



UNICEPLAC

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ELLEN CRISTINA DA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP.
BULGARICUS E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* NO IOGURTE**

ELLEN CRISTINA DA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP.
BULGARICUS E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* NO IOGURTE**


Trabalho de Conclusão de Curso para avaliação no
componente curricular TCC II, Centro Universitário do
Planalto Central Aparecido dos Santos, na área de
Inspeção de produtos de origem animal
Orientador: Prof^ª Dr^ª Stefania Marcia de Oliveira Souza

ELLEN CRISTINA DA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP.
BULGARICUS E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* NO IOGURTE**

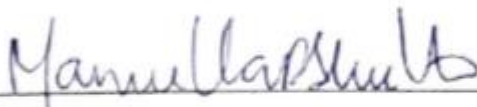
Trabalho de Conclusão de Curso para avaliação no componente curricular TCC II, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, na área de Inspeção de produtos de origem animal, aprovado em 13/06/2019.

Banca Examinadora:



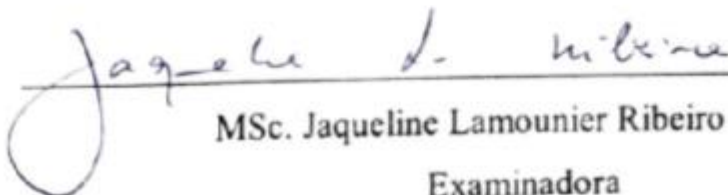
Prof. Dra. Stefania Marcia de Oliveira Souza - UNICEPLAC

Orientadora



Prof. MSc. Manuella Rodrigues de Souza Mello – UNICEPLAC

Examinadora



MSc. Jaqueline Lamounier Ribeiro – UnB

Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que até aqui foi minha base e sustentação, para seguir firme. Que a Ele seja dada toda honra e toda glória.

Aos meus pais Eva e Jair que foram meus maiores apoiadores, meu alicerce em toda a caminhada. Sou grata por todo esforço e sacrifício feito para me proporcionarem a chance de viver um sonho, sempre cuidando de mim com todo carinho e dedicação.

A minha orientadora, Prof^a Stefania Marcia de Oliveira Souza, pela paciência e imprescindível orientação acadêmica.

Ao meu noivo João Gabriel, por todo apoio e paciência quando surgia o estresse, por todo cuidado e carinho.

A minha família, por todo incentivo e cooperação.

Aos meus amigos, Ingridi, Thereza, Rafaela, Mateus, Larissa e Hercliton por toda compreensão e afago durante todo o caminho percorrido, pelas tristezas e desesperos compartilhados, pelas alegrias acrescentadas. Eterna gratidão por vocês.

A todos os mestres da UNICEPLAC, muito obrigada por contribuírem com minha formação acadêmica.

A Wendy, por toda atenção e apoio no laboratório, sempre disposta a ajudar com todo carinho e paciência.

Expresso ainda, meus sinceros agradecimentos aos diversos colaboradores, especialmente a toda equipe do HOVET-UNICEPLAC, representada pelas médicas veterinárias Dra. Rebeka Coelho e Dra. Carolina Rezende.

“Porquanto somente Eu conheço os planos que determinei a vosso respeito, declara Yahweh, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dor prejuízo, planos para dar-vos esperança e um futuro melhor”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colônias de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> em iogurte de polpa sabor morango.....	6
Figura 2 - Colônias de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> em iogurte natural.....	6
Figura 3 - Microscopia óptica de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	7

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagens de UFC/mL de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	5
---	---

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. COLETA DE AMOSTRAS	4
2.2. ANÁLISE DE <i>LACTOBACILLUS</i> <i>DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS</i> E <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	4
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	4
4. CONCLUSÕES	10
5. REFERÊNCIAS	11

AValiação DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SUBSP. *BULGARICUS* E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* NO IOGURTE

**ELLEN CRISTINA DA COSTA SANTOS¹
STEFANIA MARCIA DE OLIVEIRA SOUZA²**

¹- Graduanda em Medicina Veterinária no Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama-DF

²- Professora Dr^a em Medicina Veterinária no Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama-DF

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em iogurte natural e iogurte polpa sabor morango, uma vez que a viabilidade dessas bactérias é indicadora de qualidade microbiológica do produto. Os resultados encontrados do iogurte polpa sabor morango e iogurte natural foram satisfatórios, uma vez que os valores obtidos estão acima dos exigidos pela legislação brasileira. Exceto os resultados obtidos do iogurte natural em três períodos, os quais não obtiveram valores satisfatórios. Foram realizadas cinco análises durante o período de validade dos iogurtes onde a primeira amostra (dia 0) do iogurte de polpa apresentou contagem de UFC/mL de $2,8 \times 10^8$ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e $2,5 \times 10^8$ *Streptococcus thermophilus*, e a primeira amostra de iogurte natural apresentou contagens abaixo no exigido, sendo, $1,5 \times 10^3$ para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 2×10^3 para *Streptococcus thermophilus*. No respectivos D5, D10 e D20 não houve crescimento do *Streptococcus thermophilus* e aparecimento colônias fúngicas. Também foi realizada uma análise onde o produto já apresentava prazo de validade excedido, onde ambos obtiveram valores acima do exigido.

