MONITORAMENTO DA MICROBIOTA DE IOGURTES COMERCIAIS

Microbial Monitoring of Commercial Yoghurts

Simone de Souza FERNANDES[1]
Raphael de Souza COELHO[2]
Robson Maia FRANCO[3]
Celso Guimarães BARBOSA[4]
Rosa Helena LUCHESE[5*]

SUMÁRIO

Iogurte é um leite fermentado resultante de interação microbiana mutualista entre as bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus.* Para que a qualidade do iogurte seja garantida, o número de estreptococos deve ser igual ao de lactobacilos, portanto uma proporção de 1:1. Durante o armazenamento dos iogurtes expostos para venda podem ocorrer pós-acidificação e modificação nesta proporção. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar iogurtes de quatro diferentes fabricantes denominados A, B, C e D quanto ao numero e equilíbrio entre cocos e bacilos durante o armazenamento, e sua relação com acidez e pH. Para tanto, foram avaliados iogurtes com até 20 dias de fabricação (faixa A) e mais de 20 dias (faixa B). Foi verificado um desequilíbrio no número de lactobacilos que foi inferior ao de estreptococos e, considerado inadequado, em duas das quatro marcas comerciais. Nos iogurtes da marca A houve redução significativa no número de lactobacilos da faixa A para faixa B levando a um aumento na proporção de cocos relativa ao de bacilos. Não foi observada diferença significativa de acidez e pH relacionados ao tempo de vida de prateleira nas quatro marcas de iogurte. A acidez dos iogurtes do fabricante D mostrou-se significativamente mais elevada (P<0,05) que a dos demais, embora não tenha resultado em maior redução de pH. Todas as amostras analisadas atenderam a legislação vigente no que se refere ao mínimo exigido de bactérias láticas totais.

Termos para indexação: leite fermentado, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* pós-acidificação.

1 INTRODUÇÃO

Iogurte é um leite fermentado adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação lática mediante a ação proto-simbiótica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, aos quais podem ou não acompanhar, de forma complementar outras bactérias acido-lácticas (BRASIL, 2007).

O iogurte exerce efeitos benéficos à saúde, especialmente devido a sua maior digestibilidade quando comparado ao leite e maior concentração de vitaminas (B6 e B12) e minerais (cálcio, fósforo, potássio). É recomendado para as pessoas que têm insuficiência em lactase e para todos aqueles que têm necessidade de digerir um produto lácteo com elevado grau de digestibilidade, dado que a lactose está parcialmente hidrolisada (OLIVEIRA, 1993).

S. thermophillus e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* exibem uma relação de mutualismo durante o processo fermentativo, já que não existe dependência um do outro para a sobrevivência, mas uma estimulação mútua do crescimento. Este fenômeno consiste na produção de ácido fórmico e piruvato assim como da redução do potencial de redox por estreptococos, que favorece o crescimento

1 Mestranda do Depto. de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, CEP 23890-000, Seropédica – RJ, Brasil.
2 Aluno de Eng. de Alimentos da UFRRJ.
3 Prof. do Depto. de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária UFF.
4 Ph.D. Profa. do Depto. de Matemática e Estatística, Instituto Ciências Exatas, UFRRJ.
5 Ph.D. Profa. do Depto. de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, Instituto de Tecnologia, UFRRJ.
* A quem a correspondência deve ser enviada.

dos lactobacilos. Por outro lado, os lactobacilos que apresentam atividade proteolítica e crescimento mais lento embora com maior capacidade acidificante, fornecem aminoácidos livres (valina, especialmente) que estimula o crescimento dos estreptococos (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; VEISSEYRE, 1988).

É de extrema importância que exista um balanço adequado entre as contagens de *S. termophillus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A predominância de qualquer uma das espécies pode acarretar em defeitos no produto final. Os principais fatores que podem afetar o balanço adequado entre os dois micro-organismos são o tempo e a temperatura de incubação e a porcentagem de inóculo (WALSTRA et al., 1999).

Outro fator importante para a qualidade de iogurtes está relacionado à sua acidez, que se altera durante o armazenamento, a chamada pós-acidificação, que depende da acidez inicial, da temperatura de produção e de estocagem.

