



**CARACTERIZAÇÃO  
MICROBIOLÓGICA DE IOGURTES  
COMERCIALIZADOS EM LAVRAS - MG**

**SILVIA REGINA MOREIRA**

**1998**

Official of the

1950

1951

43980

MPN 30679

**SILVIA REGINA MOREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE IOGURTES  
COMERCIALIZADOS EM LAVRAS - MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, Área de Concentração Microbiologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof<sup>a</sup> Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998**

Ficha catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA.

Moreira , Silvia Regina

Caracterização microbiológica de iogurtes comercializados em  
Lavras-MG / Silvia Regina Moreira. – Lavras : UFLA, 1998.

73 p. : il.

Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira

Dissertação (mestrado) – UFLA

Bibliografia.

1. Iogurte. 2. Levedura 3. Qualidade. 4. Bactéria láctica 5  
Microbiologia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163  
- 637.1476

**SILVIA REGINA MOREIRA**

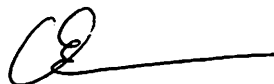
**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE IOGURTES  
COMERCIALIZADOS EM LAVRAS - MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciências dos Alimentos, Área de Concentração Microbiologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA EM: 28 DE AGOSTO DE 1998

Profª Eliana Pinheiro de Carvalho UFLA

Profª Rosane Freitas Schwan UFLA



Profª Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira  
UFV  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

***“Não desanime, porque o Senhor é fiel”***

**Hebreus 10:23**

**A meus pais, José Silvio e Catharina,  
pelo incentivo, amor, paciência e dedicação**

**As minhas irmãs, Andréa e Márcia,  
pelo apoio e carinho**

**A minha sobrinha**

**Dedico este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

- À Profª. Drª. Eliana Pinheiro de Carvalho, pela ajuda e estímulo recebido durante o mestrado.
- À Profª. Drª. Rosane Freitas Schwan, pela co-orientação, paciência, incentivo, amizade e acompanhamento deste trabalho.
- À Capes, pela concessão da bolsa.
- À Fundação Mary Harriet Speers, pelo apoio.
- Aos padrinhos e à toda família pela força e carinho.
- Aos colegas de laboratório (André, Alexandre, Elenir, Valéria, Charles, Edilson, Cristina, Miriam, Daniela, João e “Carolinas”).
- A Carla Pataro do ICB, que muito contribuiu para a conclusão deste trabalho.
- Ao pessoal (Gordo, Pedro, Renata e o pessoal da casa), pelos muitos momentos de descontração e amizade.
- Aos colegas da pós-graduação, pela convivência, companheirismo e auxílio mútuo.
- À grande amiga Paula Barbi, pelo valioso tempo que passamos juntas durante a realização deste trabalho.
- A Carlos, pelo valioso assessoramento nas análises estatísticas.
- Aos colegas que participaram de alguma forma na elaboração deste trabalho.
- E a todos aqueles que se sentirem esquecidos.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
ABSTRACT .....	iii
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>1</b>
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
1.2.1 Importância econômica.....	3
1.2.2 Definição.....	4
1.2.3 Processamento.....	5
1.2.4 Características químicas do iogurte.....	10
1.2.5 Deterioração.....	11
1.2.6 Ecologia de leveduras.....	13
1.2.7 Leveduras encontradas em produtos lácteos.....	15
1.2.8 Leveduras: importância, definição e aspectos históricos de sua taxonomia.....	17
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>25</b>
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DE IOGURTES COMERCIALIZADOS EM LAVRAS - MG .....	25
RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
2.1 INTRODUÇÃO .....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.2.1 Obtenção das amostras de iogurte .....	28
2.2.2 Preparo das amostras.....	29
2.2.3 Análises microbiológicas .....	29
2.2.4 Análises físico-químicas .....	30
2.2.5 Análises estatísticas .....	31
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
2.3.1 Características químicas do iogurte: pH e acidez .....	31



2.3.2	Proporção <i>Streptococcus / Lactobacillus</i> .....	34
2.3.3	População microbiana: total, leveduras e fungos filamentosos.....	36
2.3	CONCLUSÕES .....	41
2.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>		<b>45</b>
<b>ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS</b>		
<b>FILAMENTOSOS EM IOGURTES .....</b>		<b>45</b>
RESUMO .....		45
ABSTRACT .....		46
3.1	INTRODUÇÃO .....	47
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	48
3.2.1	Obtenção dos isolados.....	48
3.2.2	Manutenção dos isolados .....	48
3.2.3	Caracterização das leveduras.....	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.3.1	Identificação das leveduras quanto a espécie .....	52
3.4	CONCLUSÕES .....	64
3.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS.....		69

## RESUMO

MOREIRA, Silvia Regina. Caracterização microbiológica de Iogurtes comercializados em Lavras - MG. Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).\*

Leveduras e fungos filamentosos estão freqüentemente envolvidos na deterioração de iogurtes, sendo normalmente responsáveis pela presença de sabores estranhos, perda da qualidade de textura devido à produção de gás e do estufamento da embalagem, levando à perda do produto. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das características microbiológicas dos iogurtes através da enumeração de fungos filamentosos e leveduras, relacionando-os com a vida de prateleira das marcas de iogurte freqüentemente comercializadas em estabelecimentos de Lavras - MG. Seis iogurtes, com e sem adição de polpa de frutas, foram coletados em três diferentes meses do ano de 1997 (abril/maio/junho), com quatro repetições, totalizando 72 amostras. As amostras foram analisadas quanto à acidez, pH, proporção estreptococo/lactobacilo, contagem total da população microbiana e contagem da população de fungos filamentosos e leveduras. As culturas utilizadas como inóculo para iogurtes contém *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, e estas bactérias foram encontradas na proporção 1:2, respectivamente, em 80% das amostras analisadas. Mediu-se o pH e % de ácido láctico dos iogurtes e notou-se que houve variação significativa entre as amostras. Em todas as amostras coletadas nos diferentes lotes de fabricação foram encontradas populações de leveduras acima do permitido pela legislação brasileira (máximo de 100 UFC/g de iogurte). Dentre os iogurtes analisados, foram encontradas variações na população leveduriforme desde 1 UFC/g até  $2,7 \times 10^3$  UFC/g. As leveduras mais freqüentemente encontradas foram: *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae*, que representaram 30% e 18%, respectivamente, do total entre as 11 espécies identificadas. *Debaryomyces castelli* e *Schizosaccharomyces pombe* representaram respectivamente 1% e 0,6% do total de isolados. *Hansenula* sp.(17%), *Mrakia frigida* (15%), *Candida maltosa* (8%), *Candida parapsilopsis* (7%), *Pychia scolyti* (3%). *Kluveromyces marxianus* e *Candida mogii*, representaram menos de 1% do total. Espécies de *Monilia* e *Penicillium* foram isoladas em 8 amostras de iogurtes, principalmente de iogurtes contendo polpa de frutas. A natureza e o grau de contaminação

---

\* Comitê Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira – UFV (Orientadora), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA e Rosane Freitas Schwan - UFLA.

também variaram com a temperatura ambiente, tendo o mês de abril apresentado maiores índices de contaminação. Os dados, portanto, sugerem que a alta contaminação observada pode ser devido tanto ao nível de contaminação inicial, quando não atendidas as condições de higiene e sanidade, ou à refrigeração imprópria durante o transporte e comercialização.

## ABSTRACT

MOREIRA, Silvia Regina. **Microbiological characterization of yoghurts comercialized in the south of Minas Gerais** . Lavras: UFLA, 1998. 73p. (Dissertation – Masters degree in Food Science).\*

Yeasts and filamentous fungi are often involved in the deterioration of yoghurts, normally being responsible for the presence of off flavours, loss of texture quality due to gas production and package swelling leading to the loss of product. The aim of this study was to proceed a survey of the microbiological characteristics of yoghurts by means of counting of filamentous fungi and yeasts, relating them with the shelf-life of the yoghurt brands usually commercialized in the local supermarkets of Lavras-MG . Six yoghurts, with and without addition of fruit pulps were collected in three different months of the year of 1997 (April/May/June) with four replications amounting to 72 samples. The samples were analysed as to % lactic acid, pH, *Streptococcus/Lactobacillus* ratio, total counting of the microbial population and counting of fungus and yeast populations. The starter cultures used for the yoghurts contained both *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* and these bacteria were found in the ratio 1:2 respectively in 80% of the samples. There was no significative difference in pH value and concentration of lactic acid found in all samples analysed. In every sample collected in the different times of the year, yeast populations above that allowed by the Brazilian legislation were found (maximum of 100 CFU/g yoghurt). Out of the yoghurts analysed, variations were found in the yeast-shaped population since 1CFU/g up to  $27 \times 10^3$  CFU/g. The most frequent yeast species found were *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae*. The which stood for 19% and 18% of the total among the 13 species identified. *Debaromyces castelli*, *Mrakia frigida* and *Schizosacharomyces pombe* stood for each 1% of the total of isolates *Hansenula sp* (17%) *Leucosporidium stokesii* (14%), *Debaryomyces hansenii* (11%) *Candida maltosa* (8%) *candida parapsilopsis* (7%) *Pychia scolyti* (3%) *Kluyveromyces marxianus* and *candida mogii*, represented less than 1% of the total. Species of *Monilia* and *Penicillium* were isolated in 8 yoghurt samples, mainly from fruit pulp containing yoghurts. Both the nature and degree of contamination also varied with room temperature. Samples collected in April showed the highest levels of contamination. These data therefore suggested that

---

\* Guindance Committee: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira – UFV (Major Professor), Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA and Rosane Freitas Schwan - UFLA.

the extent of contamination observed could be due to both high initial contamination level and improper refrigeration of these marketed yoghurts.

# **CAPÍTULO 1**

## **1.1 INTRODUÇÃO GERAL**

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm 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. Dentre esses produtos destaca-se o iogurte, que é resultante da fermentação do açúcar do leite - a lactose - por bactérias lácticas.

Na antigüidade, considerava-se que os leites fermentados eram eficazes no tratamento de vários males do homem. Eram utilizados no tratamento de numerosos distúrbios orgânicos, notadamente nas desordens do estômago, do fígado e dos intestinos, para estimular o apetite, regularizar a temperatura do sangue e melhorar a cor da pele.

Inicialmente, o consumo de iogurte foi bastante limitado, restringindo-se apenas a certos grupos étnicos. Em meados de 1960, a adição de frutas ao produto com o objetivo de atenuar o seu sabor ácido buscava uma maior aceitação popular e, ao mesmo tempo, uma maior divulgação era dada às suas qualidades nutritivas e terapêuticas, levando a um considerável aumento no seu consumo.

Em certos países, produtos fermentados como o iogurte são preferidos ao leite fluido, por razões de segurança e pelos possíveis efeitos terapêuticos. Em certos locais onde a pasteurização, transporte e refrigeração são inadequados, características estas bastante comuns nos países em desenvolvimento, o leite fermentado tem sido uma opção ao leite fluido. Na elaboração de produtos fermentados derivados do leite, as bactérias lácticas inibem o crescimento de outros microrganismos que poderiam tornar o leite inaceitável para o consumo.

O consumo do iogurte tem sido indicado para dieta de crianças, pessoas idosas e para os que apresentam problemas ao ingerir o leite fluido, principalmente porque é de fácil digestão e de maior tolerância aos que apresentam dificuldade em desdobrar a lactose.

Também é de fundamental importância considerar que o valor nutritivo do iogurte é superior ao do leite do qual é produzido, levando-se em conta a digestibilidade, os sólidos totais de que é acrescido para a sua fabricação e os produtos metabolizados pelos microrganismos empregados em seu preparo, além da habilidade de restaurar a flora intestinal normal.

A elaboração do iogurte é uma técnica que se expande cada vez mais no mundo inteiro, de preparo originalmente simples e que atualmente 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.

Inúmeras pesquisas tem sido executadas para melhoria da qualidade de iogurtes e outros produtos fermentados. Um dos grandes problemas que têm contribuído para a perda do produto e, conseqüentemente, causa prejuízos para a indústria, é a presença de contaminantes que podem provocar alterações de sabor, cor e também estufamento de embalagem nas prateleiras refrigeradas de comercialização.

Face a isto, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de verificar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de iogurtes comercializados em Lavras - MG. Para determinação desta qualidade, foram enumerados e selecionados para identificação, leveduras e fungos filamentosos para determinar a qualidade microbiológica e química dos iogurtes.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 Importância econômica.

As modificações do leite por microrganismos afetam as propriedades físico-químicas e o valor econômico de leite. As mudanças físico-químicas afetam as propriedades tais como sabor, consistência e valor nutritivo. O valor econômico do leite é melhorado pelo prolongamento do tempo de vida dos produtos lácteos derivados, pelo fato dos mesmos poderem ser armazenados (Kilara e Shahani, 1978). A fermentação é um dos métodos clássicos de preservação de alimentos. No decorrer dos anos este método foi evoluindo, transformando-se em uma arte sofisticada. O leite pode ser fermentado por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para produzir uma variedade de produtos como iogurte, queijo, manteiga, etc. A importância do iogurte no mercado nacional vem aumentando de forma considerável nos últimos anos, como revelam as estatísticas brasileiras de produção de leite cru e leites fermentados, o que mostra que a produção de leite fermentado e iogurte aumentou muito nos últimos anos. Se o iogurte é um importante derivado do leite no mercado brasileiro, em outros países, mais desenvolvidos, onde os investimentos em tecnologia e propaganda são maiores, ele alcança maiores índices de produção e consumo.

Embora o consumo e a produção de leite fermentados no Brasil venha crescendo significativamente (380.000 ton em 1995 ou aproximadamente, consumo de 4 kg/hab/ano), o Brasil ainda se encontra distante de alguns países desenvolvidos como Finlândia (36 kg/hab/ano), Suécia (26 kg/hab/ano) e França (16 kg/hab/ano). Na maioria desses países, e no Brasil muito particularmente, o consumo de leites fermentados é sinônimo de consumo de iogurte, embora aqui já tenhamos uma parcela significativa (26%) representada pelas bebidas lácteas (CHR. Hansen, 1997).



O iogurte, assim como muitos derivados do leite, nada mais é do que o resultado de tentativas iniciais de se preservar o leite, uma vez que não é permitida a adição de produtos químicos aos produtos de laticínios.

### **1.2.2 Definição**

Com o crescimento do número de indústrias lácteas no Brasil e, conseqüentemente, a competitividade entre seus produtos no mercado, torna-se importante a busca da qualidade total. O leite, produto de secreção das glândulas mamárias de mamíferos, e alguns de seus derivados, são conhecidos, desde a pré-história, quando o homem domesticou alguns animais (Pinheiro e Mosquim, 1991). Os mesmos autores citam que há uma tendência generalizada, por parte do indivíduo e da comunidade, em se conhecer o valor nutritivo dos alimentos, estimulando a melhoria da qualidade do produto. A importância do leite, sob o ponto de vista nutricional, deve-se à qualidade de suas proteínas, ao seu valor elevado de cálcio, fósforo, magnésio e às vitaminas A e D, riboflavina, niacina, calorias e outros.