Conclui-se que as reações antagônicas entre microrganismos como bactérias e fungos podem interferir no desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus*, além das alterações de fatores intrínsecos ao meio, tais como pH também pode influenciar no desenvolvimento deste.

Palavras chave: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, bactéria ácido láctica.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos assumem papel positivo no mercado alimentício, devido ao crescente aumento no seu consumo pela população nacional e internacional, fazendo com que cresça a preocupação em desenvolver estudos para a melhoria de sua qualidade (SOARES *et al.*, 2011).

A procura e o consumo deste produto vêm aumentando a cada ano e o desenvolvimento do mercado é proporcionado pelas características organolépticas agradáveis do produto combinado a propriedades nutricionais advindas do consumo de iogurte. O sabor, a textura e o aroma desse alimento se devem ao metabolismo microbiano, sendo considerado microbiologicamente seguro (FORSYTHE, 2002; ROCHA *et al.*, 2005). Os variados sabores do iogurte possibilitam o seu consumo pelas pessoas que não apreciam o paladar do leite (COELHO e ROCHA, 2000).

A origem do iogurte ainda não é bem definida, mas estima-se que veio do Oriente Médio ou da Índia. Os nômades, ao armazenar o leite sempre nos mesmos recipientes, foram selecionando uma microbiota que fermentava o leite e produzia um alimento de sabor agradável (ORDÓÑEZ PEREDA *et al.*, 2005).

Os leites fermentados em geral, são importantes para a nutrição humana, porque apresentam melhor digestibilidade do que o leite. Isso se dá pelo fato de seus constituintes já serem pré-digeridos devido ao processo fermentativo ao qual são submetidos em seu processamento. Além disso, apresentam conteúdo reduzido de lactose, importante para a população intolerante; aumentam a absorção de ferro; aumentam o conteúdo de algumas vitaminas tipo B; controlam a composição da microbiota intestinal; inibem a multiplicação de microrganismos patogênicos no trato intestinal e ainda diminuem o nível de colesterol no sangue quando consumido regularmente (REIS, 2013).

Leites fermentados são produtos lácteos ou produtos lácteos compostos obtidos por meio da coagulação e da diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por meio da fermentação láctea, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, com adição ou não de outros produtos lácteos ou de substâncias alimentícias. Os microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade, conforme disposto em normas complementares. São considerados leites fermentados o iogurte, o leite fermentado ou cultivado, o leite acidófilo ou acidofilado, o kumys, o kefir e a coalhada (BRASIL, 2017)

Produzido através de leite fermentado por bactérias, usualmente *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, o iogurte possui uma consistência que o

diferencia de outros produtos derivados de laticínios. Contém todos os constituintes nutricionais do leite, com exceção da lactose, reduzida durante a fermentação, revelando-se vantajoso para quem não digere bem o leite (SILVA, 2007). Para o iogurte, deve ser utilizada uma associação das culturas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, podendo ser acompanhadas por outras bactérias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* ou cultivos do gênero *Bifidobacterium* (ALMEIDA, 2015).

Streptococcus thermophilus são cocos de menos de 1µm de diâmetro, que formam cadeias, Gram positivos, microaerófilos, produzem L- lactato, acetaldeído e diacetil (a partir da lactose no leite), e algumas cepas produzem exopolissacarídeos. Para isso, requerem vitaminas do grupo B e alguns aminoácidos como estimulantes de multiplicação, além de uma temperatura ótima de 37°C, mas a maior parte das cepas se multiplica a 50°C e são termodúricos, que sobrevivem à pasteurização (DUWAT *et al.*, 2001; ORDÓÑEZ-PEREIRA *et al.*, 2005).

O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, são bacilares, gram positivos, aparecem em cadeias curtas ou de forma individualizada, produzem D-lactato e acetaldeído a partir da lactose do leite, com relação a temperatura, se multiplicam muito devagar abaixo de 10°C, sendo que a maioria das cepas pode multiplicar entre 50°C e 55°C (DUWAT *et al.*, 2001; ORDÓÑEZ-PEREDA *et al.*, 2005).

As culturas lácticas utilizam o leite como nicho ecológico e existe uma relação simbiótica entre dois microrganismos, na qual cada um deles estimula a multiplicação do outro. Os *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* liberam aminoácidos e peptídeos das proteínas do leite, o que possibilita a multiplicação de *Streptococcus thermophilus* nos primeiros estágios da fermentação. O *Streptococcus thermophilus*, por sua vez, produz ácido fórmico, o qual estimula a multiplicação de *Lactobacillus bulgaricus*, diminuindo o tempo de fermentação e conferindo ao produto características peculiares (MARAFON, 2010).

