McLACHLAN (1970) de 3,7 a 4,0, porém, inferiores ao valor de 4,0 citado por SELLARS e BABEL (1970), de 4,23 por RICHMOND et alli (1979) e 4,4 por SINHA et alli (1989). Com exceção do iogurte LCSD com resfriamento rápido, os demais apresentaram pH abaixo dos limites observados por LÜCK e MOSTERT (1971) de 3,9 a 4,1.

8. Número de lactobacilos e estreptococos nos iogurtes durante o período de incubação e o período de armazenamento.

Nas tabelas 9, 10 e 11 são apresentados os valores encontrados para as contagens de *L. bulgaricus* e de *S. thermophilus* nos iogurtes LCSD, LCSA e LASD bem como, as relações bastonetes:cocos em cada caso.

Verifica-se, pelos resultados obtidos para os três iogurtes, que tanto o número de *L. bulgaricus* como o de *S. thermophilus* aumentaram durante o transcorrer do período de incubação, sendo esse aumento bem mais significativo para *S. thermophilus*, tanto assim que a relação bastonetes:cocos que no início estava praticamente em 1:1, com três horas de incubação apresentou três vezes mais cocos que bastonetes, com relações bastonetes:cocos de 1:3,2; 1:3,1 e 1:3,2 para os iogurtes LCSD, LCSA e LASD, respectivamente. Após a terceira hora de incubação, embora o número de bactérias continuasse a crescer, estreptococos apresentaram um aumento populacional mais lento e aquelas relações bastonetes:cocos baixaram para 1:2,5; 1:2,4 e 1:2,5, respectivamente.

Esse crescimento mais rápido dos *S. thermophilus* no início da acidificação, está de acordo com a afirmação de TAMINE e DEETH (1980), de que há inicialmente uma produção de aminoácidos essenciais pelos lactobacilos que estimulam o crescimento rápido dos estreptococos e estes, produzindo ácido láctico, acidificam o meio tornando-o favorável ao cresci-

TABELA 9 - Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LCSD durante o período de incubação e o período de armazenamento.

I N C U B A Ç Ã O						
Tempo(h)	<u>L.bulgaricus</u>		<u>S.thermophilus</u>		Relação bastonetes:cocos	
0	46 . 10 ⁵		48 . 10 ⁵		1:1	
1	89 . 10 ⁵		201 . 10 ⁵		1:2,3	
2	48 . 10 ⁶		123 . 10 ⁶		1:2,6	
3	78 . 10 ⁶		247 . 10 ⁶		1:3,2	
4	38 . 10 ⁷		96 . 10 ⁷		1:2,5	
A R M A Z E N A M E N T O						
	Resfriamento		Resfriamento		Resfriamento	
	Lento (x10 ⁷)	Rápido (x10 ⁷)	Lento (x10 ⁷)	Rápido (x10 ⁷)	Lento	Rápido
0	38	38	96	96	1:2,5	1:2,5
6	52	41	100	86	1:1,9	1:2,1
12	81	74	98	89	1:1,2	1:1,2
18	100	94	112	100	1:1,1	1:1,1
24	104	100	109	101	1:1	1:1
72	98	102	96	99	1:1	1:1
120	73	49	54	49	1:0,7	1:1
168	88	81	80	74	1:0,9	1:0,9
216	101	100	95	98	1:0,9	1:1
264	95	102	99	102	1:1	1:1
312	94	49	98	59	1:1	1:1,2
360	47	48	51	48	1:1,1	1:1
408	45	40	45	40	1:1	1:1
456	30	30	30	30	1:1	1:1
504	11	10	11	10	1:1	1:1
552	8	8	8	8	1:1	1:1
600	6	5	6	7	1:1	1:1,4
648	3	3	5	5	1:1,6	1:1,6
696	4	3	3	3	1:0,8	1:1
744	2	2	3	3	1:1,5	1:1,5

TABELA 10 - Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LCSA durante o período de incubação e o período de armazenamento.