Embora normalmente o aspecto nutritivo não seja considerado, podemos verificar sua importância na Tabela 1, que trata de valores típicos de composição de vários iogurtes e do leite.

Atualmente há uma grande variedade de produtos derivados do leite que fazem parte dos hábitos alimentares de uma parte privilegiada da população. Com esta demanda crescente de produtos lácteos e as exigências de qualidade por parte do mercado interno e externo, é preciso que as indústrias lácteas brasileiras caminhem em busca da qualidade exigida pelos consumidores.

TABELA 1. Valor nutritivo do leite e vários iogurtes

	Leite	Iogurte natural	Iogurte com 1,8% de gord	Iogurte com frutas (5% de sacarose)
Calorias/100g	66	84	69	90
Sólidos não gordurosos	8,7	13,1	13,1	14,0
Proteína	3,2	4,8	4,9	5,2
Riboflavina (mg/100g)	0,15	0,22	0,22	0,24
Cálcio (mg/100g)	120	180	181	192
Fósforo (mg/100g)	95	142	143	153
Potássio (mg/100g)	160	240	242	254

Grandi (1983).

O iogurte é um dos produtos mais antigos e conhecidos, sendo também muito apreciado e consumido no Brasil. É obtido por meio de fermentação láctica do leite integral ou desnatado, concentrado ou não, pasteurizado, na qual são utilizados *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, atingindo um pH final de 4,2-4,5.

Entretanto, o iogurte poderá apresentar uma microbiota bastante diversificada, que poderá estar ligada a diversos fatores, tais como: meio ambiente e qualidade de matérias-primas utilizadas ou processamento inadequado (Jay, 1978).

### 1.2.3 Processamento

A matéria-prima utilizada na elaboração do iogurte é o leite, principalmente o de origem bovina. Para a obtenção de um produto final com as

melhores características possíveis, é necessário seguir várias etapas, como mostra a Figura 1 (Abreu, 1997).

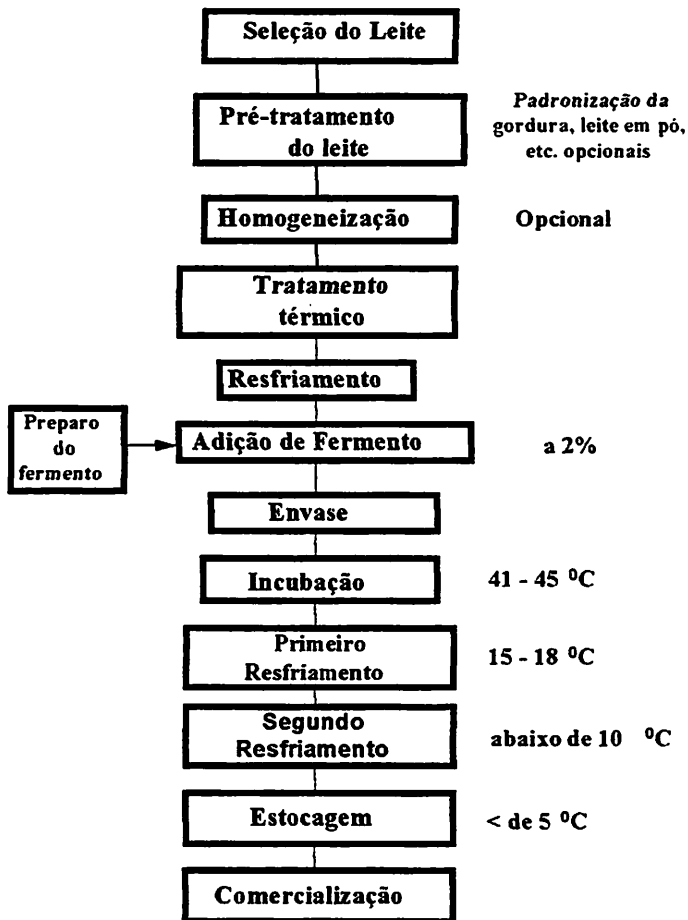


FIGURA 1. Esquema geral de fabricação de iogurte tradicional

### 1.2.3.1 O leite

A qualidade do leite para a elaboração de produtos lácteos em geral é de fundamental importância. No caso particular do iogurte, a observação dessa qualidade deve ser rigorosa, já que a mesma será determinante na qualidade do

iogurte a ser elaborado. O leite deve ter cor, aroma, sabor e aparência normais, não deve estar ácido (a acidez deve estar de preferência abaixo de 17<sup>o</sup>D). Este leite não deve ser proveniente de animais doentes e deve ser isento de substâncias estranhas, tais como antibióticos, detergentes, sanificantes, etc (Abreu, 1997).

#### 1.2.3.2 Tipos de Iogurte

Embora mais comumente fabricado com leite de vaca, o iogurte pode ser igualmente elaborado com leite de cabra e búfala, e em alguns lugares, como por exemplo na Bulgária, o leite de ovelha é também utilizado.

#### 1.2.3.3 Teor de gordura

De acordo com o mercado, o leite pode ser integral (3,5% de gordura), desnatado ou parcialmente desnatado.

#### 1.2.3.4 Outros ingredientes

Adoçantes, carboidratos nutritivos, aromas, corantes, estabilizantes, açúcares e frutas podem ser adicionados ao iogurte. O açúcar deverá ser adicionado antes do aquecimento, pois se estiver contaminado, ele será aquecido junto com o leite. Normalmente a quantidade de açúcar é de 10 a 12%. A quantidade dos outros ingredientes adicionada varia de acordo com o fabricante e é normalmente descrita no rótulo desses produtos.

#### 1.2.3.5 Preparo do leite

O leite para a fabricação do iogurte deve ser fresco, pois o leite congelado pode provocar defeitos de textura no produto. Para se fabricar um produto mais consistente, deve-se aumentar a matéria seca do leite. Isto é conseguido com adição de 2 a 4% de leite em pó.

#### 1.2.3.6 Tratamento térmico

O aquecimento do leite é indispensável para a produção de iogurte. Tem como objetivo destruir os germes patogênicos e outros que iriam competir com o fermento do iogurte, que consiste de dois microrganismos obrigatórios para sua obtenção, o *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Temperatura	Tempo
80/83°C	30 minutos
85°C	8,5 minutos
90°C	3,5 minutos
95°C	1,5 minutos

#### 1.2.3.7 Abaixamento da temperatura

Após o leite ter sido aquecido, deve-se resfriá-lo para 41 a 45°C. Nessa fase deve-se ter bastante cuidado, pois como o leite está sendo resfriado, uma contaminação poderá prejudicar o iogurte.

#### 1.2.3.8 Fermento

O fermento para iogurte consiste de culturas de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Estas espécies deverão crescer simbioticamente. Esta simbiose produz como resultados principais produção de ácido láctico, formando o sabor característico do iogurte, e o acetaldeído, sendo este último responsável pelo típico aroma de iogurte.

#### 1.2.3.9 Inoculação e incubação

Após o leite ter sido resfriado, adiciona-se 1 a 2% de fermento, preparado previamente. Antes de adicionar o fermento, este deve ser bem homogeneizado, caso contrário o iogurte ficará com defeito de textura. Após a

adição do fermento ao leite, deve-se misturar, para que todo fermento se homogeneize completamente ao leite, que deverá permanecer em completo repouso a uma temperatura de 41 a 45<sup>o</sup>C; e se todas as condições forem favoráveis, após 3-4 horas a incubação estará completada.

#### 1.2.3.10 Resfriamento

Após a incubação, procede-se o resfriamento. Esse abaixamento da temperatura inibe o desenvolvimento das bactérias ligadas ao fermento e conseqüentemente interrompe a produção de ácido. O resfriamento é uma das etapas mais importantes na fabricação do iogurte. Se ela for feita antes do tempo, o iogurte apresentará textura inadequada, sem acidez, sabor e aroma característicos, caso contrário, ou seja, se passar do tempo, o iogurte ficará muito ácido.

#### 1.2.3.11 Bombeamento e envase

O iogurte normalmente é bombeado do tanque de fabricação para o sistema de envase. Quando se fabrica pequenas quantidades, normalmente não se usa bombeamento, sendo o iogurte colocado manualmente na embalagem. Em outros casos, o envase é feito pela passagem do iogurte diretamente do tanque para a embalagem através de um registro. Quando se faz o bombeamento, alguns cuidados devem ser tomados, caso contrário, o iogurte perderá muito da sua consistência ou poderá sofrer algum tipo de contaminação. A escolha da bomba é um fator muito importante nesse processo. Assim como a tubulação, deve-se observar cuidadosamente sua montagem para não deixar saliências, pois isso cria diferenças de pressão, levando à redução considerável na consistência do produto.

### 1.2.3.12 Armazenamento, transporte e comercialização

É importante salientar que de nada adianta tomar todos os cuidados acima citados se o armazenamento do iogurte não for feito de maneira correta. Recomenda-se que a temperatura de armazenamento seja a mais próxima possível do ponto de congelamento. Além de conservar o produto, evitando acidificação, desenvolvimento de leveduras e mofos, a refrigeração melhora a consistência do iogurte. O transporte do produto deve ser feito o mais rápido possível. Muitas vezes o fabricante toma todos os cuidados para produzir um bom produto mas a comercialização é feita de forma incorreta. É então aconselhável que o fabricante conheça as condições em que seu produto está sendo comercializado, principalmente no que diz respeito à temperatura em que o iogurte está sendo exposto.

A popularidade crescente do iogurte tinha, até certo ponto, sido uma resposta do consumidor à aparência dos iogurtes que contém açúcar, frutas e flavorizantes adicionados. Infelizmente, estas adições melhoram o iogurte como um meio para crescimento de leveduras e fungos filamentosos e podem também contribuir para a contaminação microbiana, embora a maioria das bactérias, principalmente as de significância à saúde pública, logo morrem, por causa do antagonismo acentuado exercido pelas bactérias do ácido láctico e do pH ácido. Por estas razões, frutas e outros ingredientes adicionados ao iogurte devem ser submetidos a um programa de controle de qualidade rigoroso, bem como controle de culturas e sanidade durante a fabricação (Arnott *et. al*, 1974).

### 1.2.4 Características químicas do iogurte

O iogurte encontrado no mercado nacional é excessivamente ácido em sua maioria e, às vezes, possui sabores estranhos devido à contaminações (Salado, 1990). Em vários casos, a responsabilidade pode ser atribuída ao distribuidor, que por desconhecer a importância do armazenamento refrigerado,

mantém o produto em temperaturas inadequadas à sua boa conservação. Portanto, a temperatura e o tempo de armazenamento têm influência na qualidade do produto e a maioria dos pontos de venda apresentam condições inadequadas de conservação do produto.

O produto iogurte vem passando por uma série de modificações tecnológicas desde o seu aparecimento. Atualmente, levando-se em conta, principalmente, os hábitos alimentares e/ou as exigências dos diversos mercados consumidores, estão em desenvolvimento, ou até já colocados à disposição do consumidor, novos e diferentes produtos, como molhos e temperos à base de iogurte, submetidos inclusive a tratamento térmico após sua fabricação, para uma maior vida de prateleira (Boudier *et al.*, 1989).

A acidez, o sabor, o aroma e a cultura “starter” de microrganismos do iogurte são aspectos considerados relevantes sob o ponto de vista de qualidade do produto (Davis e MacDonald, 1953).

A consistência do iogurte está relacionada à sua acidez, que se altera durante o armazenamento, em maior ou menor grau, dependendo da acidez inicial do produto e da temperatura de conservação (Salji e Ismail, 1983).

Humphreys e Plunkett (1969) recomendam para o iogurte uma acidez titulável de 1,0% a 1,25% e pH de 3,7 a 3,8. Entretanto, segundo Kosikowski (1978), o pH deve ser aproximadamente de 4,4. Para Kroger (1976), o produto com um pH na faixa entre 3,9 e 4,1 é desagradável ao paladar, devido à sua acidez elevada, e Babel (1962) afirma que o consumidor prefere o iogurte com pH em torno de 4,0.

### **1.2.5 Deterioração**

Apesar de todas as inovações técnicas, o iogurte ainda pode estar sujeito à contaminação microbiana, quando não atendidas as condições elementares de higiene e sanidade. Em princípio, a microbiologia dos iogurtes se limita às



espécies inoculadas durante a fabricação, considerando-se “contaminantes” o restante dos grupos de microrganismos. Tal contaminação pode estar representada principalmente por leveduras, psicrotróficos, coliformes totais e fecais, *Staphylococcus aureus*, bolores, etc. (Brazal Garcia *et al.*, 1986).

A principal exigência, em função de higiene alimentar, é evitar riscos resultantes da presença de microrganismos patogênicos, potencialmente patogênicos e toxinogênicos nos alimentos. Entre os patogênicos - com a *Salmonella spp.* sendo a mais discutida e estudada - um lugar importante pertence ao *Staphylococcus aureus*, especialmente aquelas linhagens que produzem enterotoxinas capazes de causar envenenamento alimentar (Pazakova *et al.*, 1997).

Durante a fermentação do iogurte, a concentração de *Staphylococcus aureus* permaneceu praticamente inalterada, sendo reduzida principalmente durante a armazenagem a frio, devido à presença de substâncias inibidoras produzidas pela cultura de iogurte (Pazakova *et al.*, 1997). No caso de uma alta contaminação de leite com *S. aureus*, o efeito antibacteriano da cultura de iogurte é insuficiente para evitar o risco de envenenamento alimentar (Pazakova *et al.*, 1997).

Salinas (1984) afirma que o exame de coliformes utilizado para verificar as condições higiênicas da industrialização de produtos lácticos não é aplicável ao iogurte após 24 horas de fabricação, porque o ácido láctico formado no processo fermentativo destrói estes microrganismos. Contagens superiores à 10 coliformes por grama são índices de uma pasteurização incorreta das matérias-primas, limpeza deficiente, tecnologia pouco higiênica no tratamento do equipamento, forte contaminação aérea e outras práticas pouco recomendadas. *Escherichia coli* é considerada patogêna e por isso sua ausência no iogurte é obrigatória (Brazal Garcia *et al.*, 1987). A Tabela 2 mostra valores máximos permitidos para microrganismos encontrados em iogurtes flavorizados.

TABELA 2. População microbiana máxima permitida a (i) frutas e ingredientes, incluindo (ii) chocolate, utilizados na fabricação de iogurte:

Microrganismos	CONTAGEM
	(Unidades formadoras de colônias/ ml)
(i) Mofos	< 10
Leveduras	< 10
Contagem total	< 1000
Coliformes	negativo
(ii) Mofos	< 10
Leveduras	< 10
Contagem total	< 2000
Coliformes	negativo

Tamime & Robinson, 1991.

O baixo pH do iogurte limita muito a proliferação de microrganismos, com exceção das leveduras. A deterioração de iogurtes por leveduras é geralmente conhecida pelo desenvolvimento de flavor não característico, perda de textura devido à produção de gás e à dilatação da embalagem, que ocorre no estágio final de deterioração do produto. A presença deste microrganismo está associada à falta de higiene durante o processamento, principalmente durante o envase, pois estes são destruídos anteriormente durante a pasteurização do leite. (Kroger, 1976).

### 1.2.6 Ecologia de leveduras

As leveduras podem ser definidas como microrganismos eucariotos unicelulares, que se reproduzem por brotamento ou fissão (Kurtzman & Phaff, 1969; Davenport, 1980).

Segundo Jones (1987), é bastante difícil se definir uma comunidade natural, uma vez que não se consegue isolar a maioria das bactérias e fungos filamentosos (filamentosos e leveduriformes) presentes no substrato, conhecidos como microrganismos não cultiváveis. O ecossistema é uma unidade funcional elementar da ecologia, compreendendo os organismos, o meio ambiente e as relações entre eles. As bactérias e os fungos filamentosos são partes essenciais de quase todos os ecossistemas (Rheinheimer, 1987).

O estudo de ecologia de leveduras se preocupa com a maneira pela qual estes microrganismos se propagam na natureza. Também são estudados os diferentes tipos de substratos na natureza que possam propiciar o crescimento das leveduras, e as razões específicas para a sua ocorrência nos ambientes naturais em questão. Paralelamente procura-se estudar a interação entre elas e outros tipos de microrganismos, assim como as demais formas superiores de vida (insetos, animais, algas, plantas, etc.). A maioria das leveduras possuem uma vida saprófita, mas podem ocorrer na forma de parasitas (Phaff *et al.*, 1978).

A maioria dos estudos sobre associação de leveduras com animais estão relacionados a animais de sangue-quente, insetos e crustáceos. Existem leveduras capazes de crescer nos intestinos de animais, sendo algumas delas patogênicas. Exemplos de leveduras consideradas parasitas facultativos, com a capacidade de crescer a 37°C e se multiplicar na cavidade intestinal de animais são: *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Trichosporon cutaneum*. Dentre as leveduras que podem estar associadas a infecções estão: *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Torulopsis glabrata*, e *Cryptococcus neoformans*. Leveduras não patogênicas podem também ocorrer na pele (carcaça) do animal (Phaff *et al.*, 1978).

O crescimento de algumas espécies de leveduras em iogurte está relacionado com a sua capacidade de crescer em temperatura de refrigeração, de

fermentar a lactose e sacarose e hidrolizar a caseína do leite (Fleet & Mian, 1987).

Por causa de seu baixo pH, os iogurtes formam um ambiente seletivo para o crescimento de leveduras (Davis & MacDonald, 1953). A adição de frutas e açúcar aos iogurtes ampliou o risco de contaminação por leveduras, proporcionando fontes adicionais de contaminação.

Quando existe uma boa prática de fabricação, os iogurtes não devem conter mais do que 1 célula de levedura/ml e, se corretamente armazenados sob refrigeração (5°C), uma vida de prateleira do produto de três a quatro semanas pode ser esperada. Considera-se ideal que o iogurte apresente de 1 a 10 células de fungos filamentosos e leveduras/ml (Tamime & Robinson, 1991). Entretanto, pelas normas do Ministério da Agricultura, limite de  $10^2$  células/ml é tolerado (Diário Oficial, jan. 1987).

### 1.2.7 Leveduras encontradas em produtos lácteos.

A diversidade de espécies de leveduras presentes em iogurte já foi mencionada por diversos autores em países diferentes (Green & Ibe, 1987; Fleet & Mian, 1987; Suriyarachchi & Fleet). Linhagens fermentadoras de *Torulopsis spp.*, *Candida pseudotropicalis* e *Kluyveromyces bulgaricus* tem sido implicadas na deterioração de iogurtes sem polpa de frutas (Soulides, 1956).

*Torulopsis candida*, *Torulopsis versatilis*, *Candida pelliculosa*, *Candida intermedia* e *Hansenula anomala* foram as espécies mais freqüentemente isoladas de iogurtes comercializados no Reino Unido (Fleet & Mian, 1987). *Candida lusitanae*, *Candida krusei* e *Kluyveromyces fragilis* foram as principais espécies isoladas de cem amostras de iogurtes produzidos em Lagos, Nigéria (Green & Ibe, 1987).

Em um levantamento de 169 amostras de iogurtes vendidos no comércio em Sidnei, Austrália, as espécies mais freqüentemente isoladas, em ordem

decrecente, foram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, *Candida diffluens*. Em algumas das amostras por eles analisadas, foi encontrada população de leveduras entre  $10^6$ - $10^7$  células/ml (Fleet & Mian, 1987). Estes autores concluíram que o crescimento predominante de determinadas espécies em iogurtes está relacionada com a capacidade de:

- crescer em temperaturas baixas (5-10<sup>0</sup>C) de armazenagem;
- produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas que hidrolizam a gordura e proteína do leite;
- fermentar lactose ou sacarose, que são os principais carboidratos de iogurtes naturais ou flavorizados;
- utilizar ácido láctico ou cítrico, os principais ácidos orgânicos do iogurte.

As espécies de leveduras predominantes encontradas em iogurtes na Austrália, *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces marxianus*, são positivas para estas propriedades anteriormente citadas (Fleet & Mian, 1987).

O controle sobre a ocorrência e crescimento de leveduras em iogurtes é direto e inclui princípios gerais de práticas de boa fabricação. Os pontos críticos a monitorar são:

- mistura e aquecimento adequado dos ingredientes antes da fermentação;
- ausência de leveduras na cultura “starter” das bactérias de ácido láctico;
- ausência de leveduras (não detectáveis em 1,0 g) em frutas e outros ingredientes adicionados ao iogurte inicial fermentado;

- limpeza e sanidade eficaz e regular do equipamento de processamento;
- resfriamento rápido do produto final para 5°C e manutenção desta temperatura por todo processo de venda (Fleet & Mian, 1987). Em alguns países, o uso de preservativos de sorbato ou benzoato pode ser permitido, porém, vale à pena notar que duas das principais leveduras, *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces marxianus*, encontradas em iogurte, são tolerantes a estas substâncias em concentrações de 500mg/ml (Fleet & Mian, 1987), sendo 2mg/ml (ABIA) o limite máximo permitido deste aditivo em iogurtes.

•

### 1.2.8 Leveduras: importância, definição e aspectos históricos de sua taxonomia.

O ponto de partida para o desenvolvimento biotecnológico está em procurar e descobrir fenômenos biologicamente exploráveis. Tal processo inicia-se com a procura de materiais biologicamente apropriados, seleção das propriedades desejáveis e é finalizado com a opção pelo subgrupo de organismo selecionado para a obtenção do processo ou produto final desejado (Bull *et al.*, 1992).

A área de classificação de organismos é uma das áreas de maior desafio na biologia (Bull *et al.*, 1992). Sistemática é o estudo científico da taxa de diversidade de organismos juntamente com todas as relações que os envolve. É uma disciplina fundamental que engloba classificação, nomenclatura, identificação, análise filogenética, processos evolutivos e mecanismos genéticos (Goodfellow & O'Donnel, 1992).

O termo levedura sempre foi associado à história do processo fermentativo. O significado da palavra levedura provém do latim “*levere*” e

significa suspender, referindo-se à produção de gás carbônico durante a fermentação, levantando a superfície líquida como uma espuma (Phaff *et al.*, 1978). O primeiro uso das leveduras foi provavelmente na mistura de populações de leveduras com suco de frutas ou grãos de cereais, resultando em bebidas alcóolicas conhecidas, como o vinho e cerveja.

Há mais de 4000 anos as leveduras já estavam presentes em tumbas Egípcias, em Tebas, no Rio Nilo, na forma de bebida e pão fermentado. As primeiras pesquisas científicas foram feitas por Van Leeuwenhoek em 1690, quando foi possível observar em microscópio “corpos” muito pequenos. Em 1876, Pasteur publicou um livro sobre processos fermentativos em condições anaeróbicas, mostrando a habilidade respiratória e fermentativa das leveduras. Emil Christian Hansen estudou características morfológicas e fisiológicas das leveduras, tendo diferenciado e caracterizado inúmeras espécies (Phaff *et al.*, 1978). De acordo com a revisão de Phaff *et al.* (1978), foi em 1896 que Hansen elaborou o primeiro sistema de classificação taxonômica de leveduras. Somente em 1931 foi elaborado, por Stelling-Dekker, um sistema de classificação mais completo. Estudos taxonômicos envolvendo leveduras não esporulantes foram elaborados por Lodder, em 1934 e Diddens, em 1941 (Phaff *et al.*, 1978). Um novo sistema de classificação foi elaborado em 1952 por Lodder e Kreger-Van Rij, envolvendo tanto leveduras esporulantes como não esporulantes. Esta publicação é conhecida por ter abordado a taxonomia de leveduras de forma bastante extensa. Lodder (1970) e Barnett *et al.*, (1977) revisaram os sistemas de classificação de leveduras, dando ênfase às características fisiológicas.

Pelo sistema mais recente de classificação, as leveduras fazem parte do Reino Fungi. Dentro deste reino existem quatro divisões: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (Alexopoulos, Mims, Blackwell, 1996), sendo as leveduras classificadas nas divisões Ascomycota e Basidiomycota. Originalmente, a caracterização das espécies de leveduras estava

concentrada principalmente na morfologia dos estados vegetativos e reprodutivos, sendo posteriormente incluídos testes morfológicos e genéticos (Kreger -Van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1977).

Dentro das propriedades bioquímicas estudadas para a identificação está a capacidade de fermentar e assimilar diferentes açúcares. Substâncias ricas em fonte de carbono, como as frutas, favorecem o crescimento da maioria das leveduras que possuem capacidade de metabolizar açúcares e outros componentes orgânicos por meio da fermentação. Leveduras com dificuldade em sintetizar as hexoses conseguem, em contrapartida, assimilar uma variedade de componentes orgânicos não fermentáveis encontrados em ambientes específicos, que servirão de base para seu estudo taxonômico (Kreger -Van Rij, 1984). A capacidade em assimilar e fermentar diferentes componentes só terá valor taxonômico se fornecer uma resposta constante (Barnett *et al.*, 1977).

Apesar da taxonomia convencional ser bastante eficiente e de grande importância, os testes consomem muito tempo e trabalho. Para se diminuir o número de erros e agilizar a identificação foram desenvolvidos, como métodos alternativos, os “kits” para análise. Estes sistemas ainda possuem pouca abrangência e são válidos somente para pequenos grupos de leveduras (Fleet & Mian, 1987). Deak e Beuchat (1993) utilizaram três kits diferentes: SIM, API 20C e ID 32C. Neste trabalho, foram utilizadas 166 leveduras isoladas de sucos de frutas e bebidas. Constataram que 91% das leveduras puderam ser corretamente identificadas pelo sistema SIM e que os outros dois, API 20C e ID 32C, identificaram apenas 86 e 76% das leveduras, respectivamente. O sistema Biolog (Biolog Inc., CA, USA) é uma nova tecnologia vinculada ao computador, semi-automatizada, para identificação rápida de leveduras. O sistema é baseado em uma bandeja de microtitulação e inclui testes de assimilação e oxidação (Praphailong *et. al.*, 1997). Dos 94 testes presentes no Biolog, somente 26 são comuns aos listados por Kreger -Van Rij (1984). Neste estudo, 49 das 72



espécies de leveduras (68%), foram corretamente identificadas pelo sistema Biolog. Entretanto 27 espécies, incluindo algumas de fundamental importância em alimentos e bebidas, não foram corretamente identificadas quanto a espécie. .

Com a introdução de técnicas moleculares, os trabalhos realizados em taxonomia de leveduras trouxeram um grande avanço nos testes de taxonomia convencional (Kreger -Van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1983).

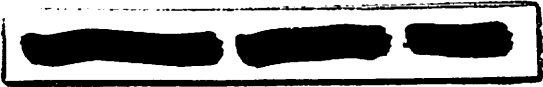
Tendo em vista a importância do leite e seus derivados como produtos de consumo da população, a implantação de sistemas de qualidade torna-se uma necessidade se as empresas objetivarem qualidade, produtividade, competitividade e aceitação dos seus produtos no mercado interno e externo.

O controle de fungos filamentosos e leveduras, num produto lácteo fermentado como o iogurte, é de importância fundamental, uma vez que a população destes microrganismos é que irá determinar a vida de prateleira do produto.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. R. de. **Tecnologia e aproveitamento do leite**. Lavras: FAEPE, 1997. 149p.
- ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: Jhon Wiley & Sons, Inc. 1996. 869p.
- ARNOTT, D. R; DUTSCHAEVER, C. L; BULLOCK, D. H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontario. **Journal Milk, Food Technology**. Ames. v.37, n.1, p.11-13, Aug, 1974.
- BABEL, F. J. Industrial utilization of lactic cultures. In: Symposium on lactic starter cultures. **Journal Dairy Science**, Illinois, v.45, n.10, p.1286-1290, Oct. 1962.

- CHR Hansen. **Leites fermentados, microrganismos probióticos e saúde**. Valinhos, n. 38, p. 2, mar. 1997.
- BARNETT, J. A. The nutritional test in yeasts systematics. **Journal of General Microbiology**, London, v. 99, p. 183-190, 1977.
- BARNETT, J. A; PAINE, R. W; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. Cambridge, Cambridge: University Press, 1983. 811p.
- BOUDIER, J. F; COLIN, J. Y; SOTTIEZ, P. **Yoghurt-based sauces and their manufacture**. French Patent Application FR 2623376 A 1, 1989.
- BRASIL. Leis, decretos, etc., Portaria n. 001 de 28 de janeiro de 1987, Aprova padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 25 de fev. 1987. Seção 1, p. 2764.
- BRAZAL, G. T; RUIZ, L; ESPEJO DIAZ, M. Microbiological quality of natural and flavoured yoghurts, consumed in Alicante province. **Alimentaria**, Madrid, v.177, n.29, p.39-42, Sept./Out, 1986.
- BULL, A. T; GOODFELLOW, M; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of inovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p. 219-252, 1992.
- DAVENPORT, R. P. An Introduction to yeasts and yeastlike organisms In: SKINNER, F. A; PASSMORE, S. M; DAVENPORT, R. R. **Biology and activities of yeasts**. London: Academic Press, 1980. p. 1-23.
- DAVIS, J. G; MACDONALD, F. J. **Dairy chemistry**. 5.ed. London: Charles Griffin, 1953. 601p.
- DEAK, T; BEUCHAT, L. R. Comparison of the SIM, API 20C, and ID 32C systems for identification of yeast isolated from fruit juice concentrates and beverages. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 56, n. 7, p. 585-592, July, 1993.

  
FLEET, G. H; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam: Elsevier. v. 4, p. 145-155., Oct. 1987.

GOODFELLOW, M; O'DONNELL, A. Roots of bacterial systematics. In: **Curso Actinomyces in Industry and Environment**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello". 1992.

GRANDI, J. G. Leites fermentados, manteiga e queijo. In: AQUARONE, E; LIMA, U. de A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, 1983. cap.6, p.123-148. (Série Biotecnologia, 5).

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

HUMPHREYS, C. L; PLUNKETT, M. Yogurt: A review of its manufacture **Dairy Science Abstracts**, England, v.31, p.607-622. 1969.

JAY, M. L. **Modern food microbiology**. 2.ed. New York: D. Van Nostrand, 1978. 328p.

JONES, J. G. Diversity in Freshwater Microbiology. In: **Ecology of Microbial Communities**. Cambridge : University press, 1987. p. 235-259.

KILARA, A; SHAHANI, K. M. Lactic fermentations of dairy foods and their biological significance. **Journal Dairy Science**, Illinois, v. 61, n. 12, p. 1793- 1800, 1978.

KOSIKOWSKI, F.V. **Cheese and fermented milk foods**. 2.ed. New york: F. V. Kosikowski and Associates, 1978. 711p.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts, A Taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier. 1984. 1082 p.

KROGER, M. Quality of yogurt. **Journal Dairy Science**, Illinois, v.59, n.2, p.344-350, Feb. 1976.

- KURTZMAN, C. P.; PHAFF, H. J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (ed). **The Yeasts: biology of the yeasts**. London: Academic Press, 1969. v.1, p. 63-94.
- LODDER, J. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: North Holland Publ, 1970. 1385p.
- PAZAKOVA, J; TUREK, P; LACIAKOVA, A. The survival of *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, Oct., p. 659-662, 1997.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK, E. M. **The life of yeasts**. 2.ed. Massachusetts: Harward University Press, 1978. p.1-15.
- PINHEIRO, A. J. R; MOSQUIM, M. C. A. V. **Processamento de leite de consumo**. Viçosa: UFV, 1991. p. irr.
- PRAPHAILONG, W; VAN GESTEL, M; FLEET, G. H; HEARD, G. M. Evaluation of the Biolog system for the identification of food and the beverage yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 6, jun., p. 455-459, 1997.
- RHEINHEIMER, G. **Microbiologia de las águas**; tradução de Jose Romero Muños de Arenillas. 4ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1987. 299p.
- SALADO, G. A. **Viabilidade de implantação de lactobacilos no trato intestinal de humanos adultos**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 92 p. (Dissertação- Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).
- SALINAS, R. J. Evolucion de la contaminación del yogur por Coliformes, E. Coli y Enterococos **Archivos de zootecnia**, Córdoba, v.33, n.125, p.1-6, abr. 1984.
- SALJI, J. P; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage. **Journal Food Science**, Chicago, v.48, n.1, p. 258-259, Jan./Feb. 1983.

**SOULIDES, D. A.** Lactose fermenting yeasts in yogurt and their effect upon the product and bacterial flora. **Journal of Applied Microbiology, Oxford**, v.4, p. 274-276. 1956.

**SURIYARACHCHI, V. R; FLEET, G. H.** Occurrence and growth of yeasts in yogurts. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 42, n. 3, p. 574-579. Oct. 1981.

**TAMIME, A. Y. ROBINSON, R. K.** **Yogur; ciencia y tecnología.** Traduzido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns e Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991. 368p.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DE IOGURTES COMERCIALIZADOS EM LAVRAS - MG

#### RESUMO

A fermentação é um dos métodos clássicos de preservação de alimentos. O leite pode ser fermentado por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para produzir uma variedade de produtos como iogurte, queijo. A importância do iogurte no mercado nacional vem se incrementando de forma considerável nos últimos anos, como revelam as estatísticas brasileiras de produção de leite cru e leites fermentados. Inúmeras pesquisas têm sido executadas para melhoria da qualidade de iogurte e outros produtos fermentados. Um dos grandes problemas que tem contribuído para perda do produto e conseqüentemente prejuízos para a indústria, é a presença de contaminantes que podem causar alterações de sabor, cor e também estufamento de embalagens nas prateleiras refrigeradas de comercialização. O principal objetivo deste trabalho foi realizar levantamento das características microbiológicas dos iogurtes, por meio da enumeração de fungos filamentosos e leveduras encontrados, relacionando-os com a vida de prateleira das marcas de iogurte de diferentes produtores. Setenta e duas amostras de iogurtes comercializados foram submetidas à análise microbiológica da população de *Lactobacillus/Streptococcus*, contagem de leveduras e fungos filamentosos e análises químicas (pH, % ácido láctico). Os iogurtes foram produzidos por 4 produtores diferentes e comercializados nos supermercados de Lavras - Minas Gerais, Brasil. As culturas utilizadas como inóculo para iogurtes contém *Lactobacillus delbrueckii spp bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* e estas bactérias foram encontradas na proporção de 1:2, respectivamente em 80% das amostras analisadas. Não foi encontrada diferença significativa no valor de pH e na concentração de ácido láctico nas amostras. População de leveduras acima de 100 UFC/g foram observadas em 28% das amostras e contagens de leveduras maiores que 1000 UFC/g foram encontradas em 7% dos iogurtes analisados. É importante salientar que apesar de todas as inovações tecnológicas e cuidados durante e depois da fabricação do iogurte, o produto ainda pode estar sujeito à contaminação microbiana, quando não atendidas as condições de higiene e sanidade.

# MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL EVALUATION OF YOGHURTS COMMERCIALISED IN THE SOUTH OF MINAS GERAIS

## ABSTRACT

Fermentation is one of the classic methods to preserve foods. Milk can be fermented by bacteria, yeasts and filamentous fungi to produce a variety of products (e.g. yoghurt, cheese). In the last few years, the popularity of yoghurt has been increasing in Brazil as reported by the annual statistics of production of raw milk and dairy products. Several reports can be found relating to the improvement of the quality of yoghurts and other fermented products. One of the greatest problem which has contributed for the loss of the product and consequently reduces the industry income is the contamination by microorganisms. This contamination can alter the flavour, colour and the swelling could eventually result in the blowing of the product container maintained under refrigeration. The main aim of this research was to analyse the microbial population and chemical characteristics of commercialised yoghurts and relate them to the shelf-life of the products from different manufacturers. Seventy-two samples of commercially produced yoghurts were subject to microbiological examination for *Lactobacillus*/*Streptococcus* ratio, count of yeasts and fungi and chemical analysis (pH, % lactic acid). The yoghurts were produced by four different manufactures and sold in local supermarkets in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. The starter cultures used for the yoghurts contained both *Lactobacillus delbruecki* spp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* and these bacteria were found at the ratio 1:2 respectively in 80% of the samples. There was no significative difference in pH value and concentration of lactic acid found in all samples analysed. Yeast counts in excess of 100 CFU/g were noted in 28% of the samples and yeast populations greater than 1000 CFU/g were found in 7% of the yoghurts analysed. It is worth noting that although new technologies have been developed for yoghurt production, the final product is still subjected to microbial contamination if hygienic principles and refrigeration conditions are not observed.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos (Bastos, 1995). Essa preocupação se deve ao grande número de produtos alimentícios existentes e a uma tendência atual de se ingerir produtos naturais. Dentre esses produtos destaca-se o iogurte, que é resultante da fermentação do açúcar do leite - a lactose - por bactérias lácticas (Salinas, 1986).

Na antigüidade, considerava-se que os leites fermentados eram eficazes no tratamento de vários males do homem. Eram utilizados no tratamento de numerosos distúrbios orgânicos, notadamente nas desordens do estômago, do fígado e dos intestinos, para estimular o apetite, regularizar a temperatura do sangue e melhorar a cor da pele (Tamime, *et al.*, 1991).

Inicialmente, o consumo de iogurte foi bastante limitado, restringindo-se apenas a certos grupos étnicos. Em meados de 1960, a adição de frutas ao produto com o objetivo de atenuar o seu sabor ácido buscava uma maior aceitação popular e, ao mesmo tempo, uma maior divulgação era dada às suas qualidades nutritivas e terapêuticas, levando a um considerável aumento no seu consumo (CHR. Hansen, 1997).

A elaboração do iogurte é uma técnica que se expande cada vez mais no mundo inteiro, de preparo originalmente simples e que atualmente 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 (Salinas, 1986).

Esse atributo é uma consequência, além das condições de fabricação, da qualidade, aspectos microbiológicos e do tratamento térmico do leite, como também da cultura láctica empregada, uma vez que da sua ação sobre os



componentes do leite é que resultarão as características desejáveis no produto. A qualidade higiênica deste alimento deve estar constantemente controlada, por ser bastante consumido também por idosos, crianças e pessoas doentes (Salinas, 1986).

Um dos grandes problemas que têm contribuído para a perda do produto e, conseqüentemente, causa de prejuízos para a indústria, é a presença de contaminantes que podem causar alterações de sabor, cor e também estufamento de embalagem nas prateleiras refrigeradas de comercialização (Fleet & Mian, 1987).

Face a isto, a presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de verificar a qualidade microbiológica e química de diferentes marcas de iogurte distribuídas em supermercados de Lavras - Minas Gerais, e também para alertar os produtores sobre os cuidados e riscos a que o produto está sujeito, quando processado e manuseado de forma incorreta.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Obtenção das amostras de iogurte**

Neste experimento foram utilizadas quatro (4) marcas diferentes de iogurtes, com e sem adição de polpa de frutas, totalizando seis (6) tratamentos. As amostras foram coletadas mensalmente em diferentes estabelecimentos de Lavras, com aproximadamente mesma data de validade e pertencentes a lotes de produção diferentes. Foram então acondicionadas em caixas de material isotérmico, contendo cubos de gelo e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

### **2.2.2 Preparo das amostras.**

No Laboratório de Microbiologia, cada amostra foi prontamente identificada por números. A homogeneização das amostras foi efetuada na própria embalagem e após a abertura das mesmas, observou-se a aparência do produto. Asépticamente, alíquotas de 10g de amostra foram pesadas e depois transferidas para frascos de diluição com 90 ml de água peptonada estéril (10g de peptona; 5g de NaCl para um litro de água destilada). A partir desta diluição foram feitas as diluições subseqüentes necessárias à análise do produto.

### **2.2.3 Análises microbiológicas**

#### **2.2.3.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos**

O número total de microrganismos foi determinado pelo processo de contagem em placas, utilizando-se o meio de cultura Plate Count Ágar (PCA), (Harrigan & McCance, 1976). Após inoculação, as placas foram incubadas invertidas, à 28°C por 48 horas e a contagem foi feita utilizando-se um contador de colônias.

#### **2.2.3.2 Contagem de fungos filamentosos e leveduras**

Para a enumeração de fungos filamentosos e leveduras, foi empregado o meio YEPG (Extrato de levedura 10g; Peptona 20g; Glicose 20g; Ágar 15g), com o pH 3,5 reduzido com ácido tartárico (1 N).

A inoculação foi feita colocando-se 5 ml de inóculo e o método usado foi o de incorporação do meio à placa "Pour Plate" (Koch, 1981). As placas foram então incubadas a 28°C por 7 dias.

Das placas com meio seletivo (YEPG pH-3,5), foi isolado um número de colônias de leveduras igual ao da raiz quadrada da contagem, conforme recomendação do "Bacteriological Analytical Manual for Foods" (FDA, 1972),

quando o número era superior a 35 colônias. Nas placas com contagem menor, todas as colônias foram isoladas. Cada isolado foi repicado e, após observação microscópica, as culturas puras foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio YW (Extrato de levedura 3g, Extrato de malte 3g, Peptona 5g, Glicose 10g, Ágar 15g/litro) inclinado, colocando-se óleo mineral estéril na superfície para manutenção (Wickerham 1951).

#### 2.2.3.3 Determinação da proporção coco/bacilo nas amostras.

Todas as amostras de iogurte adquiridas nos estabelecimentos de Lavras foram submetidas à coloração de Gram (Claus, 1992). As lâminas foram observadas em microscópio ótico, onde foi feita a contagem de bactérias tipo cocos e bastonetes em 10 campos diferentes, fazendo-se, a seguir, a média dessas contagens, a fim de verificar a presença de lactobacilos e estreptococos característicos.

### 2.2.4 Análises físico-químicas

#### 2.2.4.1 Determinação de pH.

Foi determinado pela medida direta com um pHmetro da marca Hanna Instruments, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras.

#### 2.2.4.2 Determinação de acidez.

A acidez, em termos de ácido láctico, foi determinada titulando-se 10 ml da amostra com solução Domic (NaOH N/9) por viragem do indicador básico fenolftaleína em solução alcoólica.

$$1^{\circ}D = 0,1g \text{ de ácido láctico por litro.}$$

### 2.2.5 Análises estatísticas

As variáveis pH, acidez, contagem total de microrganismos e contagem de leveduras foram analisadas em DIC no esquema fatorial (6x3) por meio do software SISVAR v 3.01 (Departamento de Ciências Exatas-UFLA), utilizando-se o seguinte esquema de Análise de variância:

FV	GL
Iogurte	5
lotes	2
I x E	10
Erro	54
TOTAL	71

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Setenta e duas amostras de iogurtes foram analisadas quanto às características químicas e microbiológicas, em três lotes diferentes de fabricação (abril, maio e junho - 1997) coletados em supermercados de Lavras-MG.

### 2.3.1 Características químicas do iogurte: pH e acidez

Os valores obtidos para pH e acidez titulável, em todas os lotes diferentes de fabricação (abril/ maio/ junho - 1997), encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Nessas tabelas, cada valor representa a média de quatro repetições. Foram realizados testes estatísticos (Tukey) dos resultados obtidos, para verificar a existência de interação dos fatores: iogurte e diferentes lotes de fabricação.

**TABELA 1.** Valores de pH de quatro diferentes marcas de iogurtes comercializados em Lavras – MG, coletados em três lotes diferentes de fabricação

TRATAMENTO	LOTES		
	I	II	III
1 (sem sabor)	4,39	4,25	4,29
2 (com sabor)	3,76	4,25	3,81
3 (com sabor)	4,00	4,17	3,81
4 (com sabor)	4,10	4,27	4,35
5 (sem sabor)	4,11	4,21	4,19
6 (com sabor)	3,95	3,98	4,03

**TABELA 2.** Valores de acidez (% de ácido láctico) em iogurtes comercializados em Lavras – MG, coletados em três lotes diferentes de fabricação

TRATAMENTO	LOTES		
	I	II	III
1 (sem sabor)	0,70 d	0,78 ab	0,90 b
2 (com sabor)	1,09 a	0,78 ab	1,20 a
3 (com sabor)	0,73 d	0,57 c	1,20 a
4 (com sabor)	0,83 cd	0,71 b	0,67 c
5 (sem sabor)	1,06 ab	0,91 a	0,90 b
6 (com sabor)	0,94 bc	0,86 a	0,71 c

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Pelos dados de valores de pH dos iogurtes, observou-se que todos os valores dos seis tratamentos (iogurtes) diferiram em relação aos diferentes lotes de fabricação e entre os diferentes tipos de iogurte. Ocorreu uma interação

significativa entre os iogurtes e os lotes diferentes de fabricação de que as amostras foram coletadas.

O iogurte 1 manteve os valores de pH constantes, em torno de 4,0 nos três lotes diferentes de fabricação. Entretanto, nos demais iogurtes, os valores de pH variaram entre os lotes de fabricação, e tiveram uma tendência de apresentarem valores abaixo do desejado ( $< 4,2-4,5$ ) (Abreu, 1997).

Quando a interação dos lotes de fabricação dentro de cada tratamento (iogurte) foi verificada, os resultados mostraram que o iogurte 3 foi o que apresentou valores significativamente diferentes em relação aos lotes de fabricação. Pode-se sugerir que esse iogurte não manteve um padrão de qualidade durante a coleta nos diferentes lotes de fabricação em que foi feita a amostragem. Dentre todos iogurtes analisados, o iogurte 6 foi o que manteve constante este valor de pH, entretanto, abaixo do desejado (Tabela 1).

O valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer a um determinado grupo em detrimento de outro. No caso da fermentação do iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus*. Com a finalidade de acompanhar a acidez do produto e seus efeitos sobre os atributos de qualidade do iogurte, procedeu-se a titulação de cada amostra de iogurte, uma vez que a acidez é um dos fatores que limitam uma maior aceitação do produto.

Os resultados de acidez não foram constantes nas diferentes séries de amostras em função dos três diferentes lotes de fabricação (Tabela 2). Houve interação significativa entre os iogurtes (tratamentos) e os diferentes lotes de fabricação. Em termos gerais, a acidez foi em torno de 1,0%, embora o desejável seja o iogurte apresentar uma acidez em torno de 0,70 - 0,72% de ácido láctico (Abreu, 1997). Os tratamentos 2 e 3 apresentaram os maiores valores de acidez, atingindo concentração de até 1,20% de ácido láctico.

Vários fatores podem causar esta variação de acidez, entre eles podemos citar: falhas durante o processamento e ausência de controle da temperatura durante o armazenamento.

O problema de acidez excessiva em iogurtes pode ser minorado com o maior rigor no cumprimento da data de validade destes produtos. Isto obrigaria a sua retirada do mercado, uma vez que esta variação de acidez pode, em muitos casos, ser seguida de outras modificações organolépticas indesejáveis ou mesmo favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos mais tolerantes à acidez.

Em experimentos verificando qualidade de iogurtes Salinas (1986), concluiu que o aumento da acidez titulável é diretamente proporcional ao tempo de armazenamento. Salji e Ismail (1983) concluíram que as mudanças na acidez do produto ocorrem em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas, nas amostras analisadas.

Tamime *et al.* (1991) denominou como pós-acidificação a acidez produzida após o período de incubação, isto é, durante o resfriamento, estocagem e distribuição até o consumo. Essa acidez muda durante o armazenamento, em maior ou menor grau, dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de armazenamento e do poder acidificante da cultura.

### **2.3.2 Proporção *Streptococcus* / *Lactobacillus***

Outra característica analisada nesta pesquisa foi a proporção estreptococos/lactobacilos em cada diferente lote de fabricação e em cada uma das amostras. A contagem destes microrganismos foi feita em lâminas pelo método de Gram, em microscópio óptico. A diferença na morfologia celular das bactérias permitiu uma avaliação da população microbiana. A contagem das bactérias com forma de cocos e bastonetes foi realizada em 10 campos diferentes. Os resultados médios obtidos podem ser encontrados na Tabela 3.

Com relação à tecnologia de iogurte, em geral concorda-se que o iogurte deve conter aproximadamente proporções iguais de *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Arnott *et.al.*, 1974). O *S. thermophilus* tem seu crescimento inibido em pH 4,2 - 4,4, e o *L. bulgaricus* pode tolerar pH 3,5 - 3,8. Consequentemente, lactobacilos resistem melhor a valores de pH baixos e tendem a superar a população de estreptococos quando o pH é inferior à 4,0, o que é mais freqüentemente encontrado.

Arnott *et al.*.(1974) mostraram a relação existente entre o pH e o desenvolvimento de microrganismos. Ao final do período de fermentação do leite, deve ser encontrada uma proporção de 1 lactobacilo : 1 estreptococo, quando o valor de pH é em torno de 4,2-4,5.

A relação existente entre a alta concentração de estreptococos a um pH baixo é incomum. Isto pode indicar o desbalanceamento do fermento, que poderá conter mais estreptococos do que lactobacilos, ou a temperatura de inoculação mais baixa, favorecendo o crescimento deste microrganismo, pois ele é menos tolerante a temperaturas elevadas.

Na Tabela 3 encontram-se representadas as médias dos três lotes de fabricação, pois não houve diferença significativa entre os lotes. Pode ser notado que a relação 1:1 não ocorreu em nenhum dos iogurtes analisados. A proporção 1:2 ocorreu em 16,67% das amostras. No restante das amostras (83,33%), estreptococos foram predominantes. Entre os tratamentos, foram verificadas variações desde 1:4 à 1:2,3. O tratamento 1 foi o que apresentou maior valor de pH (4,26) e também a maior população de *Streptococcus*.



**TABELA 3.** Contagem e proporção de lactobacilos e streptococos em Iogurtes comercializados em Lavras – MG, em três lotes diferentes de fabricação

<b>TRATAMENTO</b>	<b>Lactobacilos</b>	<b>Streptococos</b>	<b>Proporção</b>
<b>1(sem sabor)</b>	11,60 b	46,75 b	1:4
<b>2 (com sabor)</b>	42,75 a	103,83 a	1:2,5
<b>3 (com sabor)</b>	37,75 ab	97,00 a	1:2,6
<b>4 (com sabor)</b>	33,66 ab	99,58 a	1:3
<b>5 (sem sabor)</b>	37,41 ab	107,16 a	1:2,9
<b>6 (com sabor)</b>	42,41 a	97,25 a	1:2,3

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

A alta incidência de relações indesejáveis pode decorrer de desbalanceamento inadequado da cultura, por pontos falhos na fabricação ou por causa do manuseio e condições de estocagem incorretas durante a fabricação e comercialização, provando assim a necessidade de mais cuidado no manuseio e processamento dos iogurtes comercializados em Lavras - MG.

### **2.3.3 População microbiana: total, leveduras e fungos filamentosos**

A população microbiana viável total, foi determinada em meio PCA, após 48 horas de incubação. Os dados da população microbiana total encontram-se na tabela 4. A contagem total em todas as amostras foi na ordem de  $10^7$  UFC/g.

**TABELA 4.** Contagem total de microrganismos (UFC/g) em iogurtes comercializados em Lavras – MG, coletados em três lotes diferentes de fabricação

TRATAMENTO	LOTES		
	I	II	III
1 (sem sabor)	$3,7 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
2 (com sabor)	$1,9 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
3 (com sabor)	$5,5 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$	$8,6 \times 10^7$
4 (com sabor)	$6,5 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
5 (sem sabor)	$1,8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
6 (com sabor)	$4,3 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$

A população microbiana total foi bastante diferente entre as amostras observadas (Tabela 4). Verificou-se interação significativa na população microbiana total, tanto entre os tratamentos (iogurtes) quanto entre os lotes analisados. No lote 1, não houve diferença significativa entre os tratamentos, apesar da diferença na população encontrada entre eles ter sido muito alta, como exemplo, de  $1,8 \times 10^7$  UFC/g nas amostras do iogurte 5, até valores de  $6,5 \times 10^7$  UFC/g nas amostras do iogurte 4.

No lote 2, não houve diferença significativa entre os tratamentos 1, 2 e 3. Estes diferiram, estatisticamente, apenas dos tratamentos 4, 5 e 6, que tiveram contagens inferiores aos demais, em torno de  $2 \times 10^7$  UFC/g (Tabela 4).

Nestes tratamentos, também foi analisada a população de leveduras. Para a enumeração deste grupo de microrganismo, utilizou-se o processo de contagem viável de placas, abaixando-se o pH do meio YW para 3,5, limitando o desenvolvimento de bactérias.

A população de leveduras dos iogurtes 1 e 3 foi acima do permitido pela legislação brasileira,  $> 10$  UFC/g (Tabela 5). As diferenças encontradas entre os

tratamentos foram significativas mas a adição de polpa de frutas nos Iogurtes 2,4 e 6 parece não ter contribuído para este acréscimo de população (Tabela 5).

TABELA 5. Contagem de leveduras (UFC/g) em iogurtes comercializados em Lavras – MG, coletados em três lotes diferentes de fabricação

TRATAMENTO	LOTES		
	I	II	III
1 (sem sabor)	790,25	214,00	89,92
2 (com sabor)	10,37	1,20	1,62
3 (com sabor)	2723,00	289,25	142,75
4 (com sabor)	13,72	1,65	12,90
5 (sem sabor)	43,95	2,60	1,00
6 (com sabor)	10,40	1,52	1,27

Dentre os iogurtes analisados, foram encontradas variações nas populações de leveduras desde 1 UFC/g até  $2,7 \times 10^3$  UFC/g.

A presença de leveduras e fungos filamentosos em iogurte é um indicativo de práticas sanitárias insatisfatórias na fabricação ou na embalagem. Iogurtes com açúcar ou frutas adicionados são especialmente susceptíveis ao crescimento de leveduras. Se forem usados padrões sugeridos por Amott *et. al.*, (1974), de < 10 UFC de leveduras e < 1 UFC de fungos filamentosos/g como satisfatórios e > 100 UFC de leveduras ou > 10 UFC de fungos filamentosos como não satisfatórios, então a maioria das amostras analisadas foram insatisfatórias, devido à alta contaminação por leveduras.

A população de leveduras no iogurte 3, independente do lote de fabricação, foi elevada e bem acima do permitido ( $1,4 \times 10^2$  -  $2,7 \times 10^3$  UFC/g). As maiores populações de leveduras foram encontradas no lote 1. Os iogurtes 2,

4 e 6 apresentaram uma contagem dentro do intervalo ideal, que é de 1 a 10 UFC/g (Tamime & Robinson, 1981) estando, portanto, aptos para o consumo.

Os tratamentos 1 e 3 dos lotes de fabricação 2 e 3, apesar de não diferirem estatisticamente dos demais, apresentaram valores bem elevados. Esse resultado foi devido ao erro experimental muito alto (770,68) (dados não mostrados), medido pela amplitude de contagem encontrada nas placas.

Vários estudos têm mostrado variações de população de leveduras: > 10 UFC/g (Jordano, 1986),  $10^6$  -  $10^7$  UFC/g (Fleet & Mian, 1987). As leveduras também foram citadas como uma das maiores fontes de contaminação dos iogurtes, ultrapassando o limite estabelecido para esse produto em 11 (10,63%) das amostras analisadas (Brazal Garcia *et al.*, 1986).

Em 1997, Hoffmann *et al.* fizeram um estudo em São José do Rio Preto, com 26 amostras de iogurte. Destas, 22,2% se mostraram em desacordo com a legislação brasileira, e portanto, não deveriam ser ingeridas, visto que poderiam acarretar dano à saúde pública.

Por causa de seu baixo pH, os iogurtes favorecem o crescimento de leveduras, (Fleet & Mian, 1987). A deterioração de iogurtes por leveduras é geralmente conhecida pelo desenvolvimento de “flavour” não característico ao produto, perda de textura devido à produção de gás e a dilatação da embalagem que ocorre no estágio final de deterioração do produto (Fleet, 1992).

A maioria dos iogurtes comercializados na cidade de Lavras - MG são com adição de frutas e preparados a partir de ingredientes de leite pasteurizado, leite em pó, açúcar, flavorizantes, xarope ou polpa de fruta, emulsificantes, estabilizantes e corantes. A contaminação por leveduras no produto final pode ter surgido deste material adicionado (frutas, açúcar, etc) e também devido à condições não higiênicas durante o processamento.

Para superar o risco deste tipo de contaminação, os produtores de iogurte ou os fornecedores de polpa, deveriam pasteurizar esse material imediatamente

antes do uso ou, adquirirem latas de frutas termoprocessadas adequadamente. Como o percentual de fruta adicionado pode constituir aproximadamente cerca de 10% do volume final do iogurte, é essencial que a fruta seja livre de leveduras viáveis. Refrigeração inadequada após envase e durante a comercialização provavelmente estimulam o crescimento de leveduras, considerando que a temperatura e o tempo de armazenamento têm influência na qualidade do produto e que grande parte dos pontos de venda apresentam condições inadequadas de conservação (Fleet & Mian, 1987).

É sabido que, com uma boa prática de fabricação, é possível obter iogurtes com contagens de levedura menor do que 1 UFC/g. Com armazenagem refrigerada adequada do produto, as contagens não devem exceder 10 UFC/g, após 3 a 7 dias de armazenagem.

Contagens de fungos filamentosos e de leveduras observadas neste trabalho podem ser devidas às matérias-primas de qualidade inadequada, ao meio ambiente, à existência de falhas na higienização dos equipamentos que entram em contato direto com o produto, àquelas ocorridas durante o processamento, ou ainda à manutenção do produto sob temperatura inadequada, que podem, por sua vez, acarretar produtos fora dos padrões microbiológicos recomendados ainda na própria indústria.

Para se evitar esta situação, é necessário maior rigor, desde a seleção de matérias-primas de boa qualidade até o cumprimento das medidas higiênico-sanitárias, bem como na estocagem, a fim de, dessa forma, poder oferecer ao consumidor um produto compatível com a legislação brasileira, quer no âmbito industrial, quer no comércio varejista.

## 2.3 CONCLUSÕES

- Com relação à proporção de lactobacilos e estreptococos, o desvio encontrado indica a possibilidade de ocorrência de um desbalanceamento do fermento no momento da inoculação, ou, ainda, ser atribuído ao uso de temperaturas inadequadas durante a inoculação. O uso de temperaturas inferiores a 41° C, pode ter favorecido a predominância de estreptococos.
- A população microbiana total apresentou diferenças significativas com relação aos lotes de fabricação tendo sido encontrados, nos lotes 2 e 3, os maiores valores populacionais.
- A população de leveduras nos iogurtes 1 e 3 mostrou-se acima do permitido pela legislação brasileira. Os tratamentos do lote 1 mostraram diferenças significativas, porém, a adição de polpa parece não ter contribuído para este aumento populacional.

## 2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. R. de. *Tecnologia e aproveitamento do leite*. Lavras: Faepe, 1997. 149p.
- AMIOT, J. *Ciência y tecnologia de la leche*. Traduzido por Rosa Oria Almudí. Zaragoza: Acribia, 1991. 547.
- ARNOTT, D. R.; DITSCHAEVER, C. L.; BULLOCK, D. H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontario. *Journal Milk, Food Technology*. Ames. V. 37, n.1, p. 11-13, Aug, 1974.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. *Aditivos Intencionais por Classe Funcional*. Atualizado pela ABIA em 15 de março de 1990. São Paulo, 1990, p. irr.