Durante a fermentação, a proteína, a gordura e a lactose do leite sofrem hidrólise parcial, tornando o produto facilmente digerível, sendo considerado agente regulador das funções digestivas (MANZANARES, 1996). Outras propriedades também se relacionam aos iogurtes, como os efeitos anticolesterolêmicos, anticarcinogênicos, inibitórios de agentes patogênicos, entre outros (PERDIGON *et al.*, 1995). Estudos têm mostrado que bactérias do iogurte sobrevivem bem no produto durante o prazo de validade comercial (SILVA, 2007).

A relação de simbiose, existente entre dois microrganismos durante o processo fermentativo de produção do iogurte, é assim denominada por não existir dependência entre eles para a sua sobrevivência. Entretanto, essas bactérias produzem mais ácido láctico na forma

de cultura mista, ou seja, em simbiose, do que quando utilizadas como culturas isoladas (THAMER e PENA, 2006). Até este momento, a relação é de simbiose, a partir disto começa a antibiose, quando uma grande quantidade de ácido láctico é acumulada no meio e o pH excessivamente reduzido, começa a inibir o desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus*. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, por ser mais resistente a acidez, aumenta em número e predomina sobre o desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus*. Em pH de 4,3, a multiplicação das duas bactérias passa a ser inibido (FERREIRA, 2005).

É de extrema importância que exista um balanço adequado entre as contagens de *Streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A predominância de qualquer uma das espécies pode acarretar em defeitos para o produto final (REIS, 2013). Para obter um produto de alta qualidade durante seu prazo de validade comercial, são indispensáveis algumas condições de processamento, fatores como higiene rigorosa, controle de contaminações cruzadas, qualidade dos ingredientes utilizados, cuidados no envase, estocagem e distribuição devem fazer parte da rotina da fábrica (SANTOS, 2002). Sendo monitorados e controlados os parâmetros de processo, pode-se determinar o final do tempo de prazo de validade comercial, ou seja, o momento em que o produto não é próprio para o consumo (SIVIERI e OLIVEIRA, 2002).

Diversas autoridades reguladoras ao redor do mundo têm demonstrado crescente preocupação com a viabilidade dos microrganismos presentes em produtos lácteos e probióticos, que devem possuir um número de microrganismos iniciadores suficientemente alto para garantir benefícios ao consumidor. Na Hungria, Japão, Suíça e Espanha, as regulamentações alimentares estipulam que os leites fermentados e probióticos devem, ao final do seu prazo de validade, apresentar contagens de microrganismos iniciadores em torno de 10^7 UFC/g de produto (JAY, 2005). No Brasil, a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, adota o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, a qual estabelece que a contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) deve seguir a Norma FIL 117A: 1988, em que é exigido um mínimo de 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007).

Diante disto, a presente pesquisa buscou averiguar a viabilidade dos microrganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, visando verificar se a quantidade de células bacterianas está em conformação com o exigido pela legislação vigente para iogurtes durante o prazo de validade estabelecido pela indústria laticinista. Além disso, foi realizada uma análise quantitativa, comparando a relação de microrganismos presentes em iogurte natural e iogurte polpa sabor morango.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram adquiridos um iogurte natural da marca A e um iogurte polpa sabor morango da marca B, obtidos em estabelecimentos comerciais da região administrativa do Gama – DF, sendo estes submetidos a fiscalização. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo, e enviadas ao laboratório de microbiologia da UNICEPLAC para realização das análises. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração a 7°C.

No período de março a abril de 2019, cada amostra foi analisada nos períodos de 0 (dia da aquisição), 5, 10, 15, 20 e 30 dias de estocagem. Para avaliação em diferentes períodos os Iogurtes foram alicotados em porção de 10 mL, transferidos para recipientes de vidro previamente esterelizados e mantidos sob temperatura de geladeira (7°C) até o momento da análise.

2.1 – ANÁLISE DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS* E *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

A enumeração de bactérias ácido lácticas, foi baseada no protocolo descrito por Nero *et al.* (2006) e Ortolani *et al.* (2007) com alterações. Foram preparadas diluições decimais seriadas de iogurte natural integral e iogurte de polpa sabor morango em solução salina 0,85% até 10^{-4} . A partir de duas diluições selecionadas (10^{-3} a 10^{-4}), foram inoculados 0,1 mL em ágar MRS para o desenvolvimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (WEHR e FRANK, 2004) e em ágar M17 para o desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus* (TOLDI *et al.*, 2014) em diferentes prazos de acondicionamento sendo eles D0, D5, D10, D15, D20 e D30. As placas de petri foram acondicionadas em jarras de anaerobiose e incubadas a 35°C por 48 horas. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). As bactérias ácido lácticas (BAL's) foram classificadas de acordo com a coloração de Gram e produção de catalase, em todos os períodos de análise, a fim de se identificar características típicas de BAL's.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* nos diferentes períodos avaliados estão demonstrados na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados dos valores obtidos na contagem de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