I N C U B A Ç Ã O

Tempo (h)	<u>L. bulgaricus</u>	<u>S. thermophilus</u>	Relação bastonetes:cocos
0	$45 \cdot 10^4$	$39 \cdot 10^4$	1:0,9
1	$61 \cdot 10^4$	$82 \cdot 10^4$	1:1,3
2	$18 \cdot 10^5$	$34 \cdot 10^5$	1:1,9
3	$28 \cdot 10^6$	$87 \cdot 10^6$	1:3,1
4	$15 \cdot 10^7$	$36 \cdot 10^7$	1:2,4

A R M A Z E N A M E N T O

	Resfriamento		Resfriamento		Resfriamento	
	lento ($\times 10^7$)	rápido ($\times 10^7$)	lento ($\times 10^7$)	rápido ($\times 10^7$)	lento	rápido
0	15	15	36	36	1:2,4	1:2,4
6	95	90	141	121	1:1,5	1:1,4
12	108	101	140	122	1:1,3	1:1,2
18	148	98	151	121	1:1	1:1,2
24	158	140	169	145	1:1,1	1:1
72	148	122	150	126	1:1	1:1
120	87	86	93	84	1:1,1	1:1
168	65	59	69	56	1:1,1	1:0,9
216	58	53	56	50	1:1,1	1:0,9
264	56	51	52	46	1:0,9	1:0,9
312	48	55	48	51	1:1	1:0,9
360	48	42	50	40	1:1	1:1
408	19	25	21	20	1:1,1	1:0,8
456	40	36	40	36	1:1	1:1
504	21	20	22	20	1:1	1:1
552	15	17	15	17	1:1	1:1
600	12	14	13	15	1:1,1	1:1,1
648	9	9	8	9	1:0,9	1:1
696	2	4	2	3	1:1	1:0,8
744	3	5	2	4	1:07	1:0,8

TABELA 11 - Número de lactobacilos e estreptococos no iogurte LASD durante o período de incubação e o período de armazenamento.

I N C U B A Ç Ã O						
Tempo (h)	<u>L.bulgaricus</u>		<u>S.thermophilus</u>		Relação bastonetes:cocos	
0	15 . 10 ⁵		14 . 10 ⁵		1:0,9	
1	34 . 10 ⁵		60 . 10 ⁵		1:1,8	
2	42 . 10 ⁶		88 . 10 ⁶		1:2,1	
3	35 . 10 ⁷		112 . 10 ⁷		1:3,2	
4	48 . 10 ⁷		120 . 10 ⁷		1:2,5	
A R M A Z E N A M E N T O						
	Resfriamento		Resfriamento		Resfriamento	
	lento	rápido	lento	rápido	lento	rápido
	(x10 ⁷)	(x10 ⁷)	(x10 ⁷)	(x10 ⁷)		
0	48	48	120	120	1:2,5	1:2,5
6	68	62	127	120	1:1,9	1:1,9
12	130	120	206	192	1:1,6	1:1,6
18	131	124	151	142	1:1,2	1:1,1
24	118	101	120	108	1:1	1:1,1
72	109	92	102	96	1:0,9	1:1
120	81	65	78	63	1:1	1:1
168	189	59	192	52	1:1	1:0,9
216	64	58	66	54	1:1	1:0,9
264	79	41	73	47	1:0,9	1:1,1
312	72	68	68	68	1:0,9	1:1
360	71	69	72	62	1:1	1:0,9
408	70	69	71	70	1:1	1:1
456	64	56	60	58	1:0,9	1:1
504	54	42	52	40	1:1	1:1
552	48	36	50	35	1:1	1:1
600	50	36	56	34	1:1,1	1:0,9
648	2	3	1	3	1:0,5	1:1
696	4	15	4	17	1:1	1:1,1
744	4	4	2	3	1:0,5	1:0,8

mento dos lactobacilos, além de produzirem ácido fórmico que estimulam o crescimento do *L. bulgaricus*. A proporção de 1 lactobacilo: 3 estreptococos na primeira fase e a predominância de lactobacilos a seguir, também foram observadas por DAVIS (1975) e SURAYARACHCHI e FLEET (1981).

Pelos resultados obtidos durante o período de armazenamento, nota-se que o número de microrganismos continuou a aumentar nas primeiras 18 a 24 horas e, a partir desse primeiro dia de armazenamento, as contagens revelaram uma nítida tendência de redução nos números de lactobacilos e de estreptococos.