- BASTOS, M. do S.R. Informações de sistema de qualidade NB 9.000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT). Viçosa : UFV, 1995. 243p. (Tese - mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).**
- BRASIL Ministério da Agricultura. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília. 1981**
- BRASIL. Leis, decretos, etc., Portaria n. 001 de 28 de janeiro de 1987, Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial, Brasília, 25 de fev. 1987. Seção 1, p. 2764.**
- BRAZAL, G. T; RUIZ, L; ESPEJO DIAZ, M. Microbiological quality of natural and flavoured yoghurts, consumed in Alicante province. Alimentaria, Madrid., v.177, n.29, p.39-42, Set/Out, 1986.**
- CHR Hansen. Leites fermentados, microrganismos probióticos e saúde. Valinhos, n.38, p.2, Mar. 1997.**
- CLAUS, D. A standardized gram staining procedure. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Oxford, v.8, p. 451-452. 1992.**
- FLEET, G. Spoilage yeasts. Critical Reviews in Biotechnology, Boca Taton, v. 12, n. 1-2, p. 1-44, 1992.**
- FLEET, G.H; MIAN, M.A.A The occurrence and growth of yeasts in dairy products. International Journal os Food Microbiology. Amsterdam: Elsevier. V. 4, p. 145-155, Oct. 1987.**
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical manual for Foods. 3 ed. Washington: Dept. of Healt Education and Welfare. 1972. 114p.**
- HARRIGAN, W. F; Mc CANCE, M. E. Laboratory Methods in Food Dairy Microbiology, London: Academic Press, 1976. 353 p.**
- HOFFMANN, F. L; GARCIA-CRUZ, C. H; VINTURIM, T. M; FÁZIO, M. L. S; CARMELLO, M. T. Ocoorência de bolores e leveduras em iogurtes. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, Hotel Glória, novembro, 1997.**

- JORDANO, R. Hygiene quality of commercial yoghurts. *Alimentaria*. Madrid, v. 178, p. 27-30, 1986.
- KOCH, A. L. Growth measurement. In: GERHARDT, P. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981. Cap. 11, p. 179-207.
- SALINAS, R. J. Higiene quality of commercial yoghurts. *Alimentaria*, Madrid, v.178, p.27-30, 1986.
- SALJI, J. P; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage. *Journal of Food Science*, Chicago, v.48, n.1, p. 258-259, Jan/Feb. 1983.
- TAMIME, A. Y. ROBINSON, R. K. **Yogur; ciencia y tecnologia**. Traducido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns e Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991. 368p.
- WICKERHAM, L. J. **Taxonomy of yeasts. I – Technique of Classification**. Washington: D. C. U. S. Departament of Agriculture, 1951 (Technical Bulletin, 1029).



BIBLIOTECA CENTRAL - UFLA

## CAPÍTULO 3

### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS EM IOGURTES

#### RESUMO

Em princípio, a microbiologia dos iogurtes se limita às espécies inoculadas durante a fabricação, considerando “contaminantes” o resto dos microrganismos que possam estar presentes no produto. Leveduras e fungos filamentosos estão freqüentemente envolvidos na deterioração de iogurtes, sendo normalmente responsáveis pela presença de sabores estranhos, perda da qualidade de textura devido à produção de gás e do estufamento da embalagem, levando à perda do produto. No presente trabalho, isolaram-se fungos filamentosos e leveduras de quatro marcas de iogurtes, coletados em três lotes diferentes de fabricação, nos supermercados de Lavras-MG, Brasil, perfazendo um total de setenta e duas amostras. Espécies de *Monilia* e *Penicillium* foram isolados em 8 amostras de iogurtes, principalmente os que continham polpa de frutas. Um total de 596 leveduras foram isoladas e caracterizadas através de testes morfológicos e bioquímicos, para identificação quanto a espécie. Entre todas as amostras, as leveduras mais freqüentemente encontradas foram: *Debaryomyces hansenii* e *Saccharomyces cerevisiae*, que representaram 30% e 18%, respectivamente, entre as 11 espécies identificadas. As leveduras encontradas com menor freqüência foram: *Debaryomyces castelli* (1%) e *Schizosaccharomyces pombe* (0,6%), tendo como intermediárias *Hansenula sp.* (17%), *Mrakia frigida* (15%), *Candida maltosa* (8%), *Candida parapsilopsis* (7%) e *Pychia scolyti* (3%). *Kluyveromyces marxianus* e *Candida mogii*, que representaram menos de 1% do total. A natureza e o grau de contaminação também variaram com a temperatura ambiente, tendo o mês de abril apresentado os maiores índices de contaminação nas amostras observadas. Os dados, portanto, sugerem que a alta contaminação observada pode ter sido devido tanto ao alto nível de contaminação inicial quanto à refrigeração imprópria dos iogurtes durante o transporte e comercialização.

# ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS AND FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM YOGHURT

## ABSTRACT

In principle, the microbiology of yoghurts is limited to species of lactic-acid bacteria inoculated in the starter cultures before fermentation. All other micro-organisms present in yoghurts should be considered as contaminants. Yeasts are often responsible for spoilage of yoghurts. They are usually responsible for the development of yeasty off-flavours, loss of texture quality due to gas production and the swelling, and eventually blowing of the product container. This work reports the isolation and identification of filamentous fungi and yeasts from 72 commercial samples of yoghurts produced by four different manufacturers and sold in local supermarkets in the south of the state of Minas Gerais, Brazil. Samples were collected from 3 consecutive months during 1997. Species of *Monilia* and *Penicillium* were isolated in 8 yoghurt samples, mainly from fruit yoghurts. A total of 600 yeast strains were isolated and identified to species level by standard methods. Thirteen species were identified as follows (with frequency in parentheses): *Debaryomyces hansenii* (30%), *Saccharomyces cerevisiae* (18%), *Hansenula sp.* (17%), *Mrakia frigida* (15%), *Candida maltosa* (8%), *Candida parapsilopsis* (7%), *Pichia scolyti* (3%), *Debaromyces castelli* (1%), *Leucosporidium gelidium* (0,6%), *Schizosaccharomyces pombe* (1%), *Kluyveromyces marxianus* (0,2%) and *Candida mogii* (0,2%). The nature and degree of contamination also varied with the ambient temperature. Samples collected in April showed the highest levels of contamination. These data therefore suggested that the extent of contamination observed could be due to both high initial contamination level and improper refrigeration of these marketed yoghurts.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Tendo em vista a importância do leite e seus derivados como produtos de consumo da população, a implantação de sistemas de qualidade torna-se uma necessidade. As empresas devem objetivar: qualidade, produtividade e aceitação dos seus produtos no mercado interno e externo (Bastos, 1995).

O controle de fungos filamentosos e leveduras num produto lácteo fermentado como o iogurte é de importância fundamental, uma vez que a população destes microrganismos é que irá determinar a vida de prateleira do produto (Fleet & Mian, 1997).

Inúmeras pesquisas têm sido executadas para melhoria da qualidade de iogurtes e outros produtos fermentados (Fleet & Mian, 1987; Arnott *et al.*, 1974; Suriyarachchi & Fleet, 1981). Um dos grandes problemas que têm contribuído para a perda do produto e, conseqüentemente, acarretado prejuízos para a indústria, é a presença de contaminantes, que podem causar alterações de sabor, cor e também estufamento de embalagem nas prateleiras refrigeradas de comercialização (Suriyarachchi & Fleet, 1981).

O baixo pH do iogurte limita muito a proliferação de microrganismos, com exceção das leveduras e fungos filamentosos. A deterioração de iogurtes por leveduras é geralmente conhecida pelo desenvolvimento de "flavour" não característico, perda de textura devido à produção de gás e à dilatação da embalagem que ocorre no estágio final de deterioração do produto. A presença deste microrganismo está normalmente associada à falta de higiene durante o processamento, principalmente durante o envase (Fleet, 1992).

Para verificar a qualidade de iogurtes comercializados no sul de Minas Gerais, foram enumerados e selecionados para identificação, leveduras e fungos filamentosos. Resultados de estudos descritos neste trabalho poderão servir para

tomar as indústrias de laticínios e agências reguladoras conscientes da importância de verificar a qualidade microbiana dos iogurtes.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtenção dos isolados**

Os isolados foram obtidos de quatro (4) marcas diferentes de iogurtes, com e sem adição de polpa de frutas, num total de seis (6) tratamentos com 3 repetições. As 72 amostras foram coletadas mensalmente nos meses de abril, maio e junho, em estabelecimentos comerciais de Lavras - MG.

### **3.2.2 Manutenção dos isolados**

Para a minimização das perdas de viabilidade celular das culturas de levedura, os isolados foram mantidos a 4°C, em meio YW (Wickerham, 1951), com óleo mineral na superfície e submetidos a repiques periódicos.

### **3.2.3 Caracterização das leveduras**

O estudo taxonômico das leveduras foi efetuado utilizando-se a metodologia recomendada por Kreger-van Rij (1984), que consiste na classificação baseada em testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

#### **3.2.3.1 Morfologia: Microcultivo**

Algumas leveduras apresentam a característica de formar pseudomicélio, micélios verdadeiros e/ou artrósporos em determinados meios de cultura. Culturas de leveduras foram inoculadas em lâminas escavadas, contendo meio de cultivo YW e recobertas com lamínulas estéreis para a observação destas características. As lâminas foram incubadas a 27°C e observadas em microscópio óptico (Ken-A-Vision), após 5 a 7 dias de incubação. Foram

observadas características como formação de pseudomicélio, formação de esporos e tipo de reprodução. Estas características foram anotadas para comparação com a literatura (Kreger-Van Rij, 1984).

### 3.2.3.2 Testes fisiológicos e bioquímicos

Determinadas as principais características morfológicas das culturas, foram realizados os testes fisiológicos e bioquímicos.

- **Fermentação de carboidratos**

As linhagens foram testadas quanto à capacidade de fermentar diferentes carboidratos. Os carboidratos testados foram: glicose, sacarose, maltose. Os açúcares foram esterilizados em autoclave à 110<sup>o</sup>C/10 minutos, exceto a sacarose, que foi esterilizada por filtração (Millipore) em membranas de celulose (0,45 µm) e estocadas em soluções aquosas a 6%.

Em tubos de ensaio contendo 2 ml de meio basal (0,45% de extrato de levedura, 0,75% de peptona), foi acrescentado 1,0 ml do carboidrato a ser testado. A inoculação foi feita utilizando-se uma alça de platina estéril a partir de placas de petri com crescimento das culturas de 24 a 48 horas em meio YW a 27<sup>o</sup>C em uma estufa incubadora. As observações foram feitas por um período máximo de 21 dias. O potencial fermentativo foi registrado, considerando-se:

**positivo:** tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em 1 a 3 dias de incubação.

**lento:** tubo de Durham com 1/3 a 3/3 de gás em período superior a 3 dias.

**fraco:** tubo de Durham com apenas bolhas de gás.

**negativo:** ausência de produção de gás.

- **Testes empregando a técnica de “Replica Plate”**

Utilizou-se a técnica de “replica plate” para testes de assimilação de compostos de carbono, assimilação de compostos nitrogenados, resistência a pressão osmótica (osmotolerância), síntese de compostos semelhantes ao amido e resistência a cicloheximida (Lachance, 1987).

A técnica do “replica plate”, utilizada neste trabalho, consiste no emprego de um multi-inoculador, que permite inocular 21 culturas diferentes em uma placa de petri.

- **Assimilação de diferentes fontes de carbono**

O inóculo utilizado para os testes foi preparado a partir de culturas crescidas em YW por 48 horas, que foram transferidas para ependorffs contendo água destilada estéril. Decorrido este período, alíquotas de cerca de 0,3 ml dessa suspensão celular foram transferidas para os orifícios da placa matriz do multi-inoculador, para serem inoculadas nas placas testes.

Para a caracterização das linhagens isoladas foram testadas as seguintes fontes de carbono: glicose, galactose, maltose, rafinose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, inulina, amido solúvel, D-manitol, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, glicerol, galactitol (dulcitol), D-glucitol (sorbitol), metanol, ácido succínico, citrato de sódio e salicina.

As placas foram incubadas por 21 dias, a 30°C. Foram realizadas três leituras, com intervalos de 7 dias após a de inoculação. Foram utilizados como controle positivo uma placa com YNB ágar e glicose e como controle negativo placas somente com YNB ágar.

- **Assimilação de compostos nitrogenados**

Para os testes de assimilação de compostos nitrogenados, foi utilizado o mesmo método empregado para assimilação de fontes de carbono, mudando-se

apenas o controle positivo, que foi feito utilizando-se uma placa com YNB ágar e glicose, e o controle negativo com placas contendo somente YCB ágar. As fontes de nitrogênio testadas foram: nitrato de potássio (0,78g/100ml) e L-lisina (0,56g/ml).

- **Osmotolerância a 10% de NaCl**

Para o teste de osmotolerância foi utilizado o meio basal (glicose 7%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%). O teste de tolerância à alta concentração de sal (NaCl 10%) foi realizado pela técnica de “replica plate”. As placas foram incubadas a 27°C e as leituras realizadas em 7, 14 e 21 dias de incubação.

- **Resistência à cicloheximida**

A capacidade das leveduras em suportar altos teores de cicloheximida (actidiona) foi verificada utilizando-se a técnica “replica plate”. A cicloheximida foi testada nas concentrações de 100 ppm → 0,1g cicloheximida e 1000 ppm → 0,01g cicloheximida (YNB-0,67%; Ágar-2%; Glicose-1%; + 2ml de acetona) (Kurtzman & Fell, 1998).

- **Crescimento a 35 e 37°C**

Foi verificada a capacidade de crescimento das culturas a 35 e 37°C utilizando-se o meio YW líquido. Os tubos de ensaio foram inoculados e incubados em banho - maria. As leituras foram realizadas através da verificação de turbidez do meio após 48 horas de incubação.

- **Distribuição de freqüência**



Depois de identificados, foi realizada a distribuição de frequência dos isolados para cada tratamento, em cada um dos diferentes lotes de fabricação de coleta.

- **Caracterização dos fungos filamentosos**

Os isolados de fungos filamentosos foram identificados observando características culturais, morfológicas e microscópicas, de acordo com a descrição de Alexopoulos *et al.*, (1996).

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Identificação das leveduras quanto a espécie**

Foram isolados 596 linhagens de leveduras nos três lotes diferentes de fabricação e nos seis tratamentos realizados. Estes isolados, após testes de caracterização, foram classificados em 11 espécies diferentes.

Muitos dos isolados variaram das descrições de espécies conhecidas e isoladas em iogurtes, confirmando a necessidade de maiores estudos taxonômicos de leveduras originadas de iogurte.

- **Leveduras encontradas nos diferentes tratamentos e lotes diferentes de fabricação**

A diversidade e a frequência das espécies de leveduras, podem ser encontradas na Tabela 1 e Figura 1, respectivamente.