DILUIÇÃO DIA	IOGURTE DE POLPA			IOGURTE NATURAL		
	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bactérias ácido lácticas totais	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bactérias ácido lácticas totais
10 ³						
D0	2,8x10 ⁸	2,5x10 ⁸	5,3x10 ¹⁶	1,5x10 ³	2x10 ³	3,5x10 ⁶
D5	3,1x10 ⁸	3,1x10 ⁸	6,2x10 ¹⁶	1,4x10 ⁸	-	1,4x10 ⁸
D10	3,4x10 ⁸	3,6x10 ⁸	7x10 ¹⁶	-	-	-
D15	3,6x10 ⁸	3,3x10 ⁸	6,9x10 ¹⁶	1,3x10 ⁸	1,9x10 ⁸	3,2x10 ¹⁶
D20	4,7x10 ⁸	4,9x10 ⁸	9,6x10 ¹⁶	1,7x10 ⁴	-	1,7x10 ⁴
D30	3,7x10 ⁸	3,6x10 ⁸	7,3x10 ¹⁶	6,4x10 ⁴	6,5x10 ⁴	1,29x10 ⁹

* Valor mínimo de contagens de bactérias ácido lácticas totais em leites fermentados - 1x10⁷ (BRASIL, 2007).

Ambos apresentaram valores satisfatórios, dentro do padrão exigido pela legislação, com exceção do iogurte natural que em três períodos, apresentaram valores insatisfatórios nas contagens das UFC's, onde a soma dos microrganismos avaliados não ultrapassou o valor mínimo exigido de 1x10⁷, sendo esses, no D0 (3,5x10⁶), no D10 onde não houve crescimento e no D20 (1,7x10⁴)

O crescimento das BAL's no iogurte de polpa sabor morango foi satisfatório, apresentando valores acima do padrão estabelecido em todos os dias de armazenamento. No decorrer dos dias de armazenamento houve um aumento gradativo da quantidade UFC/mL de ambos os microrganismos, onde foi observado um maior crescimento no Ágar MRS, meio específico para crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Ocorrendo uma pequena diminuição no D30, onde o produto já estava com o prazo de validade excedido, mas ainda assim apresentando valores acima do exigido.

Já para as amostras de iogurte natural foi observado grandes variações de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e principalmente de *Streptococcus thermophilus*. Em relação ao *Streptococcus thermophilus* não foi observado crescimento de colônias no D5, D10 e D20 de armazenamento sob refrigeração. Já em relação ao *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*,

também não foi observado crescimento no D10. No D30 o produto já não estava dentro do prazo de validade, mas mesmo assim apresentou os valores dentro dos padrões.

É importante ressaltar que no D5, D10 e D20 onde não houve crescimento de *Streptococcus thermophilus*, colônias fúngicas surgiram no meio. O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* não teve desenvolvimento somente no D10, o que demonstra uma maior resistência a competição entre microrganismos por parte deste.

A Figura 1 demonstra o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* do iogurte de polpa morango no D0, utilizando a diluição de 10^{-3} e Figura 2 no iogurte natural, também no D0 com diluição de 10^{-3} .

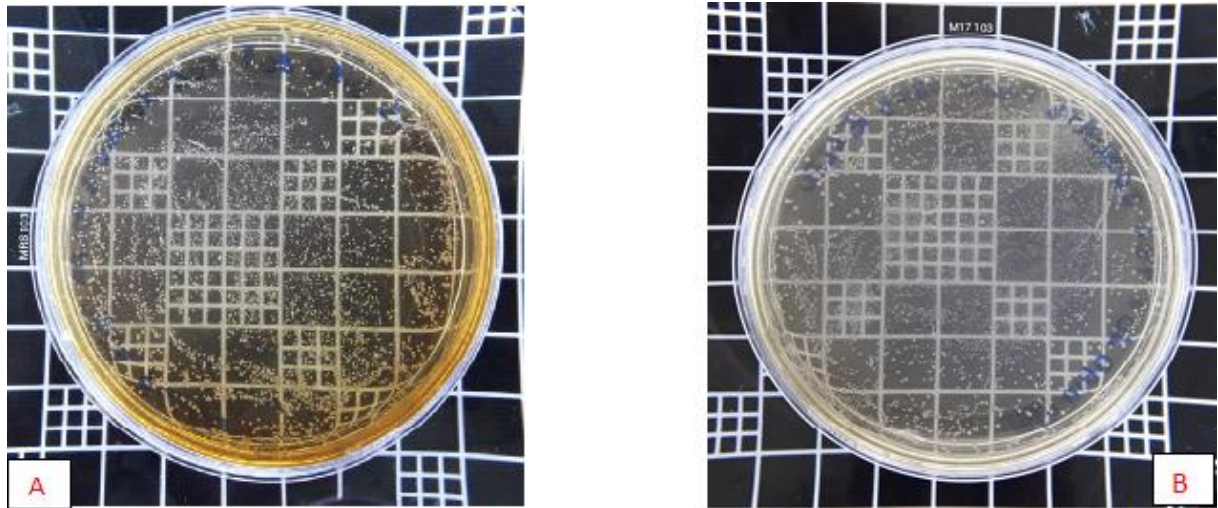


Figura 1. (A) Colônias de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e (B) Colônias de *Streptococcus thermophilus* no D0 em iogurte de polpa sabor morango.

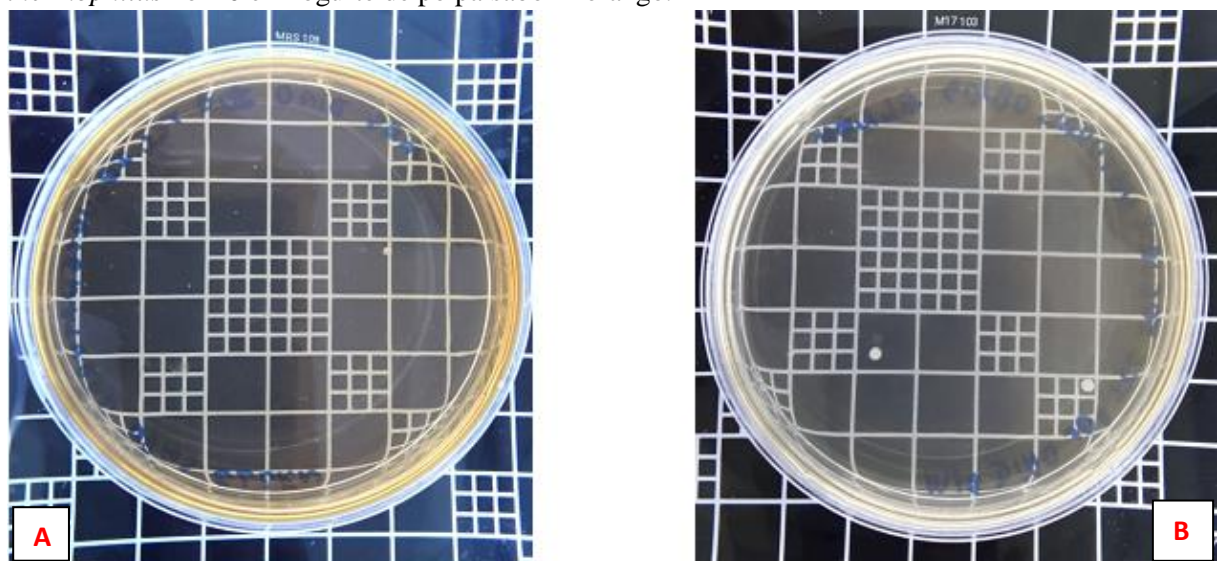


Figura 2. (A) Colônias de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e (B) Colônias de *Streptococcus thermophilus* no D0 em iogurte natural.

Nos testes de catalase e Gram realizados, foi possível confirmar a presença de BAL's, onde ambos são gram positiva, caracterizando assim *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* respectivamente. (FIGURA 3).

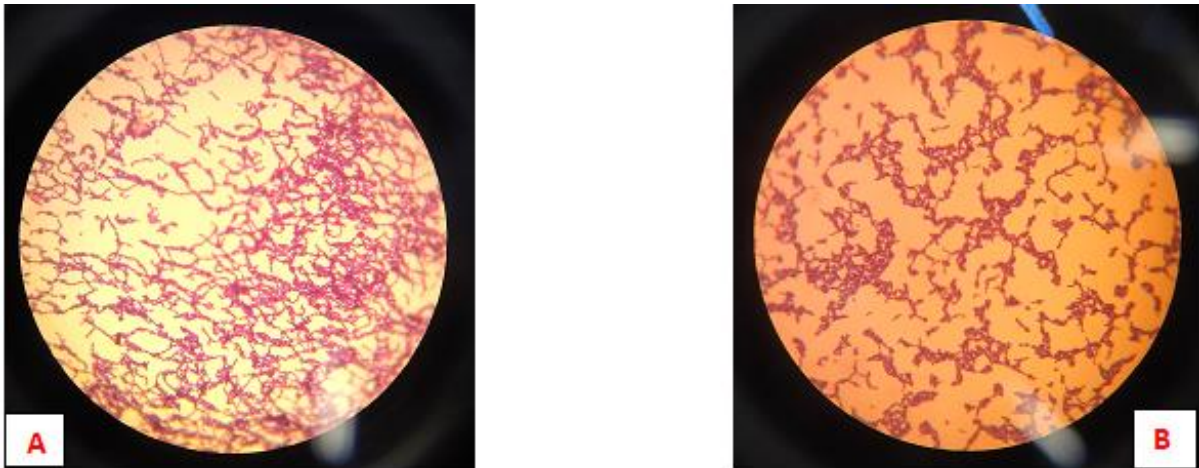


Figura 3. (A) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B) *Streptococcus thermophilus*

Os conhecimentos gerados a respeito da influência de longos períodos de armazenagem após o processamento sobre os iogurtes têm sido extremamente importantes para que se possam obter informações sobre a sua durabilidade, para demonstrar características físicas, químicas ou sensoriais aceitáveis para o consumo e determinar a viabilidade das bactérias lácticas. Em iogurtes recém produzidos o número de microrganismos situa-se aproximadamente em torno de 10^9 UFC/g, embora este valor dependa do fabricante, devendo ser de no mínimo 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007). Entretanto, durante o seu armazenamento, esse número pode baixar para 10^6 UFC/g, principalmente se o iogurte for mantido a 5°C por mais de 60 dias, sendo que, além disso, o número de bastonetes diminui mais rapidamente do que o número de cocos (SALVADOR *et al.*, 2004).

Segundo Penna e Thamer (2005), *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* exibem uma relação denominada protocooperação, durante a produção da bebida, já que não existe dependência entre os dois para a sua sobrevivência. Essas bactérias produzem mais ácido na forma de cultura mista do que ao serem utilizadas como culturas isoladas. Em estudo variando a concentração de soro, açúcar e frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas, o autor obteve contagens na ordem de 10^{12} UFC/mL⁻¹. Cabe ressaltar, que em todas as formulações apresentadas no trabalho de Penna (2005) foi adicionado estabilizante.

Em um estudo realizado por Soares *et al.*, (2011) onde foi desenvolvido um iogurte natural com aproveitamento de soro de queijo coalho, a contagem de bactérias lácticas de iogurtes com 8% e 10% de leite em pó no primeiro dia foi, para ambas as formulações, de $5,6 \times 10^9$ UFC/g. No 28º dia de armazenagem, as contagens de bactérias lácteas foram de

$8,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$ UFC/g nos iogurtes com 8% e 10% de leite em pó, respectivamente. Algumas cepas probióticas mostram sensibilidade à acidez, e este problema é agravado pela pós-acidificação no armazenamento, promovido pela β -galactosidase (THAMER E PENNA, 2005). Este aspecto pode ser observado no trabalho de Soares (2011), onde a acidez média aumentou e o pH diminuiu nos dois tipos de iogurte durante a estocagem. Na presente pesquisa também foi observado uma redução nas contagens do *Streptococcus thermophilus*, sugerindo que a acidificação do meio durante o tempo de armazenagem também pode ter influenciado no desenvolvimento de colônias.

Os resultados obtidos por Hussain *et al.*, (2009), observaram população média de bactérias lácticas de $4,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ em amostras de iogurte comerciais. Analisaram a viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes comerciais e encontraram população superior a 10^8 UFC.g⁻¹. O mesmo justifica os valores encontrados devido ao protocolo de cultivo bacteriano ter sido desenvolvido sob condições adequadas, possibilitando assim uma fermentação favorável para fabricação, pois quando a mesma é feita de forma apropriada influencia diretamente em um desenvolvimento satisfatório das bactérias ácido lácticas.

Em estudo conduzido por Dave & Shah (1997) foi investigada a viabilidade de *S. thermophilus* e *L. Delbrueckii subsp. bulgaricus* durante seu prazo de validade comercial de iogurtes elaborados a partir de culturas comerciais, onde foi adicionado cisteína posteriormente. Após, cinco dias de armazenamento as populações de ambas as bactérias apresentaram declínio. O que pode se sugerir tal resultado é pela da cisteína a qual foi acrescentada, em que o pH varia entre 5,0 a 9,0. O que pode ter proporcionado um meio com o pH no qual não é favorável para o desenvolvimento para nenhum dos dois microrganismos, sendo o pH de predileção para de desenvolvimento em torno de 4,5.

O fato do iogurte de polpa sabor morango ter apresentado valores acima da média, pode se justificar pelo acréscimo de ingredientes como o açúcar, que de acordo com Buchta (1983) os açúcares representam as melhores fontes de carbono para as bactérias lácticas. E também pelo acréscimo de morango, o qual é uma fonte rica em nutrientes.

Já em relação ao iogurte natural, o qual apresentou diversas variações e teve aparecimento de fungos pode se explicar devido a uma relações antagônicas, as quais segundo Oliva *et al.*, (1990) são travadas entre leveduras e bactérias no ambiente fermentativo e a produção de ácidos orgânicos por estas duas espécies desempenham papel relevante: enquanto a levedura, produzindo ácido succínico exerce uma repressão sobre o crescimento bacteriano, as bactérias por sua vez, produzindo ácido lático e acético igualmente afetam o desempenho da levedura.

Os valores de pH implicam ainda na atividade metabólica das bactérias, o que pode favorecer um grupo de microrganismos em detrimento do outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* crescem e toleram pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus thermophilus* (MOREIRA *et al.*, 1999).

Quando ambos os microrganismos estão crescendo juntos em um meio definido, onde o crescimento da levedura é restrito por concentrações de vitaminas, uma substância em falta (como ácido nicotínico, adenina, guanina, ácido aspártico, triptofano, glicina, alanina ou lisina) essencial para o crescimento de *Lactobacillus spp.* é sintetizada no meio pela célula de levedura. Diversas inter-relações entre leveduras e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* foram anteriormente observadas, e em cada uma delas a levedura parece ser o organismo ativo, ou seja, aquele que sintetiza a substância ausente essencial para o crescimento da bactéria (CHALLINOR e ROSE, 1954). Justificando assim o melhor crescimento do gênero *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e uma deficiência no crescimento do gênero *Streptococcus thermophilus*, devido a uma possível inibição competitiva entre os microrganismos

Segundo Gallina *et al.* (2011), o emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados tem sido amplamente estudado devido às dificuldades de manutenção da viabilidade desses microrganismos ao longo da estocagem refrigerada. Fatores como acidez e oxigênio dissolvido, além de interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem influenciar na sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados.

Os baixos valores de pH favorecem o crescimento de fungos filamentosos e de leveduras que por sua vez lançam compostos nitrogenados no meio durante a sua multiplicação que consequentemente irá provocar um novo aumento do pH (FERREIRA, 2005). Pode assim sugerir que a ausência do *Streptococcus thermophilus* se deu a essa baixa do pH, e seu reaparecimento devido aos compostos liberados pelo fungo no meio, o qual proporcionou o aumento do pH e novamente o desenvolvimento do microrganismo.

Cada espécie de bactéria tem seu tempo próprio de geração este tempo varia de acordo com o ambiente. Bactérias têm a capacidade de habitar diversos lugares. As exigências para desenvolver podem variar de espécie para espécie. Para crescer as bactérias vão precisar de diversos fatores são eles: nutrientes, ambiente, pressão osmótica, pH, etc., (VIEIRA e FERNANDES, 2012).

Alguns microrganismos são capazes de se adaptar e crescer na presença de concentrações danosas e essas mudanças podem alterar tanto propriedades físico-químicas da

membrana celular bacteriana, afetando sua permeabilidade, como a atividade das enzimas de membrana e, conseqüentemente, a viabilidade da célula. A resposta pode depender das condições de adaptação específica impostas durante a fase estacionária com subsequente estresse subletal (FERREIRA *et al.*, 2003).

Estudos têm mostrado que a maior persistência da bactéria em ambiente de processamento está associada a sua constante exposição a condições subletais de fatores estressantes (pH, temperatura, etc.), fato que induz seu desenvolvimento e crescimento condicionado ao estresse, tornando-a fisiologicamente mais tolerante a níveis aumentados do mesmo ou de diferentes fatores estressantes (SOUZA *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que leveduras e bactérias lácticas são muitas vezes encontradas nos mesmos ecossistemas naturais e podem competir pelos mesmos nutrientes. Neste caso, o comportamento dos microrganismos torna-se de difícil compreensão, considerando-se que os parâmetros físico-químicos do meio exercem uma pressão seletiva, permitindo mudanças constantes na sua complexa composição química e microbiológica (KENNES *et al.*, 1991).

Assim justifica-se a inconstância no desenvolvimento de *Streptococcus thermophilus*, o qual após ficar alguns dias sem ocorrer crescimento, podendo estar em latência devido a competição por nutrientes e o baixo pH que favorece o desenvolvimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e o qual os fungos conseguem se adaptar. Logo podendo também, sugerir que devido as relações antagônicas existentes no meio, o fungo não conseguiu se manter viável em todo o tempo de armazenagem, proporcionando assim o reaparecimento do *Streptococcus thermophilus*.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se no presente trabalho que as análises do iogurte de polpa sabor morango e do iogurte natural apresentaram resultados favoráveis durante seu prazo de validade comercial. Apesar disto observa que substratos diferentes tais como os avaliados podem gerar desenvolvimentos diferentes de microrganismos presentes nos iogurtes. Portanto pode-se afirmar que durante a estocagem as relações antagônicas entre os microrganismos podem interferir no desenvolvimento das bactérias ácido lácticas além de ser necessário uma adaptação do microrganismo as variações do meio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, D. M.; PRESTES R. A.; RIBEIRO M. C. O.; PIETROWSKI G. A. M. Determinação do tempo de vida de prateleira de iogurte com de polpa de fruta por meio da população de bactérias lácticas totais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, p. 1671-1681, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. "Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados." **Diário Oficial da União** (2007).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Da classificação dos derivados lácteos, Seção II, Subseção IV. Brasília, 2017.
- BUCHTA, K. Lactic acid. In: REHN, H. J.; REED, G. (Eds.). *Biotechnology*. Florida: Verlag Chemic, 1983. v. 3, cap. 3, p. 409-417.
- CARVALHO, I. **Clientes ignoram risco de má refrigeração**. Disponível em: <http://www.tribunademinas.com.br/especiais/reportagens>. Acesso em: 15 mai. 2018.
- CHALLINOR, S.W.; ROSE, A.H. Interrelationships between a yeast and a bacterium when growing together in defined medium. **Nature, London**, v.174, n. 4436, p.877-878, 1954.
- COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas de processamento de produtos de origem animal**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. p. 32-37.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made with commercial starters cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 8, p. 537-545, 1997.
- DUWAT, P.; SOURICE, S.; CESSÉLIN, B.; LAMBERET, G.; *et al.* Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. **Journal of bacteriology**. v. 183, n. 15, p. 4509-4516, 2001.
- FERREIRA, A.; SUE, D.; O'BYRNE, C. P.; BOOR, K. J. Role of *Listeria monocytogenes* sB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired tolerance response. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, p. 2692-2698, 2003.
- FERREIRA, C. L. L. F. *Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos*. **Caderno Didático**. 3.ed. p. 112. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2002.
- GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. A. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Journal of health sciences**, v. 13, n. 4, 2015.

HUSSAIN, I.; RAHMAN, A.; ATKINSON, N. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, n. 1, p. 9-12, 2009.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed. P. 712. 2005.

KENNES, C.; VEIGA, M.C.; DUBOURGUIER, H.C.; TOUZEL, J.P; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H. NYNS, E.J. Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, v. 54, n.4, p.1046-1051, 1991.

MARAFON, A.P. **Otimização das propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas**. 2010. 84 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

MANZANARES, A. **Lácteos de alto consumo en Latinoamérica**. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, v. 5, p. 31-39, 1996

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras – MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, São Paulo, v. 19, n. 1, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120611999000100027&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 22 de mai de 2019.

NERO, L.A.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; ORTOLANI, M.B.T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B.D.G.M. Comparison of Petrifilm Aerobic Count plates and the ManRugosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 14, p 249-257, 2006.

OLIVA-NETO, P.; **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, p. 200, 1990.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, p. 55-87, 2005.

ORTOLANI, M. B. T.; VIÇOSA, G. M.; BELOTI, V.; NERO, L. A.; Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 387-391, 2007.

PENNA, A. L. B.; THAMER, K. G. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 393-400, 2005.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; VALDEZ, J.C. Acción de bacterias lácticas y yogur sobre la respuesta inmune: Sistémica, de mucosas y tumoral. **Tecnología Láctea Latinoamericana**, n. 2, p. 26-30, 1995

REIS, D. L.; **Qualidade e Inocuidade microbiológica dos derivados lácteos fermentados produzidos no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal na área de Higiene e Inspeção de Leite e derivados) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, p.8-10, 2013.

REIS, S. M.; PINTO, M. S.; BRANDI, I. V. Efeito do teor de sólidos não gordurosos e da concentração de sacarose na acidificação de iogurte por bactérias lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n.378, p.34-39, 2011.

ROCHA, E. M. D.; AGUIAR, S. F. D.; ARAÚJO, V. S. D.; DUARTE, W. K. C.; *et al.* Análise sensorial e estudo de vida de prateleira de sobremesas lácteas à base de frutas tropicais. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 19, n. 135, p. 28-33, 2005.

SALVADOR, A.; FISZMAN, S. M. Textural and sensory characteristics of whole and skimmed flavored set-type yogurt during long storage. **Journal of dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 4033-4041, 2004.

SANTOS, J. A. Tendências de iogurtes: ingredientes que dão um diferencial ao produto. **Revista Leite e Derivados**, v.1, n. 63, p. 48-53, 2002.

SILVA, A. I. D.; PEREIRA, F. J. C.; BEIRÃO, M.C.R.V.; GOMES, M. R. F. S; *et al.* **Faculdade de Engenharia: Produção de iogurte**. Universidade do Porto; Outubro 2010. Disponível em: http://paginas.fe.up.pt/~projfeup/cd_2010_11/files/QUI608_relatorio.pdf. Acesso em: 29 mai. 2018.

SILVA, C. R.; SILVA A. O.; JODAS L.; SANTOS, R. F.; BARBOSA, S. Biotecnologia Aplicada a Produção de Alimentos Fermentados. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2017.

SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria. p 106, 2007.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com fat replacers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p.24-31, 2002.

SOARES, D. S., FAI, A. E. C., OLIVEIRA, A. M., PIRES, E. M. F., & STAMFORD, T. L. M. Aproveitamento De Soro De Queijo Para Produção De Iogurte Probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v 63, n. 4, p. 996 – 1002, 2011

SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Ver. Bras. Plantas Med**, v. 17, p. 528-533, 2015.

TÉO, C. R. P. A.; COELHO, S. R. M.; COELHO, L. M. Concentração de bactérias lácticas em leites fermentados acidófilos comercializados em Toledo – PR. **Revista Nutrição Brasil**, n. 3, p. 8-13, 2003.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Ciência Tecnologia de Alimentos** v. 26, n. 3, p. 589-595. 2006.

TOLDI, M.; KAPPLER, T. I.; SALVATORI, R. U. Crescimento de Cepas de *Streptococcus Thermophilus* e *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* em Meios de Cultura Industriais. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 6, n. 3, 2014.

VIEIRA, D. A. P; FERNANDES, N. C. A. Q. Bactérias: Morfologia e estrutura. P. 37- 48. In: VIEIRA, D. A. P; FERNANDES, N. C. A. Q. (Orgs.). **Microbiologia Geral**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Inhumas – GO, 2012.