A relação bastonetes:cocos apresentou uma predominância decrescente de cocos durante as primeiras 24 horas de armazenamento e a partir desse tempo, para os três iogurtes testados, houve uma situação de equilíbrio entre as duas espécies de bactérias láticas, mantendo-se a relação aproximadamente de 1:1.

Comportamento idêntico ao observado neste trabalho, com um crescimento populacional logo após a fabricação diminuindo posteriormente durante a armazenagem também foi relatado por HAMANN e MARTH (1984).

5. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos demonstraram existência de iogurtes comerciais com peso líquido abaixo do declarado na embalagem.
2. Constatou-se existência de iogurtes comerciais colocados à disposição do consumidor, com total ausência de bactérias lácticas vivas.
3. Elevado número de coliformes, tal como 3×10^4 u.f.c./ml e de fungos e leveduras, como 4×10^3 u.f.c./ml foram encontrados em iogurtes adquiridos no comércio de Piracicaba.
4. As culturas mistas ativas nos iogurtes comerciais amostrados compunham-se todas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*.
5. Os lactobacilos isolados apresentaram um poder acidificante bem superior aos estreptococos isolados.
6. Em apenas 25% das associações *L. bulgaricus* - *S. thermophilus*, realizadas nestes trabalho, observou-se produção de ácido superior à soma das produções individuais dos dois microrganismos componentes de cada associação.

7. Um resfriamento rápido do iogurte em banho de gelo, ao final do período de incubação, retardou a pós-acidificação durante o período subsequente de armazenamento a 7°C.

8. Durante o período de armazenamento dos iogurtes a 7°C, após as primeiras 24 horas, há um decréscimo no número de bactérias lácticas vivas.

9. Dentre os três iogurtes testados para o período de armazenamento a 7°C, o iogurte obtido com a cultura mista constituída pelo *Lactobacillus* do iogurte comercial A com o *S. thermophilus* do iogurte D, apresentou uma pós-acidificação mais lenta e acidez final menor, sendo pois a mais recomendada, dentre as testadas neste trabalho, para uma utilização comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCOLAS, J. P., BLOQUEL, R., DIDIENNE, R., REGNIER, J.

Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yohourt. Le Lait, v. 52, n. 561-562, p. 1-23, 1977.

ACCOLAS, J. P., VEAUX, M., AVCLAIR, J.. Etude des interactions entre diverses bactéries lactique thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte crite. Le Lait, v. 51, p. 1-23, 1971.

ALEKSIEVA, V., MIRKOV, M. S.. Contamination of yoghurt with yeasts and moulds and their development in it. Food Science Technology Abstrat, v. 13, p. 292, 1981.

ANTUNES, L. A. F.. Caracterização da flora láctica de leite cru. Campinas, 1985. 117p.. Tese (Doutorado) Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP, 1985.

BAUTISTA, F. S., DANIYVA, R. S., SPECK, M. L..

Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. Journal Dairy Res., v. 33, p. 289-307, 1966.

BOTTAZZI, V. et alli. Continuous production of yogurt cultures and stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by formic acid. Milchwissenschaf, v. 26, n. 4, p. 214-219.

"In: TERRA, N. N. et alli. Estudo do iogurte comercializado em Santa Maria, RS. Revista do Centro de Ciências Rurais, v. 7, n. 3, p. 275-281, 1977.

BOVILLANNE, C., DESMAZEAUD, M. J.. Classement de souches de *Lactobacillus bulgaricus* selon quelques caracteres utilisés en fabrication du yougurt. Sciences de Aliments, v. 1, p. 7-17, 1981.

BRACQUART, P.. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt. Journal of Applied Bacteriology, v. 51, p. 303-305, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II. Métodos Físicos-Químicos, Brasília, 1981a, 1v.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência animal. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produ-

tos de Origem Animal e seus Ingredientes. I. Métodos Microbiológicos. Brasília, 1981b, 1v.