TABELA I. Diversidade de leveduras isoladas de iogurtes coletados em três lotes diferentes de fabricação, em estabelecimentos de Lavras - MG

TRATAMENTOS		LOTESENDE FABRICAÇÃO	
I (sem sabor)	<i>Mrakia frigida</i> (88) <sup>#</sup> <i>Candida maltosa</i> (25) <sup>#</sup> <i>C. parapsilopsis</i> (12) <sup>#</sup> <i>Schiz. pombe</i> (4) <sup>#</sup> <i>K. marxianus</i> (1) <sup>#</sup> <i>C. mogii</i> (1) <sup>#</sup> <i>C. parapsilopsis</i> (3) <sup>#</sup>	I	II
2 (com sabor)	<i>Deb. hanseni</i> (19) <sup>#</sup> <i>P. scolyti</i> (4) <sup>#</sup> <i>Deb. castelli</i> (2) <sup>#</sup>	III	
3 (com sabor)	<i>C. parapsilopsis</i> (28) <sup>#</sup> <i>Deb. hanseni</i> (27) <sup>#</sup> <i>C. maltosa</i> (21) <sup>#</sup> <i>Deb. hanseni</i> (32) <sup>#</sup>		
4 (com sabor)	<i>Deb. hanseni</i> (13) <sup>#</sup> <i>P. scolyti</i> (4) <sup>#</sup> <i>Deb. castelli</i> (3) <sup>#</sup> <i>Deb. hanseni</i> (39) <sup>#</sup> <i>P. scolyti</i> (7) <sup>#</sup>	<i>Sacch. cerevisiae</i> (45) <sup>#</sup> <i>Hansenula sp.</i> (15) <sup>#</sup> <i>Mrakia frigida</i> (1) <sup>#</sup> <i>Sacch. cerevisiae</i> (44) <sup>#</sup>	
5 (sem sabor)	<i>Deb. hanseni</i> (10) <sup>#</sup> <i>Deb. hanseni</i> (7) <sup>#</sup> <i>P. scolyti</i> (1) <sup>#</sup>	<i>Sacch. cerevisiae</i> (7) <sup>#</sup>	
6 (com sabor)	<i>Deb. hanseni</i> (20) <sup>#</sup> <i>C. parapsilopsis</i> (8) <sup>#</sup> <i>Hansenula sp.</i> (24) <sup>#</sup> <i>Deb. castelli</i> (1) <sup>#</sup>	<i>Sacch. cerevisiae</i> (12) <sup>#</sup>	
	<i>Deb. castelli</i> (2) <sup>#</sup> <i>P. scolyti</i> (2) <sup>#</sup> <i>Deb. hanseni</i> (8) <sup>#</sup>		

A população elevada de leveduras, em alguns tratamentos, não refletiu na diversidade de espécies. Por exemplo, o iogurte I do primeiro lote de fabricação apresentou uma contagem de 790,25 UFC/g (dados não mostrados), sendo encontradas 6 espécies diferentes de leveduras. Entretanto, no iogurte 3 da primeiro lote de fabricação, a população leveduriforme foi 3,5 vezes maior que a anterior e apenas 3 espécies diferentes foram encontradas.

Entre todas as amostras, as leveduras mais frequentemente encontradas foram: *Debaryomyces hanseni* e *Saccharomyces cerevisiae*, que representaram 30% e 18%, respectivamente, entre as 11 espécies identificadas (Figura 1). As leveduras encontradas com menor frequência foram: *Debaryomyces castelli*

(1%) e *Schizosaccharomyces pombe* (0,6%), tendo como intermediárias *Hansenula sp.* (17%), *Mrakia frigida* (15%), *Candida maltosa* (8%), *Candida parapsilopsis* (7%) e *Pychia scolyti* (3%). *Kluyveromyces marxianus* e *Candida mogii* foram encontradas com frequências menores que (1%).

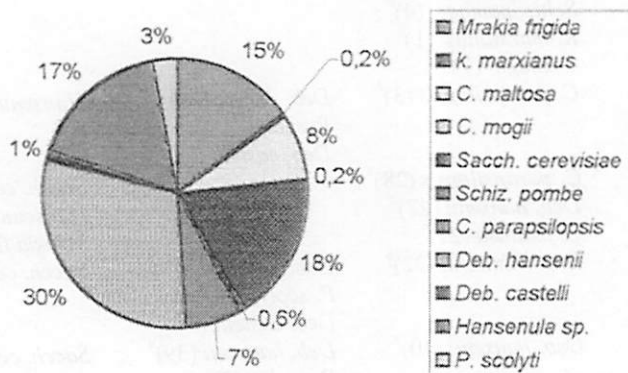


FIGURA 1. Ocorrência de leveduras em iogurtes coletados em diferentes lotes de fabricação, na cidade de Lavras -MG (abril/maio/junho).

No iogurte 1 do primeiro lote (abril 1997) (Figura 2), a espécie de levedura isolada com maior frequência foi *Mrakia frigida* (67%), seguido de *Candida maltosa* (19%), *Candida parapsilopsis* (9%), *Schizosaccharomyces pombe* (3%), *Kluyveromyces marxianus* (1%) e *Candida mogii* (1%).

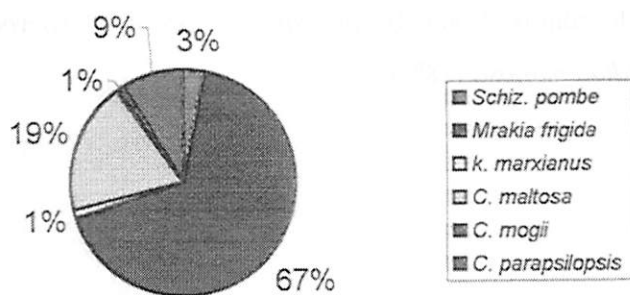


FIGURA 2. Ocorrência de leveduras no iogurte 1 do primeiro lote (abril - 1997)

No iogurte 2 do primeiro lote (Figura 3), apenas 2 leveduras foram encontradas: *Candida maltosa* (40%) e *Candida parapsilopsis*, aparecendo com maior frequência (60%).

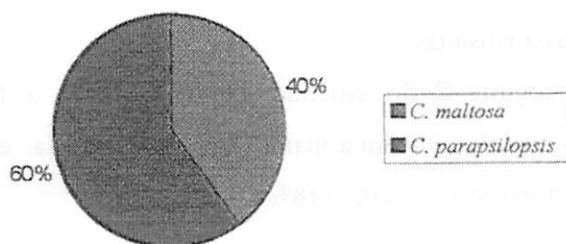


FIGURA 3. Ocorrência de leveduras no iogurte 2 da primeiro lote (abril - 1997)

No iogurte 3 do primeiro lote (Figura 4), houve a ocorrência de 3 espécies de leveduras: *Candida parapsilopsis* (36%), *Debaryomyces hansenii* (36%) e *Candida maltosa* (28%).

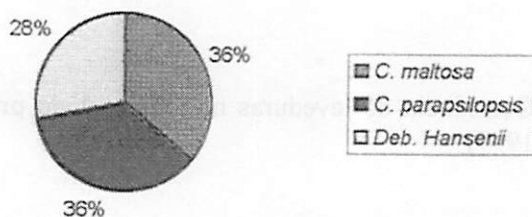


FIGURA 4. Ocorrência de leveduras no iogurte 3 do primeiro lote (abril - 1997)

Nos iogurtes 4, 5 e 6 da primeiro lote e no iogurte 1 do segundo lote (maio 1997) foi encontrada apenas a espécie *Debaryomyces hansenii* em 100% das amostras analisadas.

No iogurte 2 do segundo lote (Figura 5), a freqüência da espécie *Debaryomyces hansenii* foi a maior (76%), seguida das espécies *Pychia scolyti* (16%) e *Debaryomyces castelli* (8%).

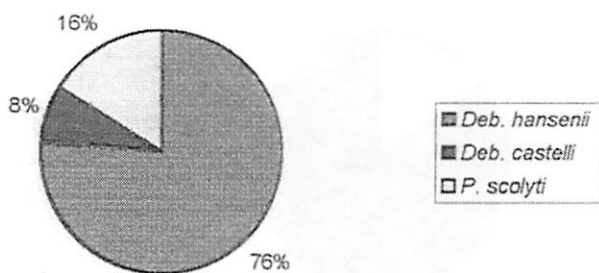


FIGURA 5. Ocorrência de leveduras no iogurte 2 do segundo lote (maio - 1997)

No iogurte 3 do segundo lote, não foi verificada a ocorrência de nenhuma espécie de levedura, indicando que este iogurte teve um bom controle de qualidade, estando apto para consumo.

No iogurte 4 do segundo lote (Figura 6), foram encontradas as espécies *Debaryomyces hansenii*, *Pychia scolyti* e *Debaryomyces castelli* nas frequências 65%, 20% e 15%, respectivamente.

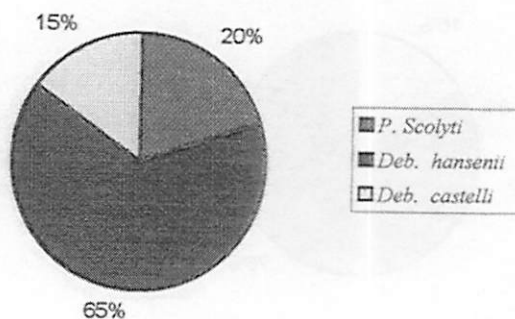


FIGURA 6. Ocorrência de leveduras no iogurte 4 do segundo lote (maio - 1997)

No iogurte 5 do segundo lote (Figura 7), foi verificada a presença de 3 espécies: *Debayromyces hansenii* (83%), *Pychia scolyti* (15%) e *Debayromyces castelli* em (2%) das amostras.

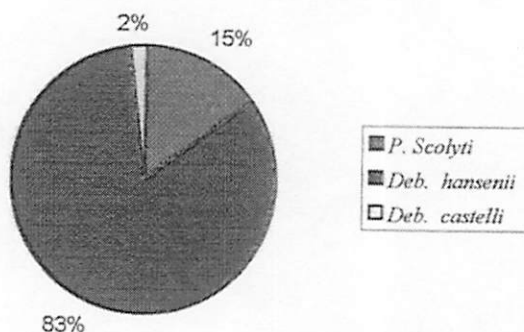


FIGURA 7. Ocorrência de leveduras no iogurte 5 do segundo lote (maio - 1997)

No iogurte 6 do segundo lote (Figura 8), quatro espécies de leveduras foram identificadas, sendo *Hansenula sp.* a espécie de maior frequência (66%), e também encontrada no iogurte 1 do terceiro lote de fabricação (junho 1997), em 100% das amostras. As outras espécies, *Debaryomyces hansenii*, *Pychia scolyti* e *Debaryomyces castellii* foram encontradas com frequências de 22%, 6% e 6% respectivamente.

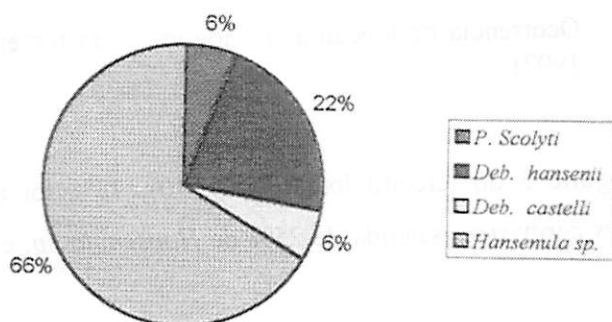


FIGURA 8. Ocorrência de leveduras no iogurte 6 do segundo lote de fabricação (maio - 1997)

Isolados pertencentes ao gênero *Hansenula sp.* foram encontrados em 96% das amostras do iogurte 2 do lote 3 e a espécie *Mrakia frigida* em 4% das amostras (Figura 9).



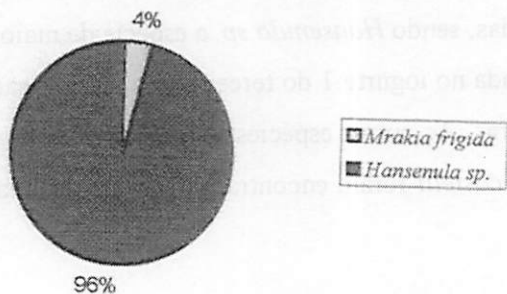


FIGURA 9. Ocorrência de leveduras no iogurte 2 do terceiro lote (junho - 1997)

No iogurte 3 do terceiro lote (Figura 10), 73% foi a frequência de *Saccharomyces cerevisiae*, seguida de 25% de *Hansenula sp.* e 2% de *Mrakia frigida*.

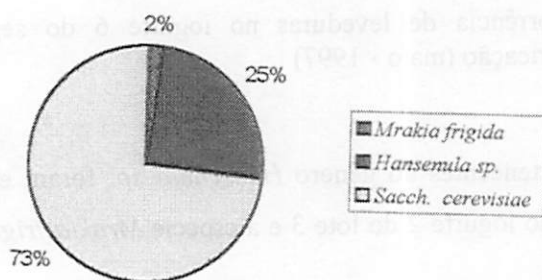


FIGURA 10. Ocorrência de leveduras no iogurte 3 do terceiro lote de fabricação (junho - 1997)

Nos iogurtes 4, 5 e 6 do terceiro lote de fabricação, houve a ocorrência apenas da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (100% das amostras analisadas).

Com relação aos fungos filamentosos, foi verificada sua presença apenas no primeiro lote de fabricação (abril 1997). No tratamento 2, foram encontradas 21 UFC/g de fungos filamentosos, sendo 17 UFC/g pertencentes ao gênero *Monilia* e 4 do gênero *Penicillium*. No tratamento 3, foram encontradas 6 UFC/g sendo todas pertencentes ao gênero *Monilia*.

- Características das espécies isoladas

Os isolados foram identificados comparando as características encontradas com a descrita na literatura (Kreger Van Rij, 1984). Em alguns casos, os isolados divergiram em alguns testes quando comparados com a descrição padrão.

*Kluyveromyces marxianus*: apenas uma linhagem do lote 1 foi identificada como sendo desta espécie. Todos os testes bioquímicos estiveram de acordo com a descrição, exceto para o teste de formação de película (positivo na descrição). Esta espécie já foi descrita em manteiga de leite e leite fermentado (Kreger Van Rij, 1984) e em iogurtes (Fleet & Mian, 1987). *K. marxianus* é normalmente encontrado em frutas e sua capacidade de utilizar a lactose justifica sua presença em produto lácteos.

*Schizosaccharomyces pombe*: Somente 1 isolado no primeiro lote analisado, foi descrito como sendo desta espécie. Esta linhagem não divergiu em nenhum teste quando comparado com a descrição padrão. Esta linhagem ascomicética foi descrita em sucos de uva, cana-de-açúcar e maçã (Kreger van Rij, 1984).

*Mrakia frigida*: 190 isolados da amostragem do primeiro lote de fabricação e dois da amostragem do terceiro lote foram identificadas como sendo desta espécie. Este gênero pertence à divisão Basidiomycota e é

caracterizado por crescer em baixas temperaturas. Os isolados classificados como sendo pertencentes à esta espécie foram também amido positivos, diferente da descrição padrão (Kurtzman & Fell, 1998).

*Candida parapsilosis*: 47 linhagens do lote de fabricação 1 foram identificadas como *C. parapsilosis*, divergindo no teste de assimilação de D-xilose (positivo na descrição), melibiose e rafinose (ambas respostas negativas na descrição). Esta espécie já foi descrita em ambientes aquáticos, em frutas tropicais, associada ao homem e outros mamíferos (Kreger-van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1983).