Assim esta pesquisa objetivou avaliar o número e o equilíbrio entre *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* em iogurtes de quatro diferentes fabricantes no decorrer do armazenamento nas gôndolas dos supermercados correlacionando com suas características físico-químicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As amostras foram constituídas de iogurte tipo natural e integral com prazo de validade de 45 dias, de quatro fabricantes denominados A, B, C e D, cujos produtos são comercializados em todo o território nacional, portanto contendo o selo de Inspeção Federal (SIF). Os iogurtes foram adquiridos no comércio da cidade de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, no período de novembro de 2010 a março de 2011. De acordo com o tempo de fabricação, as amostras foram enquadradas como pertencentes à faixa A (até 20 dias de fabricação) e faixa B (21-45 dias de fabricação). Os iogurtes foram transportados em caixas isotérmicas até o laboratório, onde foram analisados imediatamente.

2.2 Preparação de amostras para análise

As amostras foram homogeneizadas com bastão de vidro esterilizado, por 15 segundos e retirados 25 g de iogurte com auxilio de uma espátula, transferido para um frasco estéril com 225 mL de diluente (água peptonada 0,1%), obtendo-se a diluição 10^{-1}. A partir desta diluição realizaram-se diluições seriadas sucessivas. Alíquotas destas diluições foram semeadas em diferentes meios, seja para determinação de bactérias láticas ou de bolores e leveduras.

2.3 Contagem de estreptococos e lactobacilos nos iogurtes

Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas por espalhamento em superfície em placas duplicatas nos meios específicos: Agar Lee (HiMedia, Mumbai, Índia), meio diferencial que permite o crescimento tanto de lactobacilos como de estreptococos; Agar MRS (HiMedia, Mumbai, Índia) acidificado a pH 5,2 assim como agar LB que permite a avaliação seletiva da população de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Para avaliação seletiva da população de *S. thermophilus* foram empregados os meios Agar ST e M17 (HiMedia, Mumbai, Índia). Os meios LB e ST foram preparados conforme descrito por Downes e Ito (2001). Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) a 37ºC por 72 horas.

2.4 Contagem de bolores e leveduras

Para a enumeração de bolores e leveduras, foi empregado o meio Agar batata dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia), ajustado a pH 3,5 com solução 10% de ácido tartárico. Para o procedimento analítico inoculou-se 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-4} em placas em duplicata As placas foram então incubadas a 28°C por 72 horas (BRASIL, 2003).

2.5 Determinação de pH e acidez titulável

A determinação dos valores de pH foi realizada em triplicata em pHmetro digital (Tecnopon, Piracicaba, SP). A acidez expressa em ácido lático, foi determinada em triplicata, por titulação com solução de NaOH 0,1N, até o ponto de viragem, usando como indicador a solução de fenolftaleína 1,0 %, conforme a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nas determinações físico-químicas (pH e acidez) e na contagem do número de células viáveis de lactobacilos e estreptococos, de cada fabricante, foi tratada estatisticamente pelo teste de comparação de médias de Newman-keuls (SNK), utilizando o programa estatístico XLSTAT® versão7.5.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem de bactérias láticas específicas do iogurte

Na contagem total de bactérias láticas foi empregado o Agar Lee, enquanto para determinação diferenciada de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* os meios LB e MRS acidificado a pH 5,2 e para *S. thermophillus* os meios ST e M17.

Os valores médios de contagem nos diferentes meios encontram-se na Tabela 1. Foram detectadas diferenças significativas (P<0,05) entre as médias das contagens nos diferentes meios. No meio Lee foi observada a maior média de contagem, pois não sendo um meio seletivo, permite uma melhor recuperação das bactérias, especialmente daquelas que sofreram alguma injúria. Observou-se uma menor recuperação de células de lactobacilos no MRS acidificado comparado ao LB. Com relação às contagens nos meios empregados para enumeração de estreptococos, com meio M17 houve melhor recuperação que o meio ST.

Tabela 1 – Médias das contagens e teste de Newman-Keuls (SNK) para análise de diferenças na capacidade de recuperação de estreptococos e lactobacilos nos micro-organismos do iogurte nos diferentes meios.

MEIOS	MÉDIA
LEE Bactérias láticas totais	8,643^{A}
M17Estreptococos Estreptococos	8,097^{B}
ST Estreptococos	7,770^{C}
LB Lactobacilos	7,505^{C}
MRSac Lactobacilos	6,926^{D}

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Student-Newman-Keuls (P<0,05).

É estabelecido um limite mínimo para as bactérias láticas totais como sendo de 10^7 UFC/g (BRASIL, 2007), determinando que esses micro-organismos devam ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade. As amostras de todos os fabricantes independente do tempo de fabricação (faixa A ou B) atenderam a legislação vigente no que se refere ao mínimo exigido de bactérias láticas totais (Figura 1), não sendo detectada diferença significativa nas contagens em meio de Lee entre os iogurtes das faixas A e B.

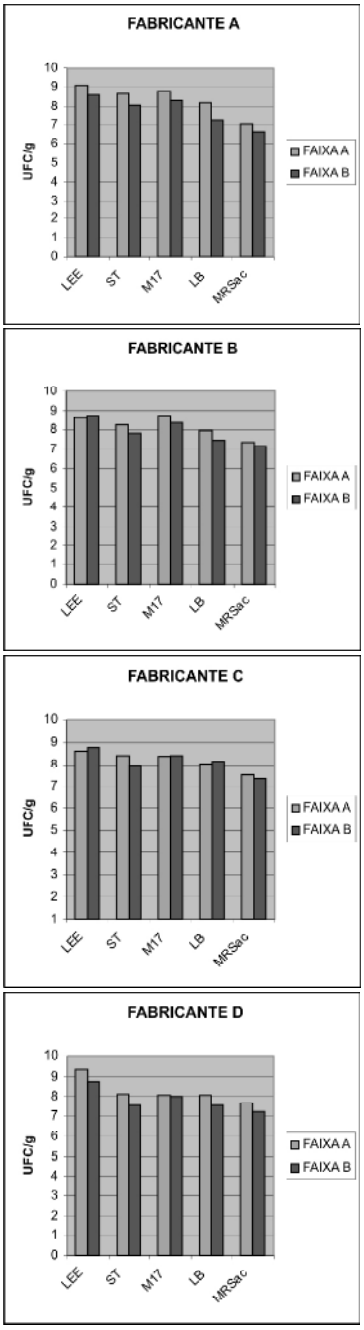

Figura 1 – Média das contagens da microbiota lática de iogurtes com até 20 dias de fabricação (Faixa A) e mais de 20 dias de fabricação (Faixa B) dos fabricantes A,B,C e D nos diferentes meios de cultura (Lee,ST,M17,LB e MRSac).

3.2 Proporção entre cocos e bacilos evolução do pH e da acidez dos iogurtes

Foram adotados os meios LB para contagem de lactobacilos e o meio M17 para contagem de estreptococos, visto serem os meios que apresentaram a melhor recuperação para os respectivos microrganismos. A presença de cocos ou de bacilos nestes meios foi confirmada pela observação microscópica de esfregaços corados pelo método de Gram. As médias das contagens de lactobacilos e estreptococos observados nos meios LB e M17 respectivamente são mostradas na Tabela 2.

Embora todas as amostras analisadas tenham atendido a legislação vigente no que se refere ao mínimo exigido de bactérias láticas totais, foi verificado um desequilíbrio na proporção relativa de coco / bacilo que deveria ser de 1:1 (TAMIME e ROBINSON, 2007; WOUNTERS et al. 2002).

Nos iogurtes da marca A observou-se redução de 1 ciclo log na população de lactobacilos e de 0,6 log na de estreptococos da faixa A para B. Houve redução significativa de lactobacilos da faixa A para B, mas não de estreptococos (Tabela 2). Como conseqüência a proporção de cocos em relação ao de bacilos aumentou 8,9 vezes da faixa A para B passando de 3,9 para 12,8. Aparentemente a linhagem de lactobacilos usada por esta empresa perde a viabilidade durante o armazenamento.

Segundo Anderson (2002) para que a qualidade do iogurte seja garantida o número de células de *L bulgaricus* e *S. thermophilus*, individualmente, não deve ser inferior a 10^7/mL.

De acordo com Tamime e Robinson (2007) a proporção cocos / bacilo em pH 4,2-4,5 deve ser de 1:1, mas com o decorrer do tempo de armazenamento pós-fabricação, esta proporção tende a diminuir, uma vez que o coco é inibido pela própria acidez produzida e lactobacilos continuam a se multiplicar, embora mais lentamente. No entanto, os resultados encontrados nesta pesquisa foram diferentes já que o número de lactobacilos nos iogurtes do fabricante A é que sofreram redução no decorrer do armazenamento e não houve diferenças significativas nas contagens de cocos e de bacilos nos iogurtes dos outros fabricantes (Tabela 2).

De acordo com Moreira et al. (1999) as variações encontradas entre diferentes fabricantes se devem a vários fatores, como controle inadequado da cultura, pontos falhos na fabricação ou deficiência na manipulação e condições de estocagem incorretas durante a fabricação e comercialização.

Nos iogurtes da marca B tanto na faixa A como na faixa B o número de cocos foi significativamente superior ao de bacilos. De uma faixa para outra não houve aumento significativo no número tanto dos cocos como de bacilos. Desta forma a proporção de bacilos e cocos não foi alterada significativamente na comparação entre as faixas.

As contagens de lactobacilos e estreptococos das marcas C e D não diferiram significativamente entre si e de uma faixa para outra. A proporção relativa de bacilos foi maior quando comparada aos iogurtes de outras marcas. Portanto os iogurtes destes fabricantes foram os que apresentaram o melhor balanço relativo entre os dois micro-organismos, já que o número de ambos não diferiu significativamente.

A proporção de cocos e bacilos na cultura do iogurte é normalmente de 1:1 ou 2:1 e é evidente que o equilíbrio entre estes pode ser quebrado com facilidade, a menos que variáveis como as quantidades inoculadas, tempo e temperatura de armazenamento se mantenham sob estrito controle (BRANDÃO, 1995).

Os resultados obtidos nas determinações fisico-químicas (pH e acidez) das amostras com até 20 dias de fabricação (faixa A) e com mais de 20 dias (faixa B), encontram-se na Tabela 3 onde os valores representam média das amostras de cada fabricante. Observa-se que não houve diferença significativa de acidez e pH relacionados ao tempo de vida de prateleira, isto é, faixas A e B. Também não foi observada diferença significativa nos

Tabela 2 – Contagem e proporção de lactobacilos e estreptococos nos meios LB e M17 nos iogurtes com até 20 dias de fabricação (faixa A) e mais de 20 dias (faixa B).

	FAIXA A			FAIXA B		
MARCA	Cocos	Bacilos	Cocos/Bacilos	Cocos	Bacilos	Cocos/Bacilos
A	$5{,}72x10^8$ Aab	$1{,}48x10^8$ Aa	3,9:1	$1{,}90x10^8$ Aa	$1{,}48x10^7$ Bb	12,8:1
B	$5{,}49x10^8$ Aa	$9{,}72x10^7$ Ba	5,6:1	$2{,}91x10^8$ Aa	$4{,}69x10^7$ Bab	6,20:1
C	$2{,}15x10^8$ Ab	$1{,}02x10^8$ Aa	2,1:1	$2{,}46x10^8$ Aa	$1{,}51x10^8$ Aa	1,60:1
D	$4{,}30x10^8$ Aab	$1{,}24x10^8$ Aa	3,2:1	$2{,}30x10^8$ Aa	$1{,}09x10^8$ Aa	2,10:1

Médias de tratamentos com letras maiúsculas diferentes nas linhas e com letras minúsculas diferentes nas colunas em cada faixa, diferindo significativamente entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P<0{,}05$).

valores de pH das diferentes marcas de iogurte. Com relação à acidez os iogurtes do fabricante D mostraram-se significativamente mais elevados (P<0,05) quando comparado aos demais iogurtes. Entretanto a acidez mais elevada dos iogurtes do fabricante D não resultou em um menor pH nestes produtos. Desta forma, estes iogurtes mostraram uma maior resistência à redução do pH, possivelmente devido a um teor de sólidos mais elevado que propiciou um sistema tampão às mudanças de pH. Outra possibilidade seria a capacidade proteolítica da linhagem de lactobacilos empregada pela empresa D em hidrolisar a caseína liberando produtos capazes de elevar o pH do iogurte de maneira semelhante ao relatado por Suriyarachchi e Fleet (1981) com espécies proteolíticas de leveduras.

Tabela 3 – Médias de pH e Acidez (% de ácido lático em g/mL).

Fabricante	Acidez		pH	
	Faixa A	*Faixa B*	*Faixa A*	Faixa B
A	0,70 Ab	0,75 Ab	4,09 Aa	3,95 Aa
B	0,75 Ab	0,72 Ab	3,99 Aa	3,90 Aa
C	0,76 Ab	0,83 Ab	4,01 Aa	4,01 Aa
D	1,00 Aa	0,94 Aa	4,00 Aa	4,02 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula em cada linha e da mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente ao nível de 0,05%.

É amplamente aceito por vários autores que lactobacilos resistem melhor a valores de pH baixos e tendem a superar a população de estreptococos quando o pH é inferior a 4,0, que freqüentemente é atingindo por pós acidificação durante a vida útil destes leites fermentados. Ao término do período fermentativo os iogurtes apresentam um pH em torno de 4,2-4,5 e a proporção esperada de estreptococos e lactobacilos é de 1:1. *S .thermophilus* tem seu crescimento inibido em pH 4,2-4,4 ou abaixo, sendo que *L. bulgaricus* pode tolerar pH 3,5-3,8 (ARNOTT, DUITSCHAEVER E BULLOCK, 1974; MOREIRA et al.,1999).

A intensidade da pós-acidificação em iogurtes depende da capacidade de acidificação das culturas, da etapa de fermentação nos tanques, do resfriamento, da temperatura de armazenamento e do valor de pH inicial (SHAH e RAVULA, 2000; TAMIME e ROBINSON, 2007).

Os valores médios de acidez oscilaram entre 0,70 a 1,00 (Tabela 3), atendendo a legislação que considera aceitável uma acidez entre 0,6 a 1,5 gramas de ácido lático/100g de acordo com Instrução Normativa nº 46 (BRASIL, 2007).

Com relação aos iogurtes da marca D nos quais foi registrada a maior acidez (Tabela 3), também foi encontrada uma proporção de lactobacilos em relação a cocos mais elevada que nos iogurtes dos fabricantes A e B (Tabela 2).

De acordo com Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido o crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração Entretanto isto não foi observado nos iogurtes estudados, pois mesmo os do fabricante D que apresentaram uma maior acidificação ainda continham um número maior de estreptococos relativo ao de lactobacilos.

Segundo Veisseyre (1988), o iogurte pode atingir um pH final entre 3,6 a 4,3 no qual as bactérias lácticas desenvolvem-se normalmente Os valores de pH das amostras de iogurtes da marca B variaram de 3,5 a 4,2 representando a maior variação encontrada. Esta variação maior nos valores de pH dos diferentes lotes podem estar relacionados à deficiências na manutenção da qualidade como condições de temperatura de armazenagem não controladas.

De acordo com Dave e Shah (1998) e Gueimonde et. al. (2004) entre os fatores que influenciam no pH estão temperatura de armazenagem, a concentração de oxigênio contida no produto e permeabilidade do oxigênio através da embalagem, presença de conservantes e de outros microrganismos. O aumento da acidez durante a armazenagem, o ácido e o peróxido de hidrogênio produzidos pela bactéria do iogurte alteram no valor do pH. Assim alguns destes fatores provavelmente terão contribuído para uma maior acidez encontrada em algumas destas amostras.

Segundo Brandão (1995) imediatamente após sua produção, o iogurte deve apresentar uma acidez de 0,9 a 1,0%. Entretanto não existe uma concordância entre os autores no que diz respeito aos valores adequados de acidez do iogurte. Para Humphereys e Plunkett (1969), a acidez inicial deve ser de 1,0 a 1,25% enquanto para Ginslov (1970) a acidez deve ser menor que 1,2%. Souza (1991) afirma que acidez entre 0,7 e 1,25% são comuns, sendo ideal a faixa de acidez entre 0,7 e 0,9%. Entretanto, para Tamime e Robinson (2007), o desejável para iogurte é apresentar uma acidez de até 1,17% de ácido láctico após o armazenamento, valores estes maiores que os encontrados nesta pesquisa.

A acidez excessiva em iogurtes obrigaria a sua retirada do mercado, uma vez que esta variação de acidez pode favorecer ao desenvolvimento de outros microrganismos mais resistentes a acidez como fungos além de causar alterações sensoriais indesejadas no produto. Salji e Ismail (1983) concluíram que as mudanças na acidez do produto ocorreram em maior ou menor grau, dependendo da temperatura de refrigeração, do tempo

de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas utilizadas.

3.4 População de bolores e leveduras e nos iogurtes

A presença de leveduras e bolores em iogurte é um indicativo de práticas higiênico-sanitárias insatisfatórias na fabricação ou na embalagem. Iogurtes com açúcar ou frutas adicionados são especialmente susceptíveis ao crescimento de leveduras. Para Arnott, Duitschaever e Bullock (1974), contagens de leveduras menores que 10 UFC/g e de bolores menores que 1 UFC/g são ideais. São consideradas insatisfatórias contagens de leveduras maiores que 100 UFC/g e maiores que 10 UFC/g de bolores.

Não foram detectados bolores e leveduras nos iogurtes da faixa A como B, sendo os valores de todas as amostras menores que 10 UFC/g. Portanto os iogurtes nos lotes das quatro marcas analisadas encontram-se dentro do valor máximo de 200 UFC/g permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2007) e conforme as especificações sugeridas por Arnott, Duitschaever e Bullock (1974).