CHAMBA, J. F., BONNAZ, G., BOVRE, P.. Comparisons de diverses méthodes de denombrement de la flore acidifiantes du lait cru. Le Lait, v. 61, p. 555-567, 1981.

COKER, C. J., MARTLEY, F. G.. Selective enumeration of Thermophilic Lactobacilli in association with *Streptococcus thermophilus*. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, v. 17, n. 3, p. 269-272, 1982.

DAVIDSON, C. M., CRONIN, F.. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. Appl. Microbiol., v. 26, p. 439-440, 1973.

DAVIS, J. G., ASHTON, T. R., McCASKILL, M.. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* in yogurts. Dairy Ind., v. 36, n. 10, p. 569-573, 1971.

DAVIS, J. G.. Laboratory control of yogurt. Dairy Ind., v. 35, n. 9, p. 139-144, 1970.

DAVIS, J. G., McLACHLAN, T.. Yogurt in the united Kingdom: chemical and microbiological analysis. Dairy Ind., v. 39, p. 149-157, 177, 1974

- DAVIS, J. G.. The microbiology of yoghurt. In: _____.
Lactic acid bacteria in beverages and foods. Londres:
 Academic Press, 1975, p. 245-263
- DEAK, T.. Nutriente médium suitable for counting and
 isolation of lactic acid bacteria. Konzerv-es Paprikainpar,
 v. 5, p. 167-170, 1973. In: "Food Sci. Technol. Abst.,
 v. 6, n. 12, p. 14, 1974.
- DEMAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E.. A medium for the
 cultivation of lactobacilli. Journal of Applied
Bacteriology, v. 23, p. 130-135, 1960.
- DEMETER, J. K.. Lactobacteriologia Zaragosa, Editorial
 Acribia, 21p, 1969.
- DIAZ, M. C.P., PADRÓN, A. G., MARANTE, R. A.. Development
 of microrganisms of hygienic interest in commercial
 yoghurts. Alimentaria, v. 26, n. 205, p. 51-55, 1989.
- DRIESSEN, R. M., KINGMA, F., STADHOUDERS, J.. Evidence that
Lactobacillus bulgaricus in yogurt is stimulated by carbon
 dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk
Dairy Journal, v. 36, p. 135, 1982a.
- DRIESSEN, R. M., UBBELS, J., STANDHOUDERS, J.. Continuous
 manufacture of yogurt. Biotechnology and Bioengineering,
 v. 19, p. 821, 1982b.
- DUITSCHAEVER, C. J., ARNOTT, D. R., BULLOCK, D. H. Quality
 evaluation of yoghurt produced commercially in Ontário.
J. Milk Food Tecnol., v. 35, p. 173-175, 1972.

- ELLIKER, P. R., ANDERSON, A. W., HANESSON, O.. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy Sci, v. 39, p. 1611-1612, 1956.
- EVANS, J. B., NIVEN Jr., C. F.: Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. J. Bacteriol., v. 62, p. 599-603 , 1951.
- FERREIRA, C. L. L. F., CHAVES, J. B. P.. Caracterização do iogurte comercializado na zona da Mata, Minas Gerais. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, v. 36, n. 218, p. 27-32, 1981.
- FERREIRA, C. L. L. F.. Elementos composicionais e aspectos nutritivos do leite e iogurte. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes. v. 13, n. 200, p. 13-15, 1978.
- GALESLOOT, TH. E., HASSING, F., VERINGA, H. A. Symbiosis in yoghurt (1). Stimulation of *L. bulgaricus* by a factor produced by *S. thermophilus*. Neth. Milk & Dairy Journal, v. 22, p. 50-63, 1968.
- GARCIA, A. M.; FERNANDEZ, G. S.. Contaminating mycoflora in yoghurt: general aspects and special reference to the genus *Penicillium*. Journal of Food Protection, v. 47, n. 8, p. 629-636, 1984.
- GARCIA, S.. Isolamento e seleção de culturas lácticas para fabricação de queijos. Campinas, 1984, 89p.. Tese (Mes-

trado) Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP, 1984.

GARCIA, S., OLIVEIRA, J. S.. Isolamento e caracterização de culturas lácticas. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, v. 40, n. 239, p. 19-30, 1985.