*Candida mogii*: Somente 1 isolado do lote 1 foi identificado como sendo desta espécie. Esta linhagem confirmou a totalidade dos testes bioquímicos com relação à descrição padrão, e divergiu apenas no teste de assimilação de celobiose (negativo na descrição). Foi verificada a presença desta espécie em queijos (Fleet, 1992).

*Candida maltosa*: Esta espécie foi representada por 52 linhagens do lote de fabricação 1. Diferiram da descrição no teste de assimilação de melibiose, rafinose e D-arabinose. A presença desta espécie já foi encontrada em solo, ar e lodo (Kreger-van Rij, 1984).

*Pichia scolyti*: 18 linhagens do lote 2 foram identificadas como sendo desta espécie. Estas linhagens confirmaram com totalidade os testes bioquímicos. Esta espécie foi descrita em fezes de insetos (Kreger-Van Rij, 1984).

*Debaryomyces castelli*: Apenas 8 linhagens do lote 2 pertencem à esta espécie. Elas não cresceram a 37°C, sendo então identificadas como tal.

*Debaryomyces hansenii*: 174 isolados, incluindo linhagens dos lotes 1 e 2 foram identificados como *Deb. Hansenii*. Todos os isolados confirmaram com totalidade os testes bioquímicos e morfológicos, exceto 3 linhagens do lote 1.

Esta espécie foi descrita em queijo, ar, solo, vinho branco, pele humana e micose entre os dedos (Kreger-Van Rij, 1984).

*Hansenula sp.*: 98 isolados do lote 3 diferiram da descrição padrão em testes importantes, não sendo possível classificá-las em nível de espécie. Estes isolados aproximaram-se muito na descrição feita por Kreger-van Rij, (1984), com o gênero *Hansenula sp.*, mas divergiram no teste de assimilação de lactose. Este gênero também foi encontrado em iogurtes, num trabalho de Suriyarachchi e Fleet (1981). Provavelmente, estes isolados sejam uma variedade diferente. É possível que as culturas que divergiram na descrição padrão da espécie neste trabalho e que foram isoladas de iogurtes no mesmo lote possam apresentar novos biotipos, ou até variedades diferentes entre grupos da mesma espécie.

*Saccharomyces cerevisiae*: O restante das linhagens do lote de fabricação 3 (100) foram identificadas como sendo desta espécie. Todos os testes bioquímicos foram iguais de acordo com a descrição. Esta espécie foi descrita em vinhos, queijos, suco de maçã, mel, solo, pele humana e boca (Kreger-van Rij, 1984).

Espécies fermentativas identificadas representaram 100% dos isolados, o que era esperado para leveduras que deterioram iogurte.

As espécies *Debaryomyces hansenii*, *Mrakia frigida* e *Hansenula sp.* foram capazes de assimilar lactose, indicando que o iogurte é um substrato bom para seu desenvolvimento. Aliado a isto, algumas espécies como *K. marxianus* e *Sacch. cerevisiae* podem se desenvolver em temperaturas de 10°C. Isolados de *Kluyveromyces marxianus* e *Deb. Hansenii*, foram também encontradas em “feta cheese” (queijo grego) e “Labaneh”(leite de égua fermentado) (Westall e Filtenborg, 1998; Yamani e Abujaber, 1994). *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada de “morello” (queijo espanhol), óleo vegetal e “labaneh” (Stollarova, 1996; Okpokwasili e Molokwu, 1996; Yamani e Abujaber, 1994).

Uma vez que os iogurtes são estocados à temperatura de refrigeração, esta foi provavelmente a principal razão da predominância das espécies encontradas nas amostras analisadas. Além da capacidade de crescer a baixas temperaturas, isolados de *Sacch. cerevisiae* são também capazes de utilizar o ácido láctico e fermentar vigorosamente a sacarose. Outras propriedades de determinadas espécies de leveduras também podem ter contribuído para o aparecimento nas amostras analisadas de iogurte. Por exemplo, *K. marxianus*, *Schiz. pombe*, *Mrakia frigida*, *Debaryomyces hansenii*, *P. scolyti*, *Deb. castelli* e *Hansenula sp.*, são espécies que fermentam vigorosamente a sacarose.

A presença destas espécies em iogurtes, especialmente nas variedades com polpa de frutas, pode ser explicada pela presença de altas concentrações de sacarose nestes produtos, e isto atua como um substrato de crescimento (Fleet & Mian, 1987).

### 3.4 CONCLUSÕES

- O estudo da flora leveduriforme mostrou a presença de 11 espécies diferentes (*Debaryomyces hansenii*, *Candida maltosa*, *Candida parapsilopsis*, *Pychia scolyti*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida mogii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces castelli*, *Mrakia frigida*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Hansenula sp*) considerando que, nos iogurtes sem sabor, houve a predominância de: *Mrakia frigida*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula sp.*, e *Candida maltosa*. *Debaryomyces hansenii* foi a única espécie encontrada em dois lotes diferentes de fabricação (Abril e Maio).
- No lote de fabricação 1 (abril - 1997), nos iogurtes com sabor houve predomínio de *Debaryomyces hansenii*, seguida de

*Candida parapsilopsis*. e *Candida maltosa*. No lote de fabricação 2 (maio -1997), houve o predomínio de *Debaryomyces hansenii* e *Hansenula sp.* Já no lote de fabricação 3 (junho - 1997), *Saccharomyces cerevisiae* predominou , representando 58% do total de isolados, seguido de *Hansenula sp.* (41%).

- Com relação aos fungos filamentosos, a presença dos gêneros *Monilia* e *Penicillium*. foi verificada nos iogurtes 2 e 3 (adicionados de polpa de frutas) da lote de fabricação 1 (abril - 1997).
- A capacidade de utilizar lactose e/ou sacarose e crescer a baixas temperaturas, selecionou as leveduras encontradas nos iogurtes analisados;
- Pode-se inferir que a diversidade de espécies encontradas foi um reflexo das baixas condições de higiene durante a produção/empacotamento do produto.

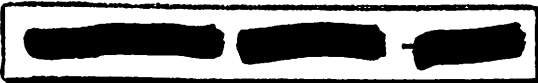
### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOTT, D. R; DUTSCHAEVER, C. L; BULLOCK, D. H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontario. **Journal Milk, Food Technology**. Ames. v.37, n.1, p.11-13, Aug, 1974.

ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: Jhon Wiley & Sons, Inc. 1996. 869p.

BASTOS, M. do S.R. **Implantação de sistema de qualidade NB 9000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT)**. Viçosa: UFV, 1995. 243p. (Tese-mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).

BARNETT, J. A. The nutritional test in yeasts systematics. **Journal of General Microbiology**, London, v. 99, p. 183-190, 1977.

  
BARNETT, J. A; PAINE, R. W; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification.** Cambridge, Cambridge: University Press, 1983. 811p.

FLEET, G.H. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 12, n. 1-2, p. 1-44, 1992.

FLEET, G. H; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology.** Amsterdam: Elsevier. v. 4, p. 145-155., Oct. 1987.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts, A Taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier. 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. **The Yeasts, A taxonomic study.** Amsterdam: Elsevier. 1998. 1055p.

LACHANCE, M. A. Approaches to yeast identification. In: BERRY, D. R; RUSSEL, I. R; STEWART, G. G. (ed). **Yeast Biotechnology.** London: Allen & Unwin, 1987. p. 33-48

LODDER, J. **The Yeasts: a taxonomic study.** Amsterdam: North Holland Publ, 1970. 1385p.

OKPOKWASILI, G. C; MOLOKWV, C. N. Yeast and mould contaminants of vegetable oils. **Bioresource Technology.** Kidlington, v. 57, n. 3, p. 245-249, 1996.

SARAI, I; PIUSSI, D; AQUILI, V; STECCHINI, M. L. The behavior of yeasts populations in stracchino cheese packaged. **Journal of Food Protection.** Iowa, v. 59, n. 5, p. 541-544, 1996.

STOLLAROVA, V. Composition of yeast population of the fruitz morello cherries. **Biologia.** Lahore, v. 51, n. 6, p. 655-659, 1996.

SURIYARACHCHI, V. R; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. **Applied and Environmental Microbiology.** Washington, v. 42, n. 3, p. 574-579. Oct. 1981.

WESTALL, S; FILTENBORG, O. Yeast occurrence in danish feta cheese. **Food Microbiology**. London, v. 15, n. 2, p. 215-222, 1998.

WICKERHAM, L. J. **Taxonomy of yeasts. I - Technique of Classification**. Washington: D. C. U. S. Department of Agriculture, 1951. (Technical Bulletin, 1029).

YAMANI, M. I; ABUJABER, M. M. Yeast flora of labaneh produced by in-bag straining of cow set yogurt. **Journal of Dairy Science**. Illinois, v. 77, n. 12, p. 3558-3564, 1994.



## ANEXOS

### PROVAS BIOQUÍMICAS

#### *Mrakia frigida* (KURTZMAN & FELL -1998)

##### Fermentação

Glicose +, s

Sacarose +

Maltose +, w

##### Assimilação

galactose +

sacarose +

maltose +

celobiose +

trealose +

lactose -

rafinose +

amido solúvel +, w

D-xilose +

L-arabinose +

D-ribose +, w, s

L-ramnose +

melibiose -

D-manitol +

ácido succínico -

ácido cítrico -

metil D-glucosídeo -

NO<sub>3</sub> +

---

(+) forte; (-) negativo; (w) fraco; (v) variável; (s) lento.

#### *Candida maltosa* (KOMAGATA, NAKASE ET KATSUYA - 1964) sinônimo: *Candida subtropicalis*

##### Fermentação

glicose +

sacarose +

maltose +, w ou s

##### Assimilação

galactose +

L-sorbose +, s

sacarose +

maltose +

celobiose + ou s

amido solúvel -

D-xylose +

L-arabinose -

D-arabinose -

D-ribose -

D-glucitol +

salicina +

ác. succínico +

NO<sub>3</sub> -

37°C +

trealose +	L-ramnose -
lactose -	glicerol +
melibiose -	galactitol -
rafinose -	D-manitol +

---

*Candida parapsilopsis* (ASH FORD) LANGERON ET TALICE (1932)  
sinônimo: *Monilia parapsilopsis*

Fermentação

glicose +  
sacarose -, + ou w  
maltose -, + ou w

Assimilação

galactose +	melibiose -	D-arabinose -	NO <sub>3</sub> -
L-sorbose v	rafinose -	D-ribose v	37°C +
sacarose +	amido solúvel -	L-ramnose -	
maltose +	D-xylose +	glicerol +	
celobiose -	galactitol -	D-glucitol +	
trealose +	D-manitol +	ácido succínico v	
lactose -	L-arabinose +	ácido cítrico	

---

*Candida mogii* VIDAL - LEIRIA (1967) sinônimo: *Torulopsis miso*

Fermentação

glicose +  
sacarose +  
maltose +, s ou -

Assimilação

galactose +	amido solúvel +, s ou -	D-glucitol +, s ou -
L-sorbose -	D-xylose +	salicina -
sacarose +	L-arabinose +	ác. succínico +
maltose +	D-arabinose +, s ou -	ác. cítrico +
celobiose -	D-ribose +	metil-D glucosídeo +, s ou -
trealose +	L-ramnose -	NO <sub>3</sub> -
lactose -	glicerol +	37°C +
melibiose -	galactitol +, s ou -	
rafinose +	D-manitol +	

*Schizosaccharomyces pombe* (LINDNER - 1893)

Fermentação

glicose +  
sacarose +  
maltose +

Assimilação

galactose -	rafinose +	D-manitol -
sacarose +	amido solúvel -	ácido succínico -
maltose +	D-xylose -	ácido cítrico -
celobiose -	L-arabinose -	NO <sub>3</sub> -
trealose -	D-ribose -	37°C +
lactose -	L-ramnose -	

---

*Kluyeromyces marxianus* (HANSEN) VAN DER WALT VAR. LACTIS (DOMBROWSKI) JOHANNSEN ET VAN DER WALT (1980). sinônimos: *Saccharomyces lactis* / *K. lactis* / *Zygosaccharomyces lactis*

Fermentação

glicose +  
sacarose v  
maltose v

Assimilação

galactose +	rafinose v	D-manitol +
sacarose +	amido solúvel -	ácido succínico +
maltose v	D-xylose v	ácido cítrico -
celobiose +	L-arabinose -	NO <sub>3</sub> -
trealose +	D-ribose -	37°C -, + ou s
lactose +	L-ramnose -	100 ppm cicloheximida +

---

*Saccharomyces cerevisiae* (MEYEN, HANSEN, 1883)

Fermentação

glicose +  
sacarose v  
maltose -

Assimilação

galactose v	rafinose v	D-manitol v
sacarose v	amido solúvel v	ácido succínico -, +, s
maltose v	D-xylose -	ácido cítrico -
celobiose -	L-arabinose -	NO <sub>3</sub> -
trealose v	D-ribose -	37°C v
lactose -	L-ramnose -	100 ppm cicloheximida -

---

*Pychia scolyti* (PHAFF ET YONEYAMA) KREGER-VAN RIJ (1964)

sinônimo: *Endomycopsis scolyti*

Fermentação

glicose +, w ou s
sacarose -, + ou w
maltose -, + ou w

Assimilação

galactose +	rafinose +	D-manitol +
sacarose +	amido solúvel -	ác. succínico +
maltose +	D-xylose +	ác. cítrico +
celobiose +	L-arabinose +	inulina -
trealose +	D-ribose +	D-arabinose v
lactose -	L-ramnose +	glucitol (sorbitol) +
L-sorbose -	melibiose +	metil D-glucosídeo +
salicina +	NO <sub>3</sub> -	osmolaridade v
37°C v		

---

*Debaryomyces hansenii* (ZOPF) LODDER ET KREGER-VAN RIJ (1952)

sinônimos: *Torulasporea hansenii*/ *Saccharomyces hansenii*

Fermentação

glicose +, v, w ou -
sacarose +, v, w ou -
maltose +, v, w ou -

Assimilação

galactose +	rafinose +	D-manitol +
sacarose +	amido solúvel +	ácido succínico +
maltose +	D-xylose +	ácido cítrico v

celobiose +  
trealose +  
lactose v

L-arabinose +  
D-ribose v  
L-ramnose v

NO<sub>3</sub> -  
37°C v

---

*Debaryomyces castelli* (CAPRIOTTI -1958) sinônimo: *Torulasporea castelli*

Fermentação

glicose +  
sacarose +  
maltose +, w ou s

Assimilação

galactose +  
sacarose +  
maltose +  
celobiose +  
trealose +  
lactose +

rafinose +  
amido solúvel +  
D-xylose +  
L-arabinose +  
D-ribose -  
L-ramnose +

D-manitol +  
ácido succínico +  
ácido cítrico +  
NO<sub>3</sub> -  
37°C -

---

*Hansenula sp.*

- Pseudohifa ou hifa verdadeira podem estar presentes;
- Ascospores produzem de 1 a 4 ascospores: hemisferoidal ou forma de saturno;
- Podem ou não ser fermentadoras de açúcares;
- Reprodução por brotamento multilateral;
- Células esféricas, elípticas ou alongadas.