4 CONCLUSÕES

Embora todas as amostras tenham atendido a legislação vigente no que se refere ao mínimo exigido de bactérias láticas totais, foi verificado um desequilíbrio no número de lactobacilos que foi inferior ao de cocos. Esta proporção foi considerada inadequada, em duas das quatro marcas comerciais estudadas, provavelmente, devido perda de viabilidade dos lactobacilos durante o armazenamento. Não foi observada atividade de pós acidificação nos iogurtes considerando-se que não houve diferença significativa de acidez e pH relacionados ao tempo de vida de prateleira, isto é, faixas A e B nas quatro marcas analisadas.

SUMMARY

Yoghurt is a fermented milk resultant of a mutualism microbial interaction between the bacteria *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus.* For yoghurt quality assurance, the cell numbers of each microorganism, should be the same, therefore a relative cocci to bacilli ratio of 1:1. During the storage of yoghurts, post-acidification and modification in this ratio might occur. The objectives of this research were to evaluate yoghurts of four different manufacturers called A, B, C and D, in relation to the number and balance between cocii and bacilli during the storage and its relation with acidity and pH. In this way, yoghurts with up to 20 days of manufacturing (band A) and more than 20 days (band B) were evaluated. An imbalance in the lactobacilli numbers which was lower than that of streptococci was verified and considered inadequate, in two out of four commercial brands. In yoghurts from the manufacturer A, there was a significant reduction in the number of lactobacilli from band A to band B leading to an increase in the relative ratio of cocii to bacilli. Acidity and pH of all yoghurt samples did not differ significantly from band A to band B. The acidity of yoghurts from manufacturer D revealed significantly higher ($P< 0.05$) than the others, but did not lead to an increased pH reduction. All samples attended the legislation in relation to total lactic acid bacteria counts.

Index terms: fermented milk, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, post-acidification.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, A. Yoghurts and Fermented Milks. In: 26th IDF World Dairy Congress – Congrilait, 2002, Paris.

ARNOTT, D. R; DUITSCHAEVER, 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.

BRANDÃO, S. C. C.**;** Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leites e Derivados**. v. 4 n. 25**,** p. 24-38, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 62, de 26 de Agosto de 2003.** Dispõe sobre os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de Setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).Instrução Normativa n° 46,de 23 de outubro de 2007.Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados,anexo à presente Instrução Normativa .Diário Oficial da União, Brasília, 24 de outubro de 2007.

DAVE, R. I., SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 2804-2816, 1998.

DOWNES, F. P. & ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), 2001.

GINSLOV, B. O.; Modern tends in yogurt manufacture. **South African Journal of Dairy Technology**, v. 2, p. 70-83, 1970.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S..; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVISAN, C. G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* population included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, p. 839-850, 2004.

HUMPHEREYS, C. L.; PLUNKETT, M. Yogurt: A review of its manufacture. **Dairy Science Abstract**, v. 2, n. 31, p. 607-622, 1969.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ**. Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 3ª edição, São Paulo: 2008. p. 1020.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yoghurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P.; FERREIRA, C. Microbiological and chemical analysis of yoghurts marketed in Lavras – MG. **Ciência e Tecnologia de Alimento**s, v. 19, n. 1, p. 147-152. Jan./Apr. 1999.

OLIVEIRA, J. S. Produção e conservação de iogurte.**Revista Leites e Derivados**, São Paulo, n. 10, p. 35-38.mai/jun,1993.

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.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acid production and viability of yoghurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, Sidney, vol. 55, n. 3, p. 127-131, 2000.

SOUZA, G. Fatores de qualidade de iogurte. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 1, p. 20-7, 1991.

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

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: Science and Technology**. 3rd ed: Londres: Woodhead Publishing Ltd., 2007. 791 p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos:** tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1995, 476 p.

VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica – Composición, recogida, tratamiento y transformatión de la leche**. Ed. Acribia, Zaragoza (España), p. 288-291, 1988.

WALSTRA, P; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VANBOEKEL, M. A. J. **Dairy Technology-Principles of milk properties and processes.** NewYork: Marcel Dekker, Inc., 1999.

WOUNTERS, J. T. M.; EMAN, H. E.; AYAD, J. H.; GERRIT, S. Microbes from raw milk from fermented dairy products. **International Dairy Journal,** v. 12, p. 91-94, 2002.