GINSLOV, B. O.. Modern trends in yogurt manufacture. S. Afr. J. Dairy Technol., v. 2, p. 79-83, 1970.

GOEL, M. C., KULSHRESTHA, D. C., MARTH, E. H., FRANCIS, D. W., BRADSHAW, J. G., READ, R. B.. Fate of coliforms in yogurt, buttermilk, sour cream, and cottage cheese during refrigerated storage. Journal Milk Food Technology, v. 34, p. 54, 1971.

GREEN, M. D., IBE, S. N., 1987. Yeasts as primary contaminants in yogurts produced commercially in Lagos Nigéria. Journal Food Protection, v. 50, n. 3, p. 193-198, 1987.

HAMANN, W. T., MARTH, E. H.. Comparison of four differential and two general prupose media to enumerate *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Milchwissenschaff, v. 39, p. 147, 1984a.

HAMANN, W. T., MARTH, E. H.. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. Journal of Food Protection, v. 47, nº 10, p. 781-786, 1984b.

HAMDAM, I. Y., KUNSMAN, J. E., DEANE, D. D.. Acetaldehyde production by combined yogurt cultures. Journal Dairy Science, v. 54, p. 1080-1082, 1971.

HARRIGAN, W. F., McCANCE, M. E.. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London: Academic Press, 1976. 452p..

HULL, R. R., ROBERTS, A. V., MAYES, J. J.. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. The Australian Journal of Dairy Technology, v. 39, n. 4, p. 164-166, 1984.

HUMPHREYS, C. L., PLUNKETT, M.. Yogurt: a review of its manufacture. Dairy Science Abstr., v. 31, p. 607-622, 1969.

JACQMAIN-GOLDSMIT, E., DARAS-LHOIR, G.. A rapid method for differential enumeration of lactic acid bacteria in yoghurt. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, v. 39, n. 1, p. 9-11, 1984.

JOHNS, F. E., GORDON, J. F., SHAPTON, N.. The Separation from yoghurt cultures of lactobacilli and streptococci using reinforced clostridium agar at pH 5.5 and plate count agar incorporating milk. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 31, p. 209-212, 1978.

JORDANO, R., MARTINEZ, P., GARRIDO, M. D., JODRAL, M.. Changes of acidity and pH in commercial yoghurt. Alimentaria, v. 25, n. 189, p. 61-64, 1988.

- KROGER, M.. Quality of yogurt. J. Dairy Science, v. 59, p. 344-350, 1976.
- KROGER, M., WEAVER, J. C.. Confusion about yogurt compositional and otherwise. Journal Milk Food Technology, v. 36, p. 388-391. 1973.
- KURMANN, J. A.. Os fatores biológicos e técnicos da fabricação do iogurte. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 4, 1977. Anais... 1977, p. 74-84.
- LABRAPOULOS, A. E., COLLINS, W. F., STONE, W. K.. Starter culture effects on yogurt fermentation. Cultured Dairy Products Journal, v. 26, p. 359, 1982.
- LEE, S. Y., VEDAMUTHU, E. R., WASHAM, C. J., REINBOLD, G. W.. An agar medium for the differential enumeration yogurt starter bacteria. Journal Milk Food Technology, v. 37, n. 5, p. 272-276. 1974.
- LUCK, H., MOSTERT, J. F.. Pasteurisation of fermented milk products. S. Afr. Journal Dairy Technol., v. 3, n. 2, p. 75-80, 1971.
- MARTH, E. R.. Standard methods for the examination of dairy products. Washington: American Public Health Association, D. C., 1978, 416p..
- MARTINS, J. F. P., LUCHESE, R. H.. Acidificação no processamento e no armazenamento como parâmetros para a seleção de associações de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*

bulgaricus para o processamento de iogurte. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, v. 43, n. 255, p. 32-34, 1988a.

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

MATALON, M. E., SANDINE, W. F.. Improved media for differentiation of rods and cocci in yogurt. Journal of Dairy Science, v. 69, n. 10, p. 2569-2576, 1986.

MEILKEJOHN, P. G.. How to achieve better yoghurt viscosity. Cultured Dairy Products Journal, v. 12, p. 5-7. 1977.

MERMLSTEIN, N. H.. Advanced bulk starter medium improves fermentation processes. Food Technology, v. 36, n. 8, p. 69, 1982.

MINOR, T. E., MARTH, E. R.. Fate of *Staphylococcus aureus* in cultured buttermilk, sour cream, and yogurt during storage. Journal Milk Food Technology, v. 35, p. 302, 1972.

MOCQUOT, O., HUREL, C.. The selection and use of some micro-organisms for the manufacture of fermented and acidified milk products. Soc. Dairy Technol. Journal, v. 23, p. 130-146, 1970.

- MOON, N. J., REINBOLD, G. W.. Commensalism and competition in mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Journal Milk Food Technology, v. 39, p. 337-341, 1976.
- MOON, N. J., REINBOLD, G. W., HAMMOND, E. G.. Acid production of mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* as an indicator of growth at 37, 21 and 14°C. Journal Dairy Science, v. 58, p. 787, 1975.
- MORAES, J. M., PASSOS, L. A. S.. Isolamento de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* a partir de iogurte de mercado. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 34, n. 206, p. 15-17, 1979.
- OTTOGALLI, G., GALLI, A.. A differential medium for *Streptococcus thermophilus* in dairy products. In: "International Dairy Congress", 20, 1978. Anais... 1978, p. 350.
- PETTE, J. W., LOLKEMA, H.. Factors influencing the proportion of streptococci and lactobacilli in a yogurt culture. Netherland Milk Dairy Journal, v. 5, p. 14-26, 1951.
- PETTE, J. W., LOLKEMA, H.. Yogurt II Growth Stimulating factors for *S. thermophilus* milk. Dairy Journal, v. 4, p. 209, 1950a.
- PETTE, J. W., LOLKEMA, H.. Yogurt IV. Het even wick der bacteriessorten in yoghurt. Netherland Milk Dairy Journal, v. 5, p. 14-26, 1950b.

- PETTE, J. W., LOLKEMA, H.. Yoghurt I. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairy Journal, v, 4, p. 197, 1950c.
- PETTE, J. W., LOLKEMA, H.. Yogurt III. Zuurvorming en aromavorming in yoghurt. Neth Milk. Dairy Journal, v. 5, p. 14-26, 1950d.
- PORUBCAN, R. S., SELLARS, R. L.. An agar medium for the differentiation of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Journal Dairy Science, v. 56, p. 634, 1973.
- PREIXENS, S., SANCHO, J.. Development of coliforms in natural yoghurt. Alimentaria, v. 187, p. 33-37, 1987.
- RADKE-MITCHELL, L. C., SANDINE, W. E.. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: "a review. Journal Food Protection, v. 47, p. 245, 1984.
- RADKE-MITCHELL, L. C., SANDINE, W. E.. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Dairy Science, v. 69, n. 10, p. 2558-2568, 1986.
- RASIC, J. L., KURMANN, J. A.. Yogurt Scientific grounds technology, manufacture an preparation. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978.

RASIC, J., MITIC, S.. Contribution a l'étude de l'activite antibiotique des souches de culture de yoghurt.

Le Lait, v. 43, p. 489, 1963.

RICHMOND, M. L., CHANDAN, R. C., STINE, C. M.. Yogurt - a compositional survey in the greater lansing area.

Journal of Food Protection, v. 42, nº 5, p. 424-426.
1979.

ROBINSON, K. R., TAMINE, A. Y.. Quality appraisal of yoghurt. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 29, n. 3, p. 148-155, 1976.

ROGOSA, M., MITCHELL, J. A., WISEMAN, R. F.. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. Journal Bacteriology, v. 62, p. 132-133, 1951.

ROHM, H., LECHNER, F., LEHNER, M.. Microflora of austrian natural-set yogurt. Journal of Food Protection, v. 53, n. 6, p. 478-480, 1990.

SALINAS, J. R.. Development of essential microflora of commercial yoghurt during storage. Archivos de Zootecnia v. 33, n. 127, p. 237-248, 1984a.

SALINAS, J. R.. Yoghurt contamination with yeasts and moulds. Archivos de Zootécnia, v. 33, n. 125, p. 97-103, 1984b.

SALJI, J. P., ISMAIL, A. A.. Effect of initial acidity of plain yoghurt on acidity changes during refrigerated

- torage. Journal of Food Science, v. 48, n. 1, p. 258-259, 1983.
- SANDINE, W. E., MATALON, M. E.. *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e yogurt: a review. Cultured Dairy Products Journal, p. 6-12, 1986.
- SELLARS; R. L., BABEL, F. J.. Cultures for the manufacture of dairy products. Chr. Hansen's Laboratory, Inc. Milwaukee, Wis. 1970.
- SHANKAR, P. A., DAVIES, F. L. . Proteinase and peptidase activities of yogurt starter bacteria. in: INTL. DAIRY CONGR., 20 th, 1978, Paris. Anais... 1978, E. 1467.
- SHANKAR, P. A., DAVIES, F. L.. A Note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing β . glycerophosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. Journal of the Society of Dairy Technology, v. 30, n. 1, p. 28-30, 1977a.
- SHANKAR, P. A., DAVIES, F. L.. Aminoacid and peptide utilization by *S. thermophilus* in relations to yogurt manufacture. Journal Applied Bacteriology, v. 43, p. 8, 1977b.
- SILVA, J. C.. Leites fermentados: iogurte e acidófilo. Revista do Instituto de Laticínios CAndido Tostes, v. 29, n. 174-175, p. 70-81, 1974.
- SINGH, J.. Inhibition of growth of spoilage microrganisms by *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in cow, buffalo and

goat milk. Journal Food Protection, v. 46, p. 497, 1983.

SINGH, J., SHARMA, D. K.. Yoghurt starters in skim milks.

1. acid and flavour production and proteolytic activity by yoghurt starters. Cultured Dairy Products Journal, v. 2, p. 22-25, 1982.

SINHA, R. P., MODLER, H. W., EMMONS, D. B., Changes in acidity and starter bacteria in commercial yogurts during storage. Cultured Dairy Products Journal, v. 24, n. 2, p. 12-14, 16, 1989.

SOULIDES, D. A.. Lactose fermenting yeasts in yogurt and their effect upon the product and the bacterial flora. Appl. Microbiol, v. 4, p. 274-276, 1986.

SPECK, M. L.. Compendium methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association Washington, D. C., 1976, 702 p.

STOCKLIN, P.. Production and handling of yogurt on a commercial scale. Cultured Dairy Prod. J., v. 4, n. 3, p. 6-10, 1969.

SURIYARACHCHI, V. R., FLEET, G. H.. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. Applied and Environmental Microbiology, v. 412, n. 3, p. 574-579, 1981.

TAMINE, A. Y., DAVIES, G., HAMILTON, M. P.. The quality of yoghurt on retail sale in arshire. Part 1. Chemical and microbiological evaluation. Dairy Industries International

v. 52, n. 6, p. 19-21, 1987.

TAMINE, A. Y., DEETH, H. C.. Yoghurt: Technology and biochemistry. Journal Food Protection, v. 43, p. 939-977, 1980.

TERGAZHI, B. E., SANDINE, W. E.. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology, v. 29, p. 807-813, 1975.

TERRA, N. N., MUSSOI, E., BRUM, M. A.. Estudo do iogurte comercializado em Santa Maria, RS. Revista do Centro de Ciências Rurais, v. 7, n. 3, p. 275-281, 1977.

VERINGA, H. A., GALESLOOT, T. E., DAVELAAR, H.. Symbiosis in yoghurt (II). Isolation and identification of a growth factor *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth Milk & Dairy J., v. 22, p. 114-120, 1968.

VIEIRA, S. D. A.. A utilização de culturas lácticas na indústria de laticínios. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, v. 35, n. 215, p. 29-36, 1981.

WELKER, A. L., Importance of monitoring acid development in swiss-style yogurt. Cultured Dairy Products Journal, p. 23-26, 1986.

YAZICIOGLU, A., YILMAZ, N.. Studies on the microflora of yoghurt and its antimicrobial action. Dairy Science Abstr., v. 28, p. 252, 1966.