

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELI CARINE ZAMBONIM

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE ESTUFAMENTO  
EM IOGURTE COM POLPA DE FRUTA**



CURITIBA

2014

MARIELI CARINE ZAMBONIM

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE ESTUFAMENTO  
EM IOGURTE COM POLPA DE FRUTA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos no curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>ª</sup> Lys Mary Bileski Cândido

CURITIBA

2014

---

Z24c

Zambonim, Marieli Carine

Caracterização de leveduras promotoras de estufamento em iogurte com polpa de fruta / Marieli Carine Zambonim. – Curitiba, 2014.

74f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientador: Lys Mary Bileski Cândido .

Bibliografia: p. 65-73.

1. Leveduras. 2. Iogurte. 3. Sistemas de controle biológico - Identificação. 4. Microscopia eletrônica. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Cândido, Lys Mary Bileski. III. Título.

CDD: 579.562

---

**MARIELI CARINE ZAMBONIM**

**CARACTERIZACAO DE LEVEDURAS PROMOTORAS DE  
ESTUFAMENTO EM IOGURTE COM POLPA DE FRUTA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. LYS MARY BILESKI CÂNDIDO  
Campus Curitiba, UTFPR

  
Prof Dr. GUSTAVO HENRIQUE COUTO  
Campus Curitiba, UTFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. MARIA LUCIA MASSON  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 30 de setembro de 2014.

Dedico esse trabalho aos meus pais, grandes guerreiros que sempre me incentivaram na busca por conhecimento. E meu marido por ajudar a tornar esse caminho mais fácil de ser percorrido.

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial a Professora Doutora Lys Mary Bileski Cândido, pelas valiosas orientações, colaboração em disponibilizar seu conhecimento e contribuir para o término do trabalho.

A Professora Doutora Celia Regina Cavichiolo Francho por suas orientações nas análises de microscopia e sugestões sempre oportunas para elaboração desta dissertação.

A todo corpo técnico do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade do Paraná, em especial para Vera Regina e Rosangela, e equipe técnica da indústria, em especial para Giovana, pela espontaneidade em contribuir para conclusão deste trabalho.

A minha família por entender minhas horas ausentes.

E também todos aqueles não citados, porém não esquecidos e nem menos importantes que de alguma forma contribuíram para elaboração e conclusão deste trabalho.

Muito obrigada a todos vocês.

## RESUMO

A contaminação microbiana é uma das principais causas de deterioração e perda de qualidade em alimentos. Produtos lácteos apresentam um ambiente adequado para crescimento e desenvolvimento de microorganismos. Os iogurtes são produtos que usualmente sofrem com ação de leveduras, estas frequentemente estão associadas ao estufamento de embalagens. Leveduras multiplicam-se em iogurtes de frutas armazenados (erroneamente) em altas temperaturas. O presente trabalho teve como principal objetivo identificar células de leveduras promotoras de estufamento em iogurtes com polpa de frutas. Foi acompanhado o processo durante 18 semanas de produção em um laticínio, e a cada semana foram coletados três potes de 100g do sabor produzido no dia da coleta. Um dos potes era analisado no tempo zero e os outros dois eram armazenados em dois ambientes: refrigerado (10°C) e forçado (22°C). Quando um pote apresentava sinais de estufamento era analisado e os resultados eram comparados ao tempo zero. As leveduras foram identificadas através de um sistema comercial, que tem como critério a assimilação de carboidratos. Em seguida foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura. Em temperaturas elevadas de armazenamento, simulando o que pode ocorrer durante distribuição e comercialização, o aumento da população de leveduras foi observado em forma de estufamento dos potes de iogurtes. Assim como as leveduras, o número de bactérias ácido lácticas aumentou quando armazenado em altas temperaturas. A temperatura de armazenamento das amostras (22°C) propiciou aumento da acidez no produto, tornando-o sensorialmente inadequado. Alta acidez conduz ao sabor amargo e diminuição da textura/consistência do iogurte. A população de leveduras aumentou com o tempo de armazenamento. Duas espécies de leveduras foram identificadas: *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Essas espécies foram comparadas por suas morfologias e dimensões, e mostraram semelhanças entre si. As leveduras isoladas são consideradas seguras pelo FDA. Os resultados mostraram que a temperatura é um dos fatores cruciais para garantir qualidade ao produto final. Consumidores podem estar adquirindo produtos com qualidade inferior ao pretendido.

Palavras Chaves: Levedura, Iogurte, Sistema Comercial para identificação de leveduras, Microscopia Eletrônica de Varredura, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

Microbial contamination is one of the most common causes of food deterioration and loss of quality. Dairy products provide a suitable environment for microorganisms' growth and development. Yogurts usually suffer yeasts action which is related with package swelling. The main purpose of this research was to identify yeasts cells related to package swelling in fruit pulp yogurt. The production process of a dairy product was monitored for 18 weeks: each week, 3 samples of 100g of the produced flavor were collected. One of the samples was immediately analyzed while one was refrigerated (10°C) and the other was stored at 25°C. When a package presented swelling, it was analyzed and compared to the first analyzed sample. Isolated yeasts were identified using a commercial system that using carbohydrate assimilation. Then yeast cells were analyzed by scanning electron microscopy. At high temperature storage, a simulation of usual distribution and commercialization of the product, an increase on yeast population was observed through package swelling. As the yeasts, the number of lactic acid bacteria increased when stored at high temperatures. The sample storage temperature (22 ° C) resulted in an increase of the acidity in the product, making it sensory inappropriate. High acidity leads to a bitter taste and decrease the texture/consistence of yogurt. Yeast population increased with time of storage. Two species were identified: *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*, which were morphologically compared by width and length and shown similarities between them. Yeasts are considered safe by the FDA. The results showed that the temperature is crucial to ensure the final product quality factors. Consumers may be buying products with less than the desired quality.

Key words: Yeast, Yogurt, Commercial systems for identification of yeasts, Scanning electron microscopy, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO IOGURTE .....	22
2.2 LEVEDURAS.....	26
2.3 LEVEDURAS EM PRODUTOS LACTEOS.....	26
2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
2.3.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	29
2.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	31
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
3.1 AMOSTRAS.....	33
3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICROORGANISMOS .....	33
3.2.1 Análise Contagem de Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.2.2 Análise Contagem de Bactérias Ácido Lácticas.....	35
3.2.3 Análise Contagem e Identificação de Leveduras .....	36
3.2.4 Identificação de Leveduras Empregando Sistema Comercial API 20C AUX.....	37
3.3 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	40
3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	41
3.4.1 Análise de pH.....	41
3.4.2 Análise de Acidez .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>

4.3 CARACTERÍSTICAS DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....	53
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS ENCONTRADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .	54
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DO IOGURTE.....	20
<b>FIGURA 2</b> – FLUXOGRAMA FABRICAÇÃO DO IOGURTE.....	24
<b>FIGURA 3</b> – FLUXOGRAMA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	35
<b>FIGURA 4</b> – FLUXOGRAMA ANÁLISE CONTAGEM DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁCTICA.....	36
<b>FIGURA 5</b> – FLUXOGRAMA CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	37
<b>FIGURA 6</b> – SISTEMA COMERCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS .....	38
<b>FIGURA 7</b> – CÚPULAS DE INOCULAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.....	38
<b>FIGURA 8</b> – REAÇÃO NAS CÚPULAS DO SISTEMA COMERCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS .....	39
<b>FIGURA 9</b> – FLUXOGRAMA IDENTIFICAÇÃO LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO SISTEMA COMERCIAL .....	39
<b>FIGURA 10</b> – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (TESCAN) VEGA3 LMU.....	40
<b>FIGURA 11</b> – FLUXOGRAMA PREPARAÇÃO AMOSTRA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	41
<b>FIGURA 12</b> – ESQUEMA LEITURA DE pH.....	41
<b>FIGURA 13</b> – ESQUEMA ANÁLISE DE ACIDEZ.....	42
<b>FIGURA 14</b> – ORGANIZAÇÃO DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	55
<b>FIGURA 15</b> – BROTAMENTO DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	57

<b>FIGURA 16</b> – BROTAMENTOS LIGADOS EM CÉLULAS MÃE DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	58
<b>FIGURA 17</b> – FORMAS BROTAMENTO POLAR E MULTILATERAL EM LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	59
<b>FIGURA 18</b> – DIMENSÕES DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	59

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – PADRÃO PARA QUALIDADE DE IOGURTES.....	24
<b>TABELA 2</b> – % ESTUFAMENTO DURANTE VIDA DE PRATELEIRA DE AMOSTRAS DE IOGURTE COM POLPA DE FRUTA E % POTES COM CONTAGEM DE LEVEDURAS .....	43
<b>TABELA 3</b> – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR MORANGO E FRUTAS VERMELHAS. ....	44
<b>TABELA 4</b> – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR COCO. ....	45
<b>TABELA 5</b> – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR BAUNILHA E PEDAÇOS DE ABACAXI....	45
<b>TABELA 6</b> – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR AMEIXA. ....	46
<b>TABELA 7</b> – VALORES MÉDIOS OBTIDOS DE pH. ....	51
<b>TABELA 8</b> – VALORES MÉDIOS OBTIDOS DE ACIDEZ X PADRÃO IN 46..	52
<b>TABELA 9</b> – LEVEDURAS IDENTIFICADAS E FREQUÊNCIA DE LEVEDURA ENCONTRADA NAS ANÁLISES. ....	53
<b>TABELA 10</b> – ASSIMILAÇÃO DE SUBSTRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS. ....	54
<b>TABELA 11</b> – DIMENSÕES ( $\mu\text{m}$ ) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	60
<b>TABELA 12</b> – ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE DIMENSÕES DAS LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> . ....	61
<b>TABELA 13</b> – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS S. <i>cerevisiae</i> e <i>K. marxianus</i> .....	62

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

BAL	Bactérias Ácido Lácticas
Bol	Bolor
C	Carbono
Ca	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
DRBC	Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
IN	Instrução Normativa
Lev	Levedura
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
O	Oxigênio
°C	Grau Celsius
P	Fósforo
PA	Pureza Analítica
pH	Potencial hidrogeniônico
Si	Silício
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
sp	Espécie
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazolio
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias por grama

UFPR Universidade Federal do Paraná

$\mu\text{L}$  Microlitro

$\mu\text{m}$  Micrometro

# 1 INTRODUÇÃO

Microrganismos estão presentes em todos os ambientes e entre eles os fungos e leveduras que são amplamente distribuídos na natureza, conseqüentemente, quando a matéria-prima chega à indústria para processamento já está inicialmente contaminada. A contaminação microbiana é uma das principais causas de deterioração e perda de qualidade em alimentos. Produtos lácteos apresentam um ambiente adequado para a multiplicação de microrganismos deteriorantes, pois possuem quantidade suficiente de nutrientes.

A principal causa de estufamento de produtos lácteos é o desenvolvimento de leveduras. O estufamento é perceptível pelo inchaço da embalagem, multiplicação de mofo na superfície do produto, perda de coloração, textura e odor não característico.

A presença de leveduras sobre ou dentro dos frutos faz com que a produção de iogurte de frutas torne-se um processo crítico, a menos que sejam tomadas medidas para inibir a multiplicação de microrganismos de deterioração, como por exemplo, obtenção de matérias primas selecionadas de fornecedores homologados, aspectos microbiológicos e boas práticas de fabricação dentro da indústria.

Métodos tradicionais para identificação de leveduras são trabalhosos e consomem muito tempo da incubação até sua identificação. Para isso, técnicas que usam produtos comerciais de identificação estão se tornando alternativas viáveis para curto espaço de tempo. O sistema usado nesse trabalho foi o API, um método rápido de identificação através da assimilação de substratos inoculados em cúpulas.

O estudo morfológico das leveduras pode complementar informações importantes para melhor entendimento e conhecimento sobre essas células. Com essas novas observações, nosso entendimento sobre organização das células foi ampliado e muito do que se conhecia foi aprimorado.

É responsabilidade da empresa participar da vida das pessoas, oferecendo alimento saborosos e com qualidade. De modo permanente deve

disponibilizar alimentos nutritivos e atraentes para minimizar perdas por reprocesso. Como consequência, será admirada por sua marca, inovação e preocupação com os consumidores. O cliente é muito exigente quanto à qualidade do produto que está sendo adquirido. E essa exigência faz com que muitas companhias mudem de forma drástica seus processos produtivos.

Na fabricação de iogurtes, as principais reclamações são relacionadas à aparência, sabor e estufamento de embalagens. Normalmente esse estufamento é causado pela presença de leveduras. Diante dessa realidade, tornou-se necessário um estudo para identificação das leveduras que estejam causando esse estufamento e sua caracterização. Desta forma, a identificação e caracterização das leveduras torna-se uma ferramenta para melhorar o processo de produção, a qualidade do produto final e reduzir a perda com possíveis reclamações e reprocesso na indústria.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os gêneros de leveduras que causam estufamento em iogurtes com polpa de frutas.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a incidência de estufamento durante o período de validade de iogurtes adicionados de frutas;
- Avaliar a ocorrência de leveduras em iogurtes com frutas;
- Isolar colônias de leveduras oriundas de iogurtes com frutas;
- Identificar leveduras que estejam causando deterioração em iogurtes com frutas;
- Caracterizar leveduras através de microscopia eletrônica de varredura;
- Acompanhar vida de prateleira de iogurtes com frutas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O leite é um excelente meio de cultura para os microrganismos devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e elevado valor nutritivo. A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, porém, as principais fontes de contaminação são os equipamentos utilizados durante a manipulação, transporte e processamento (SANTANA, 2001).

Os principais constituintes do leite são água, proteína, gordura, lactose, vitaminas, enzimas e substâncias minerais. A composição do leite é influenciada principalmente pela espécie e idade do animal, período de lactação, alimentação, estações do ano e condições climáticas.

Segundo Valsechi (2001) o leite possui dois fins distintos:

1. Para alimentação em forma líquida, chamando-se assim leite "*in natura*";
2. Como matéria prima industrial, estando, portanto na base da produção de diversos produtos lácteos.

Avanços em técnicas de produção, processamento e distribuição do leite, em especial de origem bovina, tem favorecido seu crescente consumo e essa combinação de etapas favorece alterações que podem ter origem físico-química, microbiológica e sensorial. Essas alterações comprometem a qualidade do produto final e pode ser ocasionadas no transporte que pode interferir diretamente na contagem total de microrganismos (SOUZA, 2007).

A contaminação do leite por microrganismos indesejáveis, como os fungos, pode causar alterações físico-químicas no mesmo, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (ANDRADE, 2001).

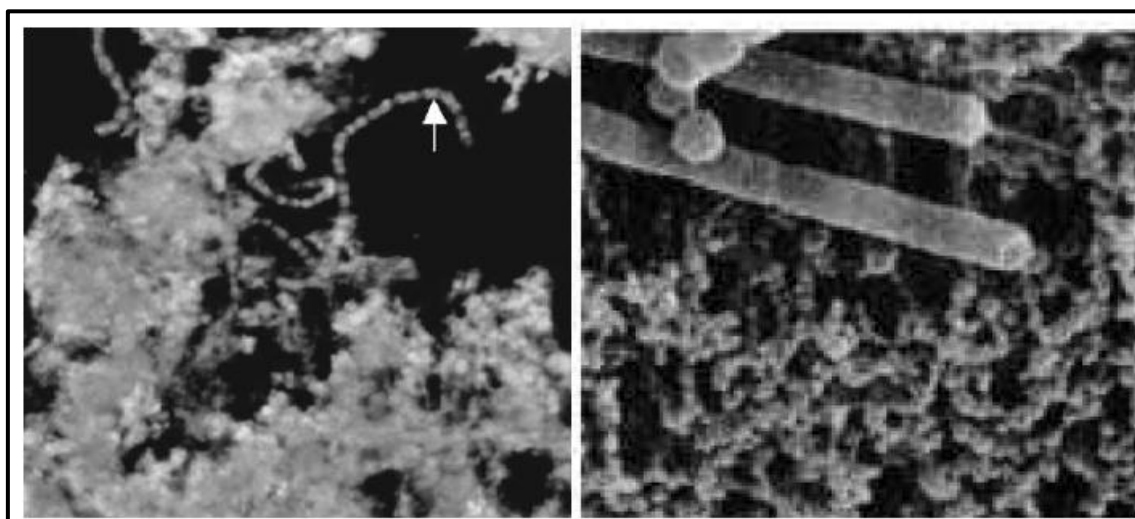
A fermentação é um dos métodos clássicos para preservação de alimentos. O leite pode ser fermentado por bactérias, leveduras e fungos filamentosos para produzir vários produtos, tais como, queijo, manteiga e iogurte. Os produtos formados através da fermentação são produtos com valor

agregado devido a seus processos tecnológicos e qualidade diferenciada do produto final (MOREIRA *et al.*, 2001).

Os leites fermentados englobam uma ampla gama de produtos, dos quais o iogurte é o mais consumido no mundo em quantidades cada vez maiores (VALSECHI, 2001).

Iogurte é definido como o produto obtido pela diminuição do pH do leite, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante ação simbiótica de microrganismos específicos *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* em uma proporção de 2:1 (BRASIL, 2007; ERKUS *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2001).

*Lactobacillus* são definidos como bacilos longos e finos, podem ser retos ou curvos e a maioria das espécies forma cadeias. Fermenta açúcares produzindo principalmente ácido láctico. Possui crescimento ótimo em 45–50°C. *Streptococcus* são cocos unidos em cadeias curtas. Produzem ácidos (acético e succínico) e produtos voláteis (álcoois e gases). Melhor crescimento ocorre na faixa de 37-45°C. A morfologia das duas espécies pode ser visualizada na FIGURA 1 (SABOYA, OETTERER e OLIVEIRA, 1997; MAURICIO, 2009).



*Streptococcus thermophilus*

*Lactobacillus bulgaricus*

**FIGURA 1** – CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS DO IOGURTE.

Fonte: TAMINE e ROBINSON, 2000 citados por BEZERRA 2010

As bactérias que realizam a fermentação do iogurte são classificadas em dois grupos:

1. Bactérias homofermentadoras: degradam açúcares transformando-os principalmente em ácido láctico, aumentam a acidez e proporcionam a coagulação das caseínas do leite;
2. Bactérias heterofermentadoras: produzem ácido acético, succínico, álcoois e gases (SILVA *et al.*, 2012).

Há várias formas de classificar o iogurte: pelo processo de elaboração; adição de ingredientes, composição, consistência e textura (TOLEDO, 2013). BRANDÃO (1987) classifica os iogurtes em tradicional, batido e líquido:

- Iogurte Tradicional (natural) – processo de fermentação ocorre dentro da própria embalagem, não sofre homogeneização e resulta em um produto firme. Tem um típico sabor ácido acentuado;
- Iogurte Batido – a fermentação ocorre em incubadoras com posterior quebra de coágulo através de agitador mecânico;
- Iogurte Líquido (baixa viscosidade) – processo de fermentação ocorre em tanques e é comercializado em embalagens plásticas.

A qualidade microbiológica do produto final está relacionada à carga microbiana presente no recebimento da matéria prima e manipulação do produto durante sua produção. Dessa forma a indústria de laticínios busca a recepção do leite com elevada estabilidade térmica, uma vez que tal característica é essencial para o processamento de derivados lácteos (BALBINOTTI *et al.*, 2003).

O tratamento térmico do leite tem como objetivo a garantia da segurança ao consumidor e o aumento da conservação dos produtos, o que é obtido pela redução de microrganismos patogênicos e deteriorantes, assim como da atividade enzimática (SPREER, 1991). No quesito microbiológico a acidez propicia estabilidade ao iogurte por inibir o crescimento de bactérias gram-negativas (SILVA *et al.*, 2012).

Desta forma, é necessário o desenvolvimento de ferramentas confiáveis para caracterização e identificação de leveduras em produtos alimentícios.

## 2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO IOGURTE

A principal matéria prima do iogurte é o leite. Após análises dos requisitos básicos o leite é padronizado com intuito de manter os constituintes físicos químicos como gordura e teor de sólidos totais para que o produto final mantenha as características sensoriais inalteradas, uma vez que a quantidade de sólidos totais influencia a consistência do iogurte. A padronização implica em incremento de leite em pó em torno de 2-4% (BEZERRA, 2010; TOLEDO, 2013; BRASIL, 2007).

Na sequência de fabricação do iogurte é realizada homogeneização no leite para: reduzir os glóbulos de gordura; favorecer a estabilidade do leite; prevenir a formação de nata e evitar a sinérese. Essa etapa provoca a desnaturação das proteínas do soro e favorece maior interação entre caseína e lipídeos (TAMINE e ROBINSON, 1991 citados por TOLEDO, 2013).

O leite é forçado a passar por um tubo sob forte pressão para que os glóbulos se rompam e em seguida passam por uma segunda homogeneização de menor impacto para evitar que os glóbulos se reagrupem (BEZERRA, 2010).

A base do iogurte é aquecida aproximadamente 90°C por três minutos antes da inoculação, sendo os níveis iniciais de bactéria ácido láctica de  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/g). Esse binômio tempo e temperatura destrói os microrganismos patogênicos ou outros que possam competir com as culturas que serão adicionadas (*Bulgaricus* e *Thermophilos*), reduz a contração do coágulo da caseína do iogurte (redução da sinérese do iogurte) e contribui para redução do oxigênio presente (aumenta viscosidade e textura) (DOSSIE TÉCNICO, 2008).

Após o tratamento térmico do leite, sua temperatura deverá ser reduzida para 42-43°C para adicionar as culturas (em forma de pó, congeladas ou em suspensão líquida) de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* (ERKUS *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2001). A partir desse momento inicia-se a etapa de fermentação, onde o leite deve permanecer por aproximadamente quatro horas.

Na fermentação do iogurte, o *Streptococcus thermophilus*, bactéria iniciadora, possui habilidade de baixar o pH rapidamente e propiciar ambiente favorável para o *Lactobacillus bulgaricus*, os quais intensificam seu desenvolvimento em seguida (ERKUS *et al.*, 2013; BEHMER, 1987). O crescimento do *Streptococcus thermophilus* é estimulado pelos aminoácidos livres e peptídeos liberados pelos lactobacilos a partir da hidrólise das proteínas do leite.

Variações nessa temperatura provocarão desequilíbrio na proporção do número de células de cada microrganismo. Temperatura inferior a 45°C favorecerá o aumento do número de células de *Streptococcus* e acima favorecerá o aumento de *Lactobacillus*. Esse desequilíbrio pode ocasionar perda de sabor, coloração e odor atípico ao produto devido acidez final (MAURÍCIO, 2009).

O bom desenvolvimento durante a fermentação deve-se ao processo de simbiose das bactérias em questão. Durante a fermentação, através da conversão da lactose, as bactérias produzem ácido láctico e compostos aromáticos como, por exemplo: acetaldeídos, acetona e diacetil (SANTO, 2011; MAURÍCIO, 2009; TOLEDO, 2013).

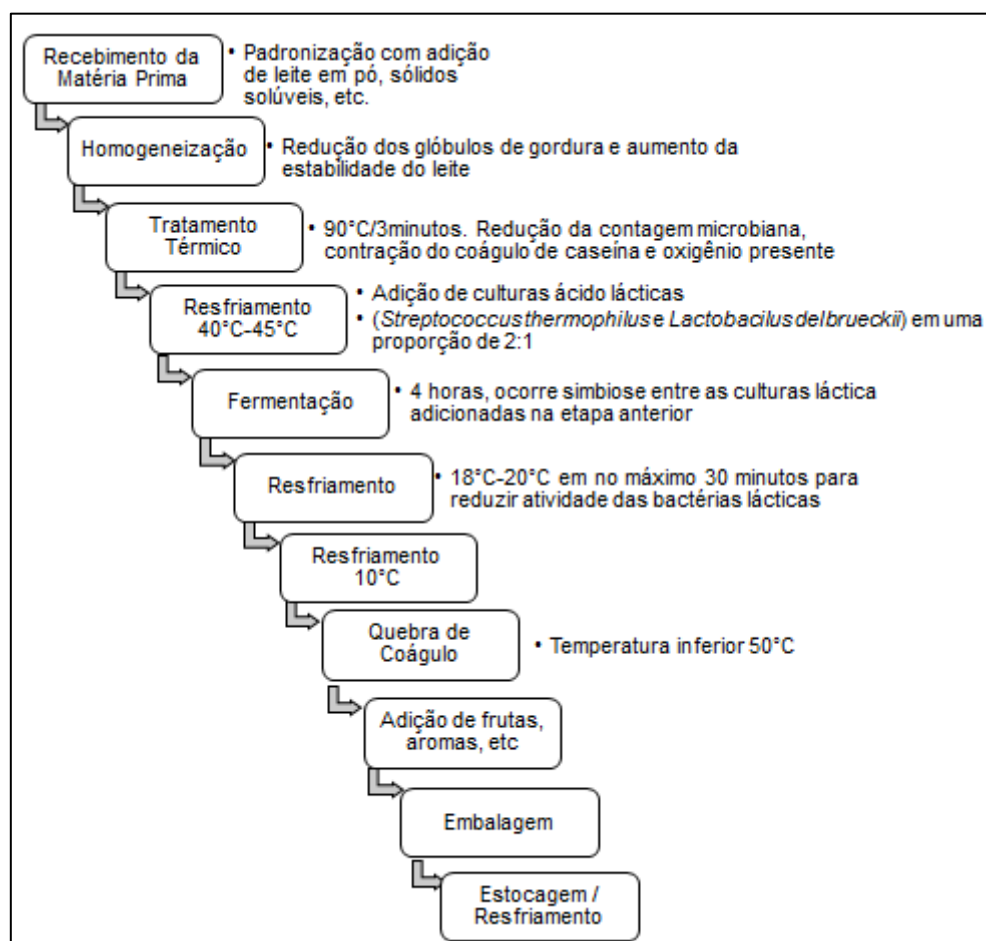
Finalizada a etapa de fermentação, é necessário seguir para uma segunda etapa de resfriamento. Trata-se de uma etapa crítica, pois reduzirá atividade das bactérias ácido lácticas, aumentando a acidez e diminuindo a viscosidade (FERREIRA, 1996).

Esse segundo resfriamento deve ser feito de forma lenta e em duas etapas, resfriamento rápido afetará a estrutura do coágulo, provocará retração das proteínas, capacidade de retenção de água e conseqüentemente a separação do soro (ORDÓÑES *et al.*, 2005).

- 1ª Etapa – Reduzir a temperatura a 18-20°C em no máximo 30 minutos;
- 2ª Etapa – Produto deve atingir 10°C em refrigeração.

Concluída as etapas anteriores de recebimento/padronização da matéria prima, homogeneização, tratamento térmico, resfriamento/inoculação, fermentação e resfriamento, chega à etapa da quebra da coalhada, que deverá ocorrer em temperaturas inferiores a 50°C. Altas temperaturas resultariam em destruição irreversível do gel (TOLEDO, 2013). Após a quebra da coalhada

pode-se adicionar polpas de frutas. Na FIGURA 2 é descrito o fluxograma completo da fabricação de iogurte.



**FIGURA 2 – FLUXOGRAMA FABRICAÇÃO DO IOGURTE.**

Fonte: O autor (2014)

A Instrução Normativa nº46 de 23 de outubro de 2007, estabelece limites microbiológicos para a qualidade do iogurte, a TABELA 1 exhibe os critérios exigidos:

**TABELA 1 – PADRÃO PARA QUALIDADE DE IOGURTES.**

MICROORGANISMO	MÍNIMO (UFC/g)	MÁXIMO (UFC/g)
Bactérias Lácticas viáveis	10 <sup>7</sup>	-
Coliformes 30°C	10	10 <sup>2</sup>
Coliformes 45°C	-	10
Bolor e levedura	50	200

FONTE: IN46 (MAPA)

A deterioração torna-se evidente quando a população de leveduras chega em  $10^5$ - $10^6$  UFC/g e é primeiramente observada como um inchaço da embalagem do iogurte devido à produção de gás causada pela fermentação (FLEET, 1990).

Procedimentos higiênicos e sanitários durante a fabricação e seleção de materiais, são essenciais no controle da contaminação microbiológica em alimentos (MAYORAL *et al.*, 2005). Para ser capaz de controlar a contaminação de produtos lácteos e para medidas adequadas de prevenção, uma estratégia apropriada, incluindo medida de higiene, análises de pontos críticos de produção e investigação de rotas e origem de contaminação, poderia ser desenvolvida para diminuir e eliminar microrganismos deteriorantes (LOPANDIC *et al.*, 2005).

Lopandic *et al.* (2005) afirmam que existem dois mecanismos pelos quais o iogurte se torna contaminado pela levedura:

1. Contaminado pelos ingredientes adicionados após a fermentação (fruta, mel, etc);
2. Podem se desenvolver na superfície dos equipamentos de produção, tal como o misturador e máquina de enchimento, que foram deficientemente higienizadas e sanitizadas.

Segundo Silva e Grootenber (2008) e Silva (2012), as etapas do processo consideradas pontos críticos para controle são:

- Recepção do leite – contaminação microbiológica e presença de resíduos químicos;
- Mistura dos ingredientes – perigo biológico e físico;
- Pasteurização – microrganismos patogênicos podem não ser destruídos;
- Fermentação – temperatura inadequada pode favorecer a multiplicação de um microrganismo em relação ao outro;
- Controle de qualidade das matérias-primas – presença de microrganismos patogênicos.

## 2.2 LEVEDURAS

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucariotos unicelulares; produzem células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, que se reproduzem quase sempre por brotamento (NOBREGA, 2007; VIEIRA, 2011). Existem pelo menos 80 gêneros de leveduras com aproximadamente 600 espécies conhecidas de leveduras (RAVEN *et al.*, 2001).

Ao microscópio, leveduras diferenciam-se de bactérias pela maior dimensão das suas células, podendo variar de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Multiplicam-se em uma ampla faixa de pH ácido, em até 18% de etanol e em presença de 55% a 60% de sacarose. As colônias de leveduras são geralmente de consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de diferentes cores, variando de marfim ao rosa e até vermelho (JAY, 2005).

## 2.3 LEVEDURAS EM PRODUTOS LACTEOS

Leveduras são frequentemente detectadas em elevada contagem em produtos lácteos, refletindo uma boa adaptação no substrato rico em proteínas, lipídeos, açúcares e ácidos orgânicos (LOPANDIC *et al.*, 2005). Leveduras deteriorantes podem aparecer em toda a cadeia de produção, desde a fazenda até o produto final. Como contaminantes naturais são amplamente distribuídas no meio ambiente e aparecem no leite cru e nos utensílios utilizados durante o processamento do iogurte (LOPANDIC *et al.*, 2005).

As leveduras podem interagir com outros microrganismos de diferentes formas, inibindo ou eliminando microrganismos indesejáveis. Podem também agir inibindo culturas *starters* (JAKOBSEN e NARVHUS, 1996).

As leveduras não estão envolvidas na produção de iogurte, mas são consideradas as causadoras de contaminação no produto final (FLEET, 1989). A associação de leveduras que fermentam lactose em produtos lácteos é bem estabelecida (WALKER, 1970 citado por MOREIRA *et al.*, 2001). Um aumento da deterioração é observado quando iogurtes são suplementados com frutas,

mel, castanhas ou açúcar. Esses ingredientes são fontes de contaminação e fornecem nutrientes para crescimento e fermentação das leveduras (JAKOBSEN e NARVHUS, 1996).

Embora o leite cru e o leite pasteurizado sejam frequentemente contaminados por leveduras, sua população é baixa quando comparadas com a das bactérias, sugerindo que o rápido desenvolvimento das bactérias restringe a multiplicação das leveduras (FLEET, 1990; ROOSTITA e FLEET, 2011).

As leveduras são responsáveis pelo aroma não característico, perda da qualidade na textura devido à produção de gás, estufamento da embalagem, descoloração e sabor amargo (FOSCHINO, GARZAROLI e OTTOGALI, 1993; CORBO, LANCIOTTI e SINIGAGLIA, 2001). No caso de alta contaminação, na abertura da embalagem as colônias de leveduras podem estar presentes na superfície do produto.

DÉAK e BEUCHAT (1987) citados por NÓBREGA (2007), com base em pesquisa de literatura, compilaram uma lista com 215 espécies de leveduras já citadas em alimentos, nessas são apresentados 43 gêneros de leveduras, do total quase a metade das espécies vem dos gêneros *Candida* e *Pichia*. Desse total, 50 espécies são frequentemente associadas com alimentos, sendo encontradas principalmente em alimentos deteriorados.

Estudos realizados por Suriyarachchi e Fleet (1981), Jakobsen e Narvhus (1995), Caggia *et al.* (2001), Minervini *et al.* (2001), Fleet e Mian (1987) revelam as principais espécies de leveduras isoladas de produtos lácteos:

- *Cryptococcus albidus*;
- *Debaryomyces hansenii*;
- *Isatchenkia orientalis*;
- *Kluyveromyces marxianus*;
- *Pichia fermentans*;
- *Pichia guilliermondii*;
- *Rhodotorula glutinis*;
- *Rhodotorula mucilaginosa*;
- *Saccharomyces exigiuus*;
- *Sporobolomyces roseus*;
- *Torulaspora delbrueckii*;
- *Zygosaccharomyces rouxii*;
- *Yarrowia lipolytica*;

- *Rhodotorula ruba*;
- *Candida famata*;
- *Candida diffuens*;
- *Candida krusei*;
- *Candida lusitaniae*;
- *Pichia anomalla*;
- *Saccharomyces cerevisiae*;
- *Trichosporon sp.*

Moreira *et al.* (2001) e Fleet (1992) avaliaram amostras de iogurtes de diferentes regiões e identificaram que as principais espécies de leveduras isoladas de iogurtes são: *Debaryomyces hansenii*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida spp* e *Kluyveromyces spp*, pois possuem capacidade de multiplicação em temperaturas baixas, e podem utilizar proteínas, ácidos orgânicos e carboidratos presentes no iogurte, além de frutas e/ou açúcar que são adicionados ao processo (FLEET, 1990; VILJOEN *et al.*, 2003).

### 2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

O gênero *Saccharomyces* é composto por dez espécies, as quais estão classificadas em três grupos (SILVA, 2009):

- 1º *Saccharomyces sensu stricto* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxos* e *Saccharomyces pastorianus*);
- 2º *Saccharomyces sensu largo* (*Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces servazzie* e *Saccharomyces unisporus*);
- 3º Grupo e espécie *Saccharomyces kluyveri*.

A diferença entre as linhagens de *S. cerevisiae* determina a seleção da mais apropriada para a indústria (REIS, 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* por anos foi usada como um microrganismo industrial, tendo provado sua utilidade na fabricação de bebidas e alimentos (SCHABER, DECHIARA e KRAMER, 1986). É uma excelente levedura industrial comumente utilizada para fermentação. Diversos estudos com essa

levedura faz com ela seja a levedura de maior envolvimento nos processos industriais (SILVA, 2009; SILVA e SRIKRISHNAN, 2012).

Gêneros de *Saccharomyces* geralmente se reproduzem por brotamento multilateral, a nova gemula é formada na porção lateral da célula mãe (VIEIRA, 2011; PRETORIUS, 2000; VIANA, 2009).

Como todas as leveduras é um microrganismo eucarioto, sendo a mais estudada. Possui facilidade de fermentar e utilizar diferentes substratos (VIANA, 2009; SILVA, 2012).

Glicose é a fonte de carbono preferido da *S. cerevisiae*. Na presença desse açúcar as demais fontes de carbono são reprimidas por um sistema definido como repressão catabólica (CONRAD *et al.*, 2014). Essa preferência pela glicose torna essa levedura com característica e importância industrial.

Possui alta eficiência fermentativa, metabolização de açúcares, osmotolerância, aceita grandes variações de temperaturas e atividade celular em ambiente ácido (ANDRIETTA *et al.*, 2007). Cresce e se adapta em ambientes extremos através da capacidade de formar filamentos, crescimento invasivo sobre pseudohifas e desenvolvimento de biofilmes.

A parede celular da *S. cerevisiae* corresponde a 29% do seu peso seco e é extremamente importante, uma estrutura rígida que controla principalmente o fluxo de transporte de materiais para dentro e fora da célula (NGUYEN, FLEET e ROGERS, 1998; OSUMI, 1998).

Quando são submetidas a condições de estresse, desenvolvem rápida resposta para reparar danos e proteger estruturas celulares, isso é caracterizado pela síntese específica de proteínas, aumento do nível celular de trealose e glicerol e alteração da composição lipídica (SWAN e WATSON, 1998).

### 2.3.2 *Kluyveromyces marxianus*

*Kluyveromyces marxianus* foi primeiramente descrita em 1888 por E. C. Hansen, que a chamava de *Saccharomyces marxianus* (FONSECA, 2008). Possui reprodução assexuada, suas células são ovais, cilíndricas e alongadas.

Podem formar pseudohifas (LACHANCE, 1998 citado por LANE e MORRISEY, 2010). Possui capacidade de assimilar lactose e açúcares como fonte de carbono. Tem sido largamente utilizada na indústria como produtora da enzima  $\beta$  galactosidase.

É espécie irmã da *Kluyveromyces lactis*, sendo a característica comum entre elas a capacidade para assimilar lactose e usar esse açúcar como uma fonte de carbono (LANE e MORRISSEY, 2010).

São poucas as leveduras que utilizam lactose, *Kluyveromyces marxianus* é uma dessas leveduras. Absorção e hidrólise ocorrem após seu transporte pela parede celular e dentro da célula o dissacarídeo é desdobrado em glicose e galactose (RECH, 1998). É muito aplicado nas indústrias alimentícias como fonte de lactase para redução do teor de lactose e melhoria da qualidade da vida para intolerantes à lactose (MARTINS, 2004).

A levedura *Kluyveromyces* apresenta fisiologia favorável para aplicação industrial, e algumas aplicações biotecnológicas são: produção industrial de algumas enzimas: inulase e  $\beta$ -galactosidase (JEONG *et al.*, 2012), além disso existem diversas possibilidades de utilizá-la na produção de outras moléculas (ROCHA, 2010).

*K. marxianus* é uma levedura muito comum em produtos lácteos, encontrada em grande variedade de frutas (NOBREGA, 2007). Tem sido isolada de diversos ambientes, resultando em alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intra espécie (DINIZ, 2009). São leveduras termotolerantes, podem multiplicar-se em altas temperaturas, superiores a 45°C. Desenvolvem-se em alta velocidades e utilizam um amplo espectro de fontes de carbono (JEONG *et al.*, 2012; PECOTA *et al.*, 2007; ROCHA, 2010).

Leveduras do gênero *Kluyveromyces* costumam atender requisitos necessários para um bom organismo heterólogo. Possui características fisiológicas importantes para síntese de proteínas heterólogas (ROCHA, 2010).

O crescimento em sacarose é independente da ação da inulase, pois apesar de possuir maior especificidade para inulina, também é capaz de hidrolisar a sacarose (HESING *et al.*, 2005).

## 2.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Os métodos analíticos usados pela indústria para detectar e quantificar leveduras em alimentos e bebidas consiste em métodos que usam meios seletivos, esses métodos são simples e largamente aceitos, porém consomem muito tempo. Em média são necessários cinco dias entre a inoculação, incubação e contagem e mais dez dias para identificar a levedura.

A rotina para identificação das leveduras envolve o exame da colônia e morfologia microscópica além de várias reações bioquímicas. Sistemas manuais e automatizados permitem identificação de leveduras, através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos os quais são de realização e interpretação fáceis (SILVA e CANDIDO, 2005). Estudos têm demonstrado que a identificação pelo método tradicional, baseado em propriedades fenotípicas de microrganismos (testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos) é muito trabalhosa (LOPANDIC *et al.*, 2005).

O sistema API 20C foi um dos primeiros produtos comerciais introduzidos para rápida identificação de leveduras. Essas propriedades, quando usadas simultaneamente identificam muitas espécies de leveduras com um respeitável nível de confiabilidade (BUESCHING, KUREK e ROBERTS, 1979; LAND *et al.*, 1979).

O sistema comercial para identificação de leveduras API 20C AUX é um sistema de assimilação de carboidratos, que permite a identificação da levedura isolada dentro de 72 horas após incubação (RUIZ, 2008). Consiste em 19 cúpulas plásticas, em cada uma delas há diferentes carboidratos, além de uma cúpula controle (negativo) (NOBREGA, 2007).

São avaliadas 21 características (20 bioquímicas e uma morfológica), sua leitura é apresentada através de turvação das cúpulas de teste (FERREIRA, 2007; WILLEMSSEN, BREYNAERT e LAUWERS, 1997). Os carboidratos de assimilação são: glicose, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, arabinose, xilose, adonitol, xilitol, galactose, inositol, sorbitol, metil-D-glicosídeos, N-acetil-glicosamina, celobiose, lactose, maltose, sacarose, trealose, melezitose, rafinose. Após avaliação bioquímica, realizam-se testes

morfológicos para determinação de hifa ou pseudo-hifa, e este teste é o vigésimo primeiro teste do sistema (FERREIRA, 2007; NOBREGA, 2007).

As cúpulas são inoculadas com um meio semi-gelatinoso e as leveduras multiplicam-se apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações é feita por comparação com os controles de crescimento e a identificação é obtida consultando o sistema de identificação Apiweb<sup>TM</sup> (BIOMERIEUX).

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 AMOSTRAS**

O experimento foi conduzido em parceria com um laticínio do estado do Paraná, que cedeu as instalações e amostras de rotina que foram utilizadas para o trabalho, e com o Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que disponibilizou equipamentos para análise de morfologia das leveduras isoladas no período dos testes.

Os testes aconteceram durante o período de outubro/2013 até janeiro/2014. A avaliação compreendeu 18 semanas de produção de iogurtes com polpa e pedaços de frutas de sabores variados: abacaxi, ameixa, coco, morango e iogurte grego baunilha. Durante esse período foram retiradas três amostras semanais de iogurtes em potes contendo 100 g do sabor produzido no dia da coleta.

Um dos potes coletados era imediatamente analisado, e as outras duas amostras eram armazenadas em dois ambientes de vida de prateleira:

- Refrigerado a 10°C;
- Forçado a 22°C.

Quando um pote apresentava sinais de estufamento este era encaminhado para análise microbiológica.

O resultado desse pote estufado era correlacionado com a análise inicial para comparar se havia aumentado o número de microrganismos promotores de estufamento, nesse caso, a levedura.

### **3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E CONTAGEM DE MICRORGANISMOS**

Foram adotados os critérios microbiológicos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que constam na

Instrução Normativa 46/07, bactérias ácido lácticas, coliformes 30°C, coliformes 45°C e contagem da população de levedura, que poderia ser o microrganismo envolvido no problema de estufamento e perda de qualidade em iogurte.

O preparo das amostras ocorreu conforme ICMSF (1978). As análises foram realizadas em capela de fluxo laminar. As amostras de iogurte foram transferidas para embalagens plásticas *all zip* e submetidas à homogeneização no equipamento Stomacher (Marca Weg, nº série 790-1) por um minuto em velocidade normal, ou até que fosse observada completa dispersão da amostra.

A primeira diluição das amostras ocorreu automaticamente com o equipamento Dilumat (AES Laboratoire, Nº S/1082) utilizado na pesagem, que calcula a quantidade de diluente na proporção 1:9, sendo essa a diluição inicial ( $10^{-1}$ ).

Para isolamento das colônias foram empregadas oito diluições para cada amostra, as diluições subseqüentes a  $10^{-1}$  foram obtidas transferindo 1mL da diluição anterior para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica homogeneizando-se posteriormente em agitador de tubos.

Para todos os métodos de contagem, as colônias que cresceram na superfície do ágar foram contadas e multiplicadas pelo inverso da diluição inoculada, expressando o resultado em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g).

### 3.2.1 Análise Contagem de Coliformes Totais e *Escherichia coli*

A análise de coliformes foi baseada no *Official Methods of Analysis* (AOAC), Método 991.14, conforme descrito na FIGURA 3. Os petrifilms para contagem de *E. coli* apresentam resultados entre 24-48 horas. Quando o microrganismo está presente, produz enzima capaz de clivar o substrato e liberar o indicador alterando sua coloração (3M, 2009).

Características na leitura de resultados:

- Coliformes totais – é evidenciado pela cor vermelha devido à presença do indicador cloreto de trifeniltetrazolio (TTC). O TTC é reduzido através de

enzimas, originando formazano. Acumula-se no interior das células e se torna vermelho (BELOTTI, BARROS E NERO, 2000).

- *E. coli* – desenvolve coloração azul e gás. A coloração é devida à enzima  $\beta$ -glucuronidase que hidrolisa o substrato cromogênico do meio produzindo a coloração azul. O gás é resultado do aprisionamento pelo filme superior do Petrifilm (CONSOLI *et al.*, 2006).



**FIGURA 3** – FLUXOGRAMA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *ESCHERICHIA COLI*.

Fonte: O autor (2014)

### 3.2.2 Análise Contagem de Bactérias Ácido Lácticas

Análise de bactérias lácticas foi baseada no Manual Oxoid (2000) utilizando Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) conforme descrito na FIGURA 4. Para contagem de bactérias ácido lácticas é verificado o crescimento de colônias pequenas, em forma de folhas na cor creme-clara.

Originalmente o MRS foi desenvolvido em 1960 por Man, Rogosa & Sharpe. Esse meio de cultura contém fonte de energia (carboidratos), fontes de nitrogênio (extrato de leveduras, carne, triptona e peptona) e suplementos derivados do ácido oleico (Tween 80). MRS também possui sais inorgânicos e orgânicos que possuem um efeito estimulante para crescimento da maior parte das espécies de bactérias ácido lácticas (KASVI, 2013).



**FIGURA 4 – FLUXOGRAMA ANÁLISE CONTAGEM DE BACTÉRIA ÁCIDO LÁCTICA.**  
 Fonte: O autor (2014)

### 3.2.3 Análise Contagem e Identificação de Leveduras

Para isolamento e contagem de leveduras das amostras de iogurte utilizou-se método baseado na ISO 21527 com meio de cultura Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol Base (DRBC), conforme FIGURA 5.

O antifúngico dicloran reduz o crescimento dos fungos com propagação rápida. A presença do rosa bengala no meio inibe o crescimento das bactérias e restringe o tamanho das colônias de fungos com o crescimento mais rápido. O cloranfenicol presente no meio de cultura DRBC inibe crescimento de bactérias, presentes nas amostras. A inibição do crescimento de bactérias e a restrição da difusão dos fungos com crescimento mais rápido auxiliam no isolamento dos fungos com crescimento lento (MANUAL ACUMEDIA, 2011).

A partir de três dias de incubação procedeu-se à leitura das placas, colônias de leveduras crescem na coloração rosa devido à absorção do rosa bengala. Quando houve crescimento a placa foi separada para posterior identificação da cultura de levedura.



**FIGURA 5 – FLUXOGRAMA CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.**  
 Fonte: O autor (2014)

### 3.2.4 Identificação de leveduras empregando sistema comercial API 20C AUX

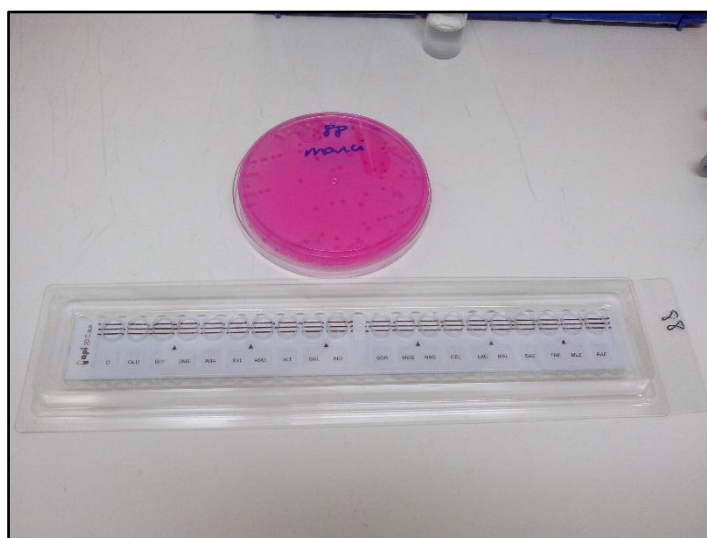
As leveduras isoladas dos iogurtes foram identificadas pelo sistema comercial API20C AUX (FIGURA 6, FIGURA 7 e FIGURA 8). O sistema é composto de 20 cúpulas contendo os seguintes substratos: D-glucose, Glicerol, Cálcio-2-ceto-gluconato, L-Arabinose, D-Xilose, Adonitol, Xilitol, D-Galactose, Inositol, D-Sorbitol, Metil-a D-Glucopiranosideo, N-Acetil-Glucosamina, D-Sacarose, D-Trealose, D-Melezitose, D-Rafinose e uma galeria testemunha sem fonte de carbono.

Nesse sistema são avaliadas 21 características separadas em sete grupos de três e a cada reação positiva é atribuído um valor numérico de sete dígitos, que corresponde à identificação das espécies. A interpretação é realizada com auxílio do catálogo analítico API 20C AUX (FERREIRA, 2007).

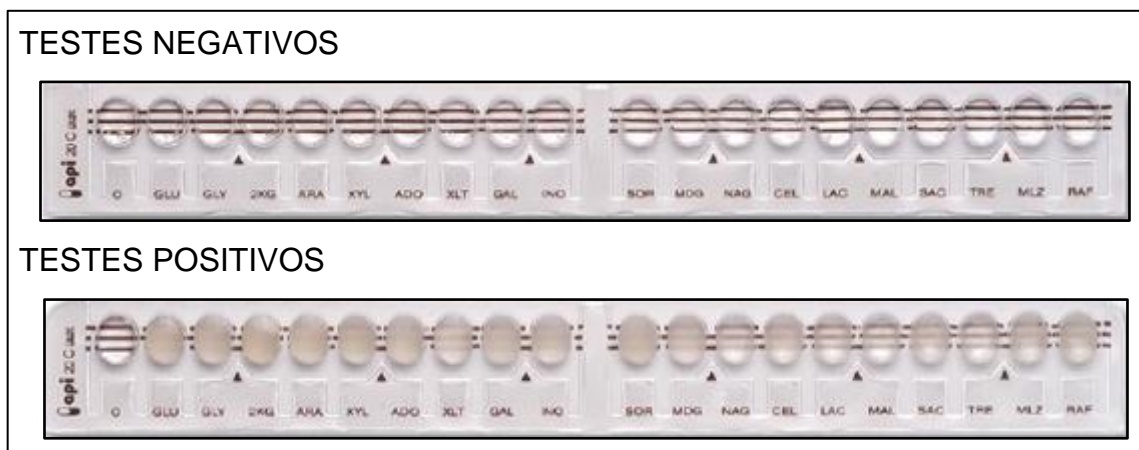


**FIGURA 6 – SISTEMA COMERCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.**  
Fonte: O autor (2014)

As cúpulas foram inoculadas com 100  $\mu$ L de suspensão de leveduras puras e jovens, isso equivale à opacidade 2 de McFarland e incubadas por 72 horas  $\pm$ 6horas a 29°C  $\pm$ 2°C. As cúpulas que apresentaram maior turvação do que a cúpula testemunha foram consideradas reação positiva.

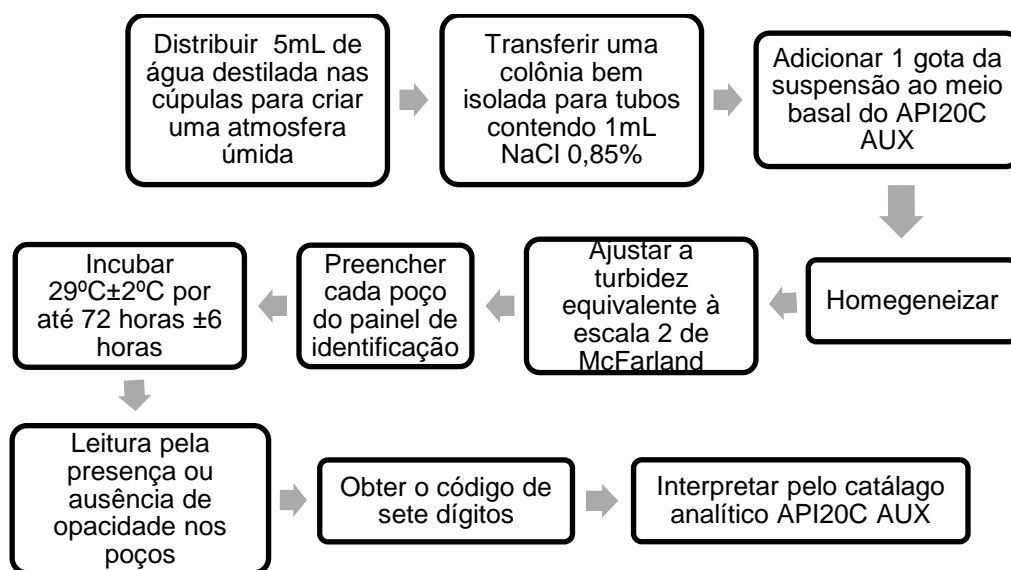


**FIGURA 7– CÚPULAS DE INOCULAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.**  
Fonte: O autor (2014)



**FIGURA 8 – REAÇÃO NAS CÚPULAS DO SISTEMA COMERCIAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS.**  
Fonte: BIOMERIEUX

A FIGURA 9 descreve o processo para identificação através do API20C AUX de colônias de leveduras isoladas.



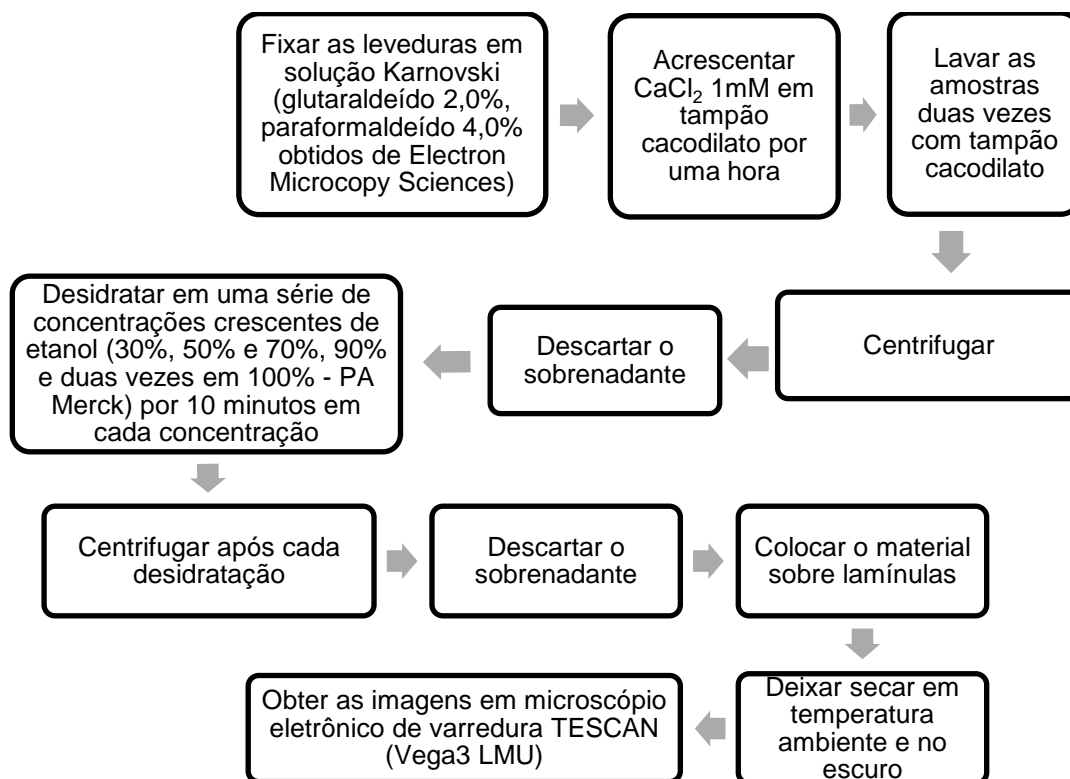
**FIGURA 9 – FLUXOGRAMA IDENTIFICAÇÃO LEVEDURA ISOLADAS UTILIZANDO SISTEMA COMERCIAL.**  
Fonte: O autor (2014)

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As culturas puras de leveduras obtidas da última diluição foram separadas com auxílio de uma pipeta de *pasteur* e na sequência a metodologia utilizada por Capdeville *et al.* (2007) foi adaptada para realização das análises ultraestruturais quanto ao tamanho, forma e superfície com auxílio do microscópio Tescan (FIGURA 10), seguindo as etapas da FIGURA 11.



**FIGURA10** – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (TESCAN) VEGA3 LMU.  
Fonte: O autor (2014)

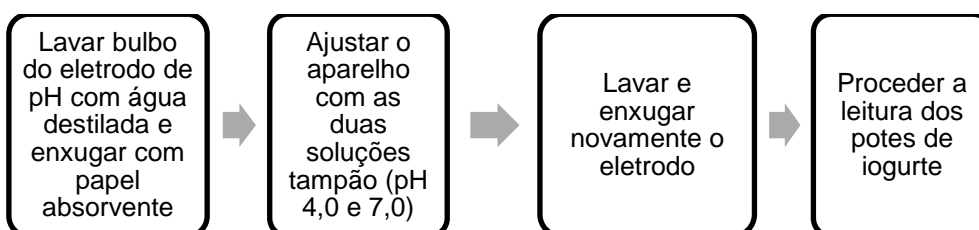


**FIGURA 11** – FLUXOGRAMA PREPARAÇÃO AMOSTRA PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).  
Fonte: O autor (2014)

### 3.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 3.4.1 Análise de pH

Os resultados de pH foi determinado através do método eletrométrico e segue as etapas da FIGURA 12.



**FIGURA 12** – ESQUEMA LEITURA DE pH.  
Fonte: O autor (2014)

### 3.4.2 Análise de Acidez

Os resultados de acidez foram expressos em gramas de ácido láctico em 100 gramas de iogurte e foi determinado conforme FIGURA 13.



**FIGURA 13** – ESQUEMA ANÁLISE DE ACIDEZ.

Fonte: O autor (2014)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do segundo dia de fabricação, alguns potes de iogurtes já apresentaram sinais visíveis de estufamento, esses potes foram levados até o laboratório para análise, porém a maior incidência de estufamento foi com sete dias após fabricação. Na TABELA 2 são apresentados os percentuais de estufamento por tempo de armazenamento do produto e o percentual de potes com contagem de leveduras.

**TABELA 2 – % ESTUFAMENTO DURANTE VIDA DE PRATELEIRA DE AMOSTRAS DE IOGURTE COM POLPA DE FRUTA E % POTES COM CONTAGEM DE LEVEDURAS.**

Vida de prateleira (dias de produção)	Estufado 22°C (%)	% de Potes estufados com contagem de leveduras	Estufado 10°C (%)	% de Potes estufados com contagem de leveduras
13	-	-	10,53	0,00
10	-	-	5,26	0,00
7	31,58	66,67	-	-
9	10,53	100,00	-	-
4	10,53	100,00	5,26	0,00
6	5,26	0,00	-	-
3	10,53	0,00	-	-
2	10,53	50,00	-	-

Fonte: O autor (2014)

Os resultados das análises microbiológicas e físico químicas dos iogurtes estufados foram comparados com as análises em tempo zero e podem ser observados nas TABELA 3, TABELA 4, TABELA 5 e TABELA 6, onde estão classificados por sabores com maior incidência de estufamento.

**TABELA 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR MORANGO E FRUTAS VERMELHAS.**

Iogurte	Data de fabricação	TEMPO ZERO						Armazenamento em 22°C						Armazenamento Refrigerado (10°C)					
		BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL	E. coli	Bol/Lev	Acidez	pH	Tempo de estufamento (dias)	BAL	E. coli	Bol/Lev	Acidez	pH	
<b>Polpa de Morango</b>	25/11/2013	29x10 <sup>8</sup>	<10	270	1,28	4,43	9	26x10 <sup>8</sup>	<10	>2500	1,81	4,2	10	10x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,23	4,2	
	02/12/2013	40x10 <sup>8</sup>	<10	1160	1,31	4,29	7	>25x10 <sup>9</sup>	<10	>2500	1,82	4,1	NÃO ESTUFADO NESSA TEMPERATURA						
	16/12/2013	31x10 <sup>8</sup>	<10	1160	1,46	4,3	7	40x10 <sup>8</sup>	<10	>2500	1,77	4,3	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
<b>Pedaços morango</b>	08/01/2014	92x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,1	4,2	6	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,6	3,9	4	42x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,18	4,1	
<b>Grego morango</b>	28/10/2013	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,3	4,28	2	46x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,9	4,2	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
	04/10/2013	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,65	4,49	7	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,9	4,2	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
	11/10/2013	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,65	4,52	7	35x10 <sup>7</sup>	<10	<10	1,85	4,2	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
<b>Pedaços frutas vermelhas</b>	05/11/2013	38x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,1	4,15	3	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,6	3,9	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						

Legenda:

Os resultados para microrganismos estão expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g). BAL: Bactérias Lácticas, *E.coli: Escherichia coli*, Bol e Lev: Bolores e Leveduras. Acidez expressa em % ácido láctico.

Fonte: O autor (2014)

**TABELA 4 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR COCO.**

Iogurte	Data de fabricação	TEMPO ZERO						Armazenamento em 22°C						Armazenamento Refrigerado (10°C)					
		BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	
Polpa de Coco	30/11/2013	26x10 <sup>9</sup>	<10	270	1,27	4,21	9	29x10 <sup>9</sup>	<10	>2500	1,88	4,0	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
	02/12/2013	48x10 <sup>9</sup>	<10	800	1,33	4,35	7	91x10 <sup>9</sup>	<10	1200	1,76	4,1	13	35x10 <sup>7</sup>	<10	<10	1,29	4,5	
	23/12/2013	>25x10 <sup>9</sup>	<10	800	1,32	4,32	4	>25x10 <sup>9</sup>	<10	>2500	1,79	4,0	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
	20/01/2014	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,29	4,33	4	>25x10 <sup>9</sup>	<10	>2500	1,98	4,1	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						

Legenda:

Os resultados para microrganismos estão expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g). BAL: Bactérias Lácticas, *E.coli*: *Escherichia coli*, Bol e Lev: Bolores e Leveduras. Acidez expressa em % ácido láctico.

Fonte: O autor (2014)

**TABELA 5 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR BAUNILHA E PEDAÇOS DE ABACAXI.**

Iogurte	Data de fabricação	TEMPO ZERO						Armazenamento em 22°C						Armazenamento Refrigerado (10°C)					
		BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	
Grego Baunilha	18/11/2013	10x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,6	4,51	3	63x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,95	4,2	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						
Pedaços Abacaxi	14/10/2013	>25x10 <sup>9</sup>	<10	<10	1,1	4,3	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA						10	14x10 <sup>8</sup>	<10	<10	1,2	4,1	

Legenda:

Os resultados para microrganismos estão expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g). BAL: Bactérias Lácticas, *E.coli*: *Escherichia coli*, Bol e Lev: Bolores e Leveduras. Acidez expressa em % ácido láctico.

Fonte: O autor (2014)

**TABELA 6 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO QUÍMICAS DE IOGURTE SABOR AMEIXA.**

Iogurte	Data de fabricação	TEMPO ZERO						Armazenamento em 22°C					Armazenamento Refrigerado (10°C)				
		BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*	pH*	Tempo de estufamento (dias)	BAL*	E. coli*	Bol/Lev*	Acidez*
Polpa ameixa	13/11/2013	34x10 <sup>8</sup>	<10	210	1,1	4,22	2	64x10 <sup>8</sup>	<10	250	1,75	3,8	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA				
	10/12/2013	25x10 <sup>9</sup>	<10	1200	1,28	4,38	7	48x10 <sup>9</sup>	<10	>2500	1,9	4,4	NÃO ESTUFOU NESSA TEMPERATURA				

Legenda:

Os resultados para microrganismos estão expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g). BAL: Bactérias Lácticas, *E.coli: Escherichia coli*, Bol e Lev: Bolores e Leveduras. Acidez expressa em % ácido láctico.

Fonte: O autor (2014)

A expedição dos iogurtes do laticínio para o mercado ocorre no máximo 48 horas após envase. Esse estudo mostra uma preocupação, pois com esse rápido fluxo entre finalização do processo e expedição, alguns iogurtes estão indo para o mercado e estufando nos pontos de venda. No caso dos iogurtes sabor de morango o estufamento mais prematuro ocorreu após dois dias de produção. Chama atenção que foram analisados dois tipos de produtos, o iogurte adicionado com polpa de fruta e o iogurte adicionado com pedaços de frutas. Nos iogurtes adicionados de polpa de fruta, ocorreu estufamento e detecção de leveduras através de análises microbiológicas, porém nos iogurtes com pedaços de frutas o estufamento foi perceptível, mas não houve contagens de leveduras.

O estufamento em armazenamento refrigerado é uma preocupação na indústria, uma vez que algumas amostras estufaram nessa temperatura antes mesmo do estufamento ocorrer no armazenamento forçado (22°C).

Para iogurtes com polpa de coco o estufamento com maior precocidade foi com quatro dias de produção, também ocorreu estufamento em iogurte armazenado sob refrigeração, porém esse foi mais tardio do que o estufamento ocorrido em ambiente forçado e também mais moroso do que o ocorrido em iogurte com polpa e pedaços de morango. De qualquer forma, é uma preocupação, pois indica que bactérias psicrófilas estão encontrando ambiente favorável para sua multiplicação.

Apesar do iogurte grego baunilha e pedaços de abacaxi terem apresentado menor incidência de estufamento do que o apresentado na tabela 6 (iogurte sabor Ameixa), esse dado é mais crítico, pois nesse armazenamento ocorreu estufamento sob refrigeração (10°C) e não estufou em armazenamento forçado (22°C). Como observado nos dados das tabelas anteriores, novamente é perceptível que em iogurtes contendo pedaços das frutas o estufamento não é ocasionado por ação da levedura. É importante considerar esta possibilidade em um novo estudo do problema.

Para iogurtes com polpa de ameixa (TABELA 6), observou-se incidência de estufamento em duas amostras, uma com dois dias de produção e outra com sete dias de produção. Pode-se notar aumento no número de bactérias ácido lácticas juntamente com aumento na contagem da população de leveduras, isso ocorre porque há uma interação entre bactérias ácido

láticas e leveduras. As leveduras estimularam a multiplicação das bactérias ácido láticas, efeito também observado por Fleet (1990) e Deeth e Tamime (1981).

Das 35 amostras com estufamento, 17 (48,6%) apresentaram contagem de leveduras. Dessas 17 amostras com contagem, sete amostras tiveram população superior a 2500 UFC/g. Após armazenamento algumas contagens iniciais de microrganismos multiplicaram suas populações nos potes estufados. Das 17 amostras estufadas, nove (56,3%) multiplicaram sua população de leveduras em média 30,1% quando comparados aos resultados iniciais.

Das 17 amostras que estufaram no período das coletas, 50% permitiram a identificação das leveduras. As leveduras identificadas nesse trabalho não são nocivas para saúde humana, mas os produtos que não estão com características sensorialmente apropriadas são rejeitados pelo consumidor.

Quando analisadas as polpas de frutas utilizadas no processamento do iogurte não houve contagens de leveduras. Assim como no *swab* pré-operacional também não foi identificada contagem de levedura, bolor e mesófilos. A ausência de contagem na análise da polpa e nos *swab* pré-operacional demonstram a garantia da qualidade quanto aos padrões de higiene adotados durante toda a cadeia de produção.

A população de leveduras foi significativamente menor nos primeiros dias da vida de prateleira devido ao uso de bacteriostático que retarda a proliferação dos microrganismos. A formação de bolor não foi visível em nenhum dos potes estufados.

Como mostram os resultados, temperatura de armazenamento inadequada pode causar multiplicação na população de leveduras. Como são produtoras de gás, leveduras causam estufamento em embalagem e outros problemas sensoriais que são indesejados no produto, como por exemplo, diminuição da textura. A adição de frutas em iogurtes faz com que se tenham quantidades significativas de substratos para multiplicação de microrganismos.

Quando são adotadas boas práticas de fabricação durante processamento do produto, a probabilidade de contagem de levedura e sua ocorrência durante a vida de prateleira é reduzido. A utilização de boas práticas

de fabricação no processamento e o armazenamento adequado durante sua comercialização, garante ao iogurte vida de prateleira de aproximadamente 45 dias, porém quando ocorrem variações significativas de temperatura a vida de prateleira é reduzida, e se o produto apresentava contagem, mesmo baixa, de microrganismos acarretará multiplicação de sua população.

Quando os iogurtes foram expostos a temperaturas elevadas de armazenamento, simulando o que pode ocorrer durante transporte e até mesmo armazenamento durante comercialização, o aumento da população de leveduras foi observado em forma de estufamento nos potes de iogurtes. Juntamente com essa constatação, observou-se que o número de bactérias ácido lácticas aumentou quando armazenado em altas temperaturas.

Os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias podem afetar a viabilidade das leveduras, porém esta inibição é dependente de outros fatores, como tipo e concentração do ácido, tipo de leveduras, sinergismo com outros produtos e pressão osmótica do meio (CHERUBIN, 2003).

As bactérias ácido lácticas exercem um efeito inibidor sobre o crescimento da levedura devido à função osmótica causada pela presença do ácido láctico. Porém, as leveduras produzem ácido succínico, que exerce uma pressão sobre o crescimento bacteriano e, conseqüentemente reduz os níveis de ácido láctico (CARVALHO, 2011).

Para Canganella *et al.* (2000) ocorre redução na capacidade de multiplicação da bactéria ácido láctica quando associada com multiplicação de leveduras. Entretanto para Fleet (1990), ocorre uma interação entre leveduras e bactérias ácido lácticas, onde a produção de leveduras estimula multiplicação de bactérias ácido lácticas. Nos testes realizados, a observação de Fleet (1990) apresenta correlação com os dados encontrados no trabalho, pois em 55,5% dos potes analisados, quando houve aumento na população de levedura juntamente aumentou a população de bactérias ácido lácticas.

Leveduras multiplicam-se muito bem em iogurtes de frutas armazenados (erroneamente) em altas temperaturas. Canganella *et al.* (2000), em estudo constataram que em baixas temperaturas as leveduras são beneficiadas em seu crescimento, porém no presente estudo o efeito foi contrário, as leveduras desenvolvem-se melhor em temperaturas elevadas, em baixas temperaturas de armazenamento não ocorreu contagem de leveduras.

Cousin (1982), citado por Viljoen *et al.* (2003), também analisou iogurtes em diversas temperaturas e verificou que em baixas temperaturas as leveduras raramente se multiplicam devido ao crescimento competitivo de bactérias psicotróficas. Assim como nos testes realizados por Viljoen *et al.* (2003), os resultados mostraram ausência de crescimento de levedura em temperaturas reduzidas de estocagem.

O estufamento ocorreu sem crescimento de levedura em iogurtes armazenados em temperatura de refrigeração. Introdução de baixas temperaturas de estocagem propicia multiplicação de microrganismos psicotróficos (COUSIN, 1982 citado por WANG e JAYARO, 2001). Estes se multiplicam em temperaturas de refrigeração e agem alterando as características do iogurte devido produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas (ZENI *et al.*, 2013).

As bactérias psicotróficas são bactérias encontradas no leite, principal matéria prima do iogurte, onde o tratamento térmico não é efetivo, a carga microbiana é carregada durante toda a cadeia de produção do iogurte. Quando há uma alta contagem dessas bactérias na matéria prima, torna-se difícil a sua redução em níveis não significativos nos produtos lácteos derivados, dessa forma o produto carrega a contaminação, multiplica-se durante armazenamento e conseqüentemente diminui a vida de prateleira dos produtos.

Para Bastos (2009) as bactérias ácido lácticas inibem crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes através de disputa competitiva de nutrientes e inibidores que são produzidos pelas culturas *starters*. A patogenicidade da bactéria *E. coli* é de conhecimento mundial e sua ocorrência em leite e derivados lácteos ocorre quando procedimentos de sanidade animal não são efetuados criteriosamente. A pasteurização garante reduções significativas dessa bactéria, porém pode ocorrer contaminação pós-pasteurização que venha comprometer a qualidade do produto final.

Nenhuma das amostras analisadas apresentou contagem desse microrganismo, mostrando boas condições higiênico-sanitárias na indústria, no processamento e envase, impedindo que ocorresse contaminação no produto final. Esse microrganismo não possui grande facilidade para multiplicação em iogurtes devido ao baixo pH.

Há diversas controvérsias sobre valores ideais de pH para iogurte, Apesar das normas não citarem valores ideais para pH, os valores médios obtidos são apresentados na TABELA 7 e estão em concordância com dados publicados na literatura.

**TABELA 7 – VALORES MÉDIOS OBTIDOS DE pH.**

<b>Armazenamento</b>	<b>Valores Médio de pH</b>
<b>Tempo Zero</b>	4,1
<b>22°C</b>	4,1
<b>10°C</b>	4,2

Fonte: O autor (2014)

Para Moreno e Kosikowski (1973) o pH ideal para iogurte é aproximadamente 4,4 estando em concordância com Souza (1991), que coloca valores ideais de pH de 4,0 a 4,4 e Brandão(1995) 4,2 – 4,4.

Sellars e Babel, 1970 citados por Martin (2002), afirmam que pH do iogurte são valores mais ácidos (próximo de 4,0), valores inferiores ao citado conduz uma produção exagerada de acidez durante período da vida de prateleira. Essa faixa de pH é ideal pois garante estabilidade do produto para consumo e não torna o produto insípido nem excessivamente ácido (TAMINE e ROBINSON, 1991 citados por MORAES, 2004; SOUZA, 1991). Kroger (1976) defende que o pH precisa ser mais elevado, menos ácido ( $\geq 4,0$ ), para que o produto não se torne desagradável ao consumidor.

O pH tem ação negativa sobre o produto, uma vez que está ligado à hidrólise das proteínas carregando junto a ele sabor amargo devido à formação e acúmulo de peptídeos de peso molecular baixo (insolúveis apolares) (MARTIN, 2002). Também influencia na multiplicação de determinado microrganismo em relação a outro, como exemplo, gênero *Lactobacilos* crescem e toleram pH mais baixos do que os pertencentes ao gênero *Streptococcus* (MOREIRA, 1998).

A temperatura de armazenamento (22°C) das amostras propiciou uma acidez maior no produto, tornando o produto sensorialmente inadequado, alta acidez conduz ao sabor amargo e diminuição da textura/consistência do iogurte.

As TABELA 3, TABELA 4, TABELA 5 e TABELA 6 mostraram os valores encontrados de acidez, para o período em tempo zero. Apenas três amostras (18,75%) apresentaram valores superiores ao estabelecido pelo órgão regulador (MAPA–IN46) para acidez láctica em 100g do produto. Na TABELA 8 podem ser observados os valores médios obtidos na análise de acidez e comparar com o padrão da legislação vigente para produtos lácteos, IN46.

Nas amostras que apresentaram estufamento em 22°C o percentual de amostras com acidez fora do padrão exigido foi bem significativo, foram 13 amostras que representam 86,7%, isso está em acordo com Lima (2011), onde afirma que alterações em temperatura e pH são responsáveis por mudanças na acidez do produto.

**TABELA 8 – VALORES MÉDIOS OBTIDOS DE ACIDEZ X PADRÃO IN 46.**

<b>Armazenamento</b>	<b>Valores Médios de Acidez</b>	<b>Padrão IN 46 (g de ácido láctico/100g)</b>
<b>Tempo Zero</b>	1,32	0,6 a 1,5
<b>22°C</b>	1,82	
<b>10°C</b>	1,23	

Fonte: O autor (2014)

Apesar dos valores em tempo zero e em 10°C estarem em conformidade com o MAPA, esses valores são superiores aos encontrados por Souza (1991), que defende faixas de acidez entre 0,7% e 0,9%. O paladar do consumidor influencia na percepção dos aspectos sensoriais do produto, uma vez que o grau de acidez também tem efeito imediato na consistência do iogurte. A consistência do produto é uma ordem inversa ao percentual de acidez encontrado, ou seja, maior acidez leva a menor consistência.

A acidez do iogurte aumenta durante o armazenamento em maior ou menor grau, dependendo da acidez inicial do produto, da temperatura de armazenamento e do poder acidificante da cultura (TAMINE e ROBINSON, 1991 citados por MORAES, 2004).

O parâmetro acidez é extremamente importante como indicador de qualidade, valores excessivos denotam más condições de armazenamento. O

controle de temperatura além de evitar modificações indesejáveis no iogurte garante a inocuidade do produto. O teor de sólidos possui influência nos valores de acidez titulável, por isso, o pH é o melhor critério para expressar acidez do produto (SOUZA, 1991).

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS LEVEDURAS ISOLADAS

O critério para identificação de leveduras pelo API 20C foi através da capacidade assimilativa de carboidratos. A leitura e interpretação dos resultados foram obtidos em 72 horas após incubação. Na TABELA 9 estão às espécies e frequência de leveduras identificadas nos iogurtes estufados e na TABELA 10 são apresentados os substratos assimilados pelas leveduras isoladas.

**TABELA 9 – LEVEDURAS IDENTIFICADAS E FREQUÊNCIA DE LEVEDURA ENCONTRADA NAS ANÁLISES.**

Levedura Identificada	Frequência	Iogurte com Polpa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87,5%	Coco, Morango e Ameixa
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	12,5%	Morango

Fonte: O autor (2014)

**TABELA 10 – ASSIMILAÇÃO DE SUBSTRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS.**

Carboidratos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
D-glucose	+	+
Glicerol	-	+
cálcio-2-ceto-gluconato	-	-
L-arabinose	-	-
D-xilose	-	-
adonitol	-	-
xilitol	-	-
D-galactose	+	+
inositol	-	-
Dsorbitol	-	+
Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	+	+
N-acetil-glucosamina	-	-
D-celobiose	-	+
D-lactose	-	+
D-maltose	+	+
D-sacarose	+	+
D-trealose	+	+
D-melezitose	+	+
D-rafinose	+	+
Hifas	-	-

Fonte: O autor (2014)

Estudo de Silva e Candido, 2005, mostrou 92% de acuracidade em 72 horas. Verweij *et al.* (1999) realizaram testes comparando sistemas comerciais, incluindo API 20C, onde o mesmo teve um desempenho maior que 50% de assertividade. Dessa forma adotaram-se os resultados do API como resultados confiáveis e de repetibilidade.

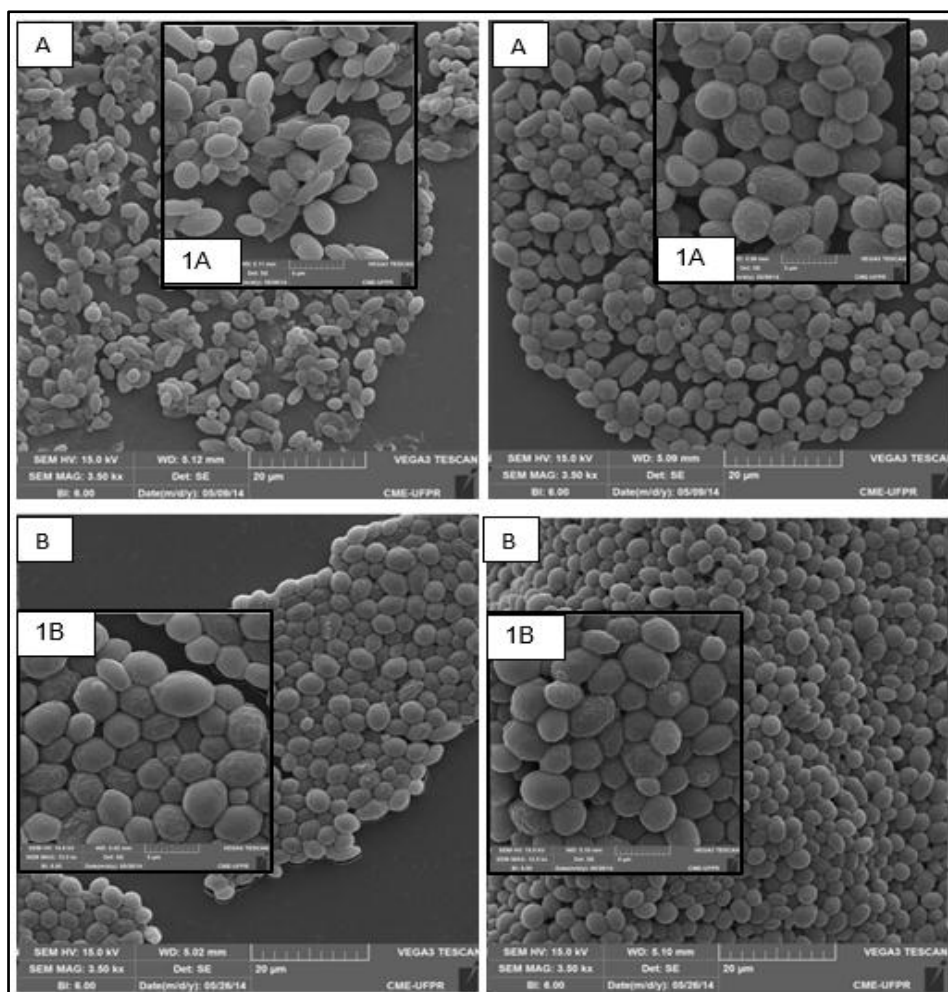
#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS ENCONTRADAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Através da análise por microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar as características das leveduras isoladas nas análises dos iogurtes que serão apresentadas na sequência. Os resultados obtidos das dimensões das leveduras foram comparadas pelo teste de Tuckey ao nível de significância de 5% pelo programa estatística Statística 8.0.

Na microscopia eletrônica de varredura foram verificadas diferenças físicas entre as leveduras isoladas da mesma amostra, algumas colônias apresentavam rugosidade e outras possuíam superfície mucosa (lisa)

característica, visualizando-se forma da organização com células ovais, elípticas e alongadas, e, além disso, diferentes tipos de brotamento (bipolar e multilateral). Com a MEV foi possível realizar um estudo mais detalhado sobre dimensões (largura e comprimento) das colônias, e mostrar mudanças na organização celular, como por exemplo, padrão de brotamento.

A FIGURA 14 refere-se à análise ultraestrutural das leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente, onde são observadas a organização das colônias.



**FIGURA 14 – ORGANIZAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.**

A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 3.500x; 1A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 12.000x; B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 3.500x; 1B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 12.000x

Fonte: O autor (2014)

É perceptível que ambas as leveduras são semelhantes em sua organização, forma de colônias e padrões de brotamento. Foi observado que em *S. cerevisiae* as colônias parecem estar formando cachos, além disso, apresentaram células com parede celular mais rugosas quando comparadas a *K. marxianus* que exibe maior organização, células parecem ligadas a formação de aglomerados maiores, mais organizadas e interconectadas entre si, além de colônias com superfícies mais lisas.

Martins (2009), através de microscopia eletrônica de varredura apresentou como característica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, parede celular íntegra com porosidades. A característica das leveduras são colônias lisas, porém na análise de MEV são perceptíveis que muitas colônias observadas apresentaram superfícies rugosas. Essas leveduras em processos industriais são chamadas de leveduras selvagens, não fazem parte do processo. No caso do iogurte, possivelmente a contaminação foi originada pelos ingredientes adicionados durante a produção, não há relato em estudos que evidenciem a presença dessas leveduras rugosas em produtos lácteos.

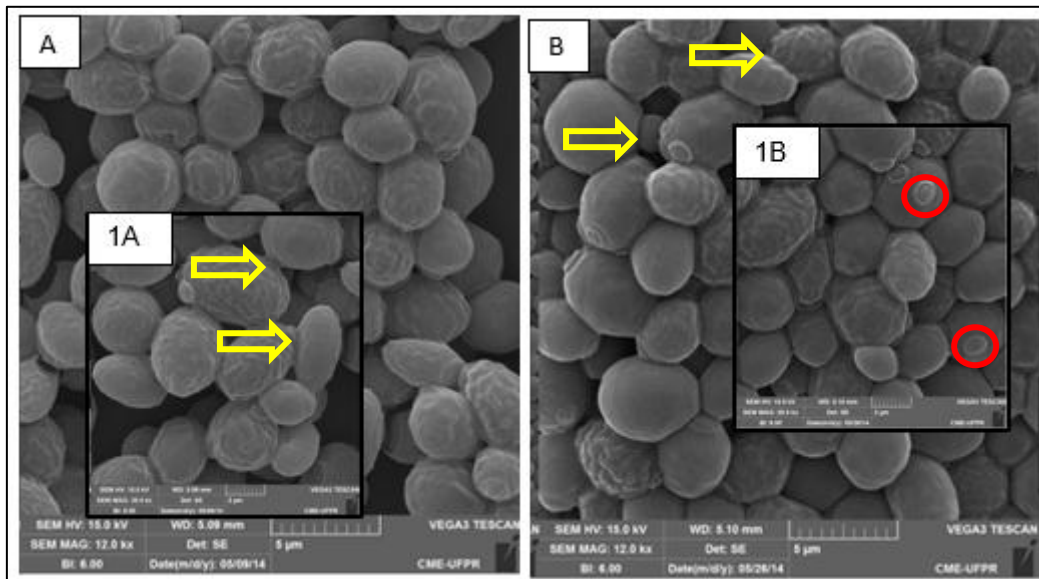
A parede celular das leveduras é porosa, seus poros são distribuídos ao acaso. Apresentam pequena dimensão e atuam como filtros para substâncias de peso molecular menores de 4.500 daltons (MARTINS, 2009).

Segundo Andrietta (2007), *S. cerevisiae* possui habilidade de desenvolver biofilme, essa característica torna a levedura problemática para eliminação. Sua redução na indústria não é simples, pois mesmo com a limpeza, esses biofilmes ficam aderidos na superfície dos equipamentos não sendo possível sua visualização, necessitando métodos mais robustos de higiene e a comprovação da limpeza como, por exemplo, equipamento de bioluminescência.

Lopes (2010) observou que células rugosas exibem um padrão polarizado e formam células desconectadas ao contrário de células lisas. Em colônias lisas, as células parecem estar individualizadas com pequenos brotos ligados à célula-mãe.

A FIGURA 15 evidencia os brotamentos das células e cicatrizes dos brotamentos em um aumento de 12.000x e 20.000x. *S. cerevisiae* se reproduz por gemulação multilateral, a nova gemula é formada na porção lateral da

célula mãe. Em *K. marxianus* os brotamentos, em sua grande maioria, ocorreram de forma polarizada.



**FIGURA 15** – BROTAMENTO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

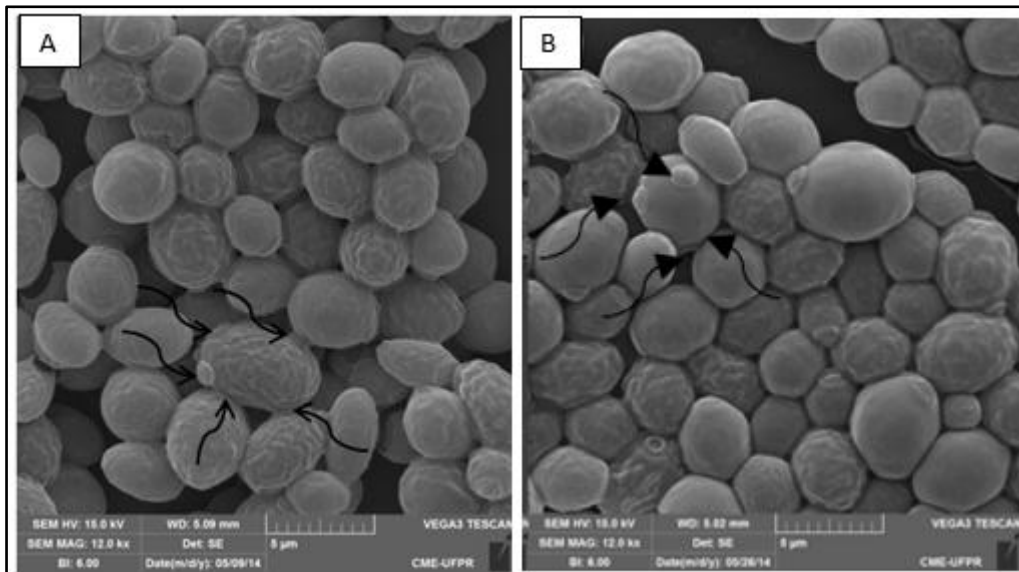
A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 12.000x; 1A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 20.000x; B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 12.000x; 1B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 20.000x

Fonte: O autor (2014)

As células se reproduzem por brotamento, a célula se desprende do corpo da célula mãe deixando uma cicatriz circular ou ovalada na superfície da célula (MARTINS, 2004).

Em *S. cerevisiae* pequenos brotos surgem ao lado da primeira cicatriz (bipolar) ou do lado contrário ao nascimento (monopolar). *K. marxianus* são unicelulares e possuem capacidade de se reproduzir por pseudomicélio, primeiramente por reprodução assexuada por brotamento multilateral (LOPES, 2010; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996 citados por SOUZA JUNIOR, 2004).

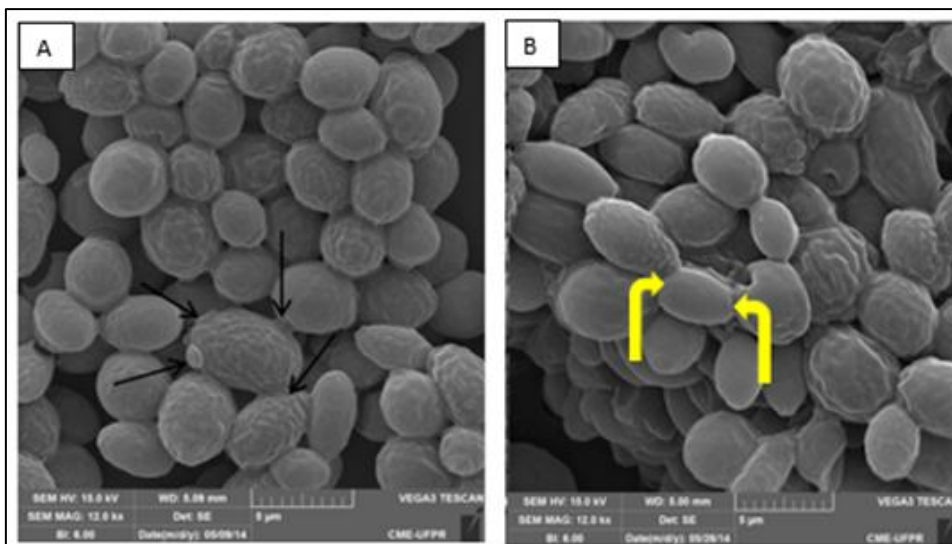
As FIGURA 16 e FIGURA 17 exibem padrões de brotamento em aumento de 12.000x. Em muitas dessas colônias havia células com vários brotamentos em diferentes pontos da superfície, ou seja, pequenas colônias ligadas à célula mãe, sendo essa mais uma característica de *S. cerevisiae*.



**FIGURA 16** – BROTAMENTOS LIGADOS EM CÉLULAS MÃE DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.  
 A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 12.000x; B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 12.000x  
 Fonte: O autor (2014).

*S. cerevisiae* e *K. marxianus* são consideradas GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), por isso são utilizadas em diversas áreas como, por exemplo, fabricação de bebidas (vinho, cerveja), produção de alimentos (pão) e indústria química (enzimas) (MARTINS, 2004).

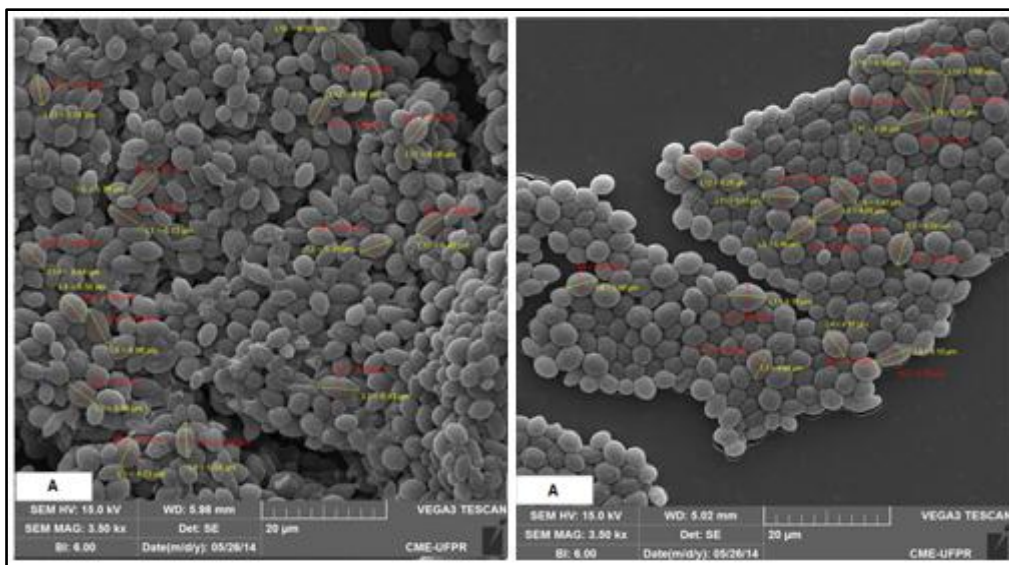
A formação de cadeia de células alongadas ocorre devido à limitação dos nutrientes no meio, sendo o principal responsável a falta de glicose (KRON e GOW 1995).



**FIGURA 17**– FORMAS BROTAMENTO POLAR E MULTILATERAL EM LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.  
 A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 12.000X; B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 12.000x  
 Fonte: O autor (2014)

Glicose é a fonte de carbono preferido da *S. cerevisiae*, na presença desse açúcar as demais fontes de carbono são reprimidas por um sistema definido como repressão catabólica (CONRAD *et al.*, 2014).

Na FIGURA 18 e TABELA 11 são apresentadas as dimensões das células no aumento de 3.500x onde foram realizadas medidas de dimensões das duas leveduras: *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.



**FIGURA 18** – DIMENSÕES DAS CÉLULAS DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.  
 A - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* aumento de 3,500x; B - Levedura *Kluyveromyces marxianus* aumento de 3.500x;  
 Fonte: O autor (2014).

**TABELA 11 –DIMENSÕES (µm) *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.**

<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>		<b><i>Kluyveromyces marxianus</i></b>	
<b>LARGURA</b>	<b>COMPRIMENTO</b>	<b>LARGURA</b>	<b>COMPRIMENTO</b>
2,3	5,1	3,2	6,1
1,9	4,6	4,2	6,6
2,7	5,1	3,5	6,1
3,0	5,2	3,5	4,9
2,6	5,0	3,4	5,0
2,7	4,9	4,1	5,1
3,0	4,9	3,3	5,4
2,6	5,2	3,6	5,4
2,2	5,1	4,2	5,0
2,4	4,8	4,2	5,5
2,1	5,3	3,7	5,8
2,3	5,3	4,0	6,1
2,5	5,4	3,5	6,4
2,4	5,6	4,4	4,7
2,2	5,7	3,6	5,6
3,9	6,9	4,9	6,4
4,4	6,1	4,7	6,1
4,1	4,6	4,2	5,8
4,3	5,3	3,9	4,3
4,2	4,9	3,6	5,9
4,1	5,1	3,9	5,9
3,7	5,2	3,8	5,4
3,8	5,3	4,5	5,7
3,8	4,7	4,4	5,5
4,2	5,3	2,9	5,0
4,4	5,0	2,8	4,6
3,8	5,3	2,9	5,1
4,0	5,7	4,2	5,5
3,6	5,0	3,7	4,7
3,6	5,2	3,6	4,6

Fonte: O autor (2014)

Em média foram obtidos:

- *S. cerevisiae*: 3,22 µm de largura e 5,22 µm de comprimento. Medidas também relatadas no estudo de Carvalho *et al.* (2006), mostraram valores muito próximos aos encontradas nesse estudo, sendo de 5 µm de largura e 6-8 µm de comprimento. O mesmo fato foi comprovado por MARTINS (2009), onde as células apresentaram cerca de 4 a 8 µm de largura e 5 a 9 µm de comprimento.

- *K. marxianus*: 3,79 µm de largura e 5,46 µm de comprimento. Não foram encontrados dados referentes às dimensões da levedura *K. marxianus*. Porém, alguns trabalhos, como por exemplo, LACERDA (2002), comparam ambas as leveduras, *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, em diversos aspectos como por exemplo aparência, superfícies, aplicações tecnológicas, e dessa forma

assume-se esses valores como sendo dimensões adequadas da levedura em questão.

Na TABELA 12 é apresentada análise estatística das dimensões e observa-se que não ocorreu diferença significativa quando comparado o comprimento das leveduras, porém entre as largas há diferença significativa ao nível de 5%, *K. marxianus* é mais larga quando comparada com *S. cerevisiae*.

**TABELA 12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE DIMENSÕES DAS LEVEDURAS**

*Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

Tukey HSD test; variable NewVar2 (Spreadsheet1) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MSE = ,38393, df = 116,00					
Cell No.	Parametros	Médias Mean	1	2	3
1	Largura <i>S. Cerevisiae</i>	3,223333		****	
2	Largura <i>K. Marxianus</i>	3,799667			****
3	Comprimento <i>S. Cerevisiae</i>	5,220333	****		
4	Comprimento <i>K. Marxianus</i>	5,460667	****		

Fonte: O autor (2014)

Silva (2008), em estudo também abordou que diversas estruturas celulares das leveduras são baseadas na espécie *S. cerevisiae*. Entre *S. cerevisiae* e *K. marxianus*, a principal diferença encontrada entre elas foi o metabolismo de carbono quanto à utilização preferencial da via respiratória para obtenção de energia, sobre a fermentativa (ROCHA, 2010).

A composição elementar das leveduras varia devido o substrato em qual é cultivado. A forma de obtenção pode alterar sua composição. A TABELA 13 apresenta o resultado da composição elementar da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da *Kluyveromyces marxianus*.

**TABELA 13 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS *S. cerevisiae* e *K. marxianus*.**

Elemento	%	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<b>Carbono (C)</b>	65,96	66,6
<b>Oxigênio (O)</b>	28,06	27,19
<b>Sódio (Na)</b>	1,78	2,03
<b>Magnésio (Mg)</b>	0,48	0,55
<b>Silício (Si)</b>	1,78	1,80
<b>Fósforo (P)</b>	1,39	1,29
<b>Cálcio (Ca)</b>	0,56	0,54

Fonte: O autor (2014)

Os principais elementos presente na levedura são carbono e oxigênio, representando mais de 90% da matéria seca. Esses elementos formam substâncias como carboidrato, proteínas e bases orgânicas (BELLUCO, 2001). Seguindo dos principais constituintes elementares (C e O) é notável que as leveduras isoladas *S. cerevisiae* e *K. marxianus* são excelentes fontes de Na e Si.

Diversos estudos relatam a composição elementar das leveduras isoladas nesse trabalho em bebidas. Não foram encontrados relatos em literatura da composição elementar de leveduras isoladas na matriz láctea.

## 5 CONCLUSÃO

O estufamento de embalagem de iogurtes é consequência da produção de gás e expansão da mesma, ocasionado em grande maioria dos casos por ação de leveduras. Paralelamente a esse estufamento ocorre a proliferação de odores (odor de malte causado pelas leveduras), alteração da textura (torna-se mais líquido) e descoloração não características do produto.

No presente estudo evidenciou-se multiplicação de leveduras em potes de iogurte, praticamente metade dos potes avaliados apresentaram população de leveduras maior do que o estabelecido pela legislação durante a vida de prateleira. Isso não significa que a indústria não enalteceu as boas práticas, mas que possivelmente essa contaminação seja carregada através dos ingredientes adicionados ao processo, como por exemplo, a polpa da fruta.

Foi evidenciado durante a vida de prateleira o estufamento prematuro dos potes de iogurtes logo após sair da indústria para o mercado, ou seja, consumidores podem estar observando esse problema na distribuição. A temperatura de armazenamento é crucial para evitar a perda da qualidade por esse microrganismo, uma vez exposta a temperaturas elevadas a população de leveduras multiplica-se de forma exponencial.

Nos iogurtes estufados, armazenados em ambiente forçado foram isoladas leveduras responsáveis por esse estufamento. O fenômeno também ocorreu em ambiente refrigerado, mas não foi observada multiplicação de leveduras.

As leveduras que causaram estufamento nos potes de iogurte foram identificadas pelo sistema comercial API 20C AUX, o sistema apresentou boa identificação para essa matriz. As leveduras isoladas são consideradas seguras pelo FDA. *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* são leveduras que possuem capacidade industrial reconhecida, a primeira na produção de bebidas e panificação, a segunda como produtora de enzima  $\beta$ -galactosidase, muito utilizada na hidrólise de lactose em galactose e glicose.

Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar as características das leveduras isoladas. Foram verificadas diversas semelhanças entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, por exemplo, padrões de brotamento, característica da superfície, organização

celular e dimensões. As dimensões das leveduras foram medidas através da MEV e constatado que não houve diferença significativa no comprimento das leveduras, mas na largura observou-se diferença de aproximadamente 17%, sendo a *K. marxianus* mais larga do que a *S. cerevisiae*.

A pesquisa dos microrganismos psicrotróficos que estão causando o estufamento em iogurtes armazenados em temperatura refrigerada e também o estufamento oriundo de iogurtes adicionados de pedaços de frutas são incógnitas que devem ser estudadas em futuro próximo para que as perdas sejam minimizadas.

## REFERENCIAS

3M DO BRASIL LTDA. **Petrifilm placa para contagem de *E. coli* e Coliformes**; folheto de instrução de uso. USA, 2009.

ANDRADE, Maria Auxiliadora. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **Revista Veterinária News**, v. 20, n. 119, p.10-16, 2001.

ANDRIETTA, M.G.S. *et al.* Bioethanol – 30years of Proálcool, **International Sugar Journal**, v.109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

AOAC Official **Method 991.14- Coliforms and Escherichia coli Counts in Foods, Dry Rehydratable Film (Petrifilm Count Plate)** Methods (3M Microbiology, 225-5S 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA).

BALBINOTTI, M. *et al.* **Incidência do leite instável não ácido (LINA) na região sul do Rio Grande do Sul**. Anais do XII Congresso de Iniciação Científica da UFPEL. Editora UFPEL, Pelotas, 2003.

BASTOS, P.A.M.B. **Sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 em iogurtes**. 84p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Bom Jesus do Itabapoana, 2009.

BEHMER, M.L.; ARRUDA, M.L. **Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes, e instalações: produção, industrialização e análise**. 15 ed. São Paulo: Nobel, 1987.

BELLUCO, A.E.S. **Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes**.100p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2001.

BEZERRA, M.F. **Caracterização físico-química, reológica e sensorial de iogurte obtido pela mistura dos leites bubalino e caprino**.100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

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

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa – IN n.46 - **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**, 23 de outubro de 2007.

BUESCHING, William J.; KUREK, Kathryn; ROBERTS, Glenn D. Evaluation of the modified API 20C System for Identification of clinically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 565-569, 1979.

CAGGIA, C. *et al.* Identification of *Picchia anômala* isolated from yogurt by RFLP of ITS region. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.1, p. 71-73, 2001.

CANGANELLA, F. *et al.* Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifido bacterium infantis* in yogurts manufactured from cow milk and soymilk during storage at two temperature. **Annals of Microbiology**, v. 50, p. 43-53, 2000.

CAPDEVILLE, G.*et al.* Scanning electron microscopy of interaction between *Cryptococcus magnus* and *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruit, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.11, p. 1537-1544, 2007.

CARVALHO, G. B. M.*et al.* Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. **Revista Analytica**, n.25, 2006.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2003.

CONRAD, M. *et al.* Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology**, v. 38, p. 254-299, 2014.

CORBO, M.R.; LANCIOTTI, M.; SINIGAGLIA, M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 147-152, 2001.

CONSOLI, M. A. F. *et al.* Estudo introdutório sobre o uso do petrifilm como meio base para a utilização de membrana filtrante na análise de água. **Revista analytica**, n. 25, 2006.

DEETH, H. C.; TAMINE, A. Y. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. **Journal Food Protection**, v. 44, n.1, p.78-96, 1981.

DINIZ, R. H. S. **Metabolismo de lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. 62 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

Dossiê Técnico Fabricação de Iogurtes, REDETEC - **Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, julho 2008, 33p.

ERKUS, Oylum. *et al.* High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yoghurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2013.

FERREIRA, L. C. **Aspectos Microbiológicos da Conservação de polpas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Qualidade, Higiene, Adaptação de bactérias ao estresse ácido e isolamento de microrganismos com potencial para biocervação**. 108 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FERREIRA, C. L. L. Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. 96p. **Imprensa Universitária**, 1996.

FLEET, Graham H. Spoilage yeasts. **Critical reviews in biotechnology**, v, 12, n. 1, p. 1-44, 1992.

FLEET, Graham H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 199-211, 1990.

FLEET, Graham H.; MIAN, M.A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 145-155, 1987.

FONSECA, G.G. *et al.* The yeast *kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p.339-354, 2008.

FOSCHINO, R.; GARZAROLI, C.; OTTOGALLI, G. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. **Department of Food Science and Microbiology, Food and Agricultural Microbiology Section**, v. 73, n. 4, p. 395-400, 1993.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumerations**. 2. ed. University of Toronto Press, 1978.434p.

International Organization for Standardization ISO 21527-8 (2008). **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds**. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.

JAKOBSEN, Mogens; NARVHUS, Judy. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8-9, p.755-768, 1995.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2005.

JEONG, H. *et al.* Genome Sequence of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces Marxianus* var. *marxianus* KCT 17555. **Eukaryotic Cell**, V. 11, n. 12, p. 1584-1585, 2012.

KASVI, Agar MRS. Rev. 1. 2013. Disponível em: [http://www.kasvi.com.br/pdf/4f3887e6bb229eb5e4c8ad4f66151da9\\_arquivo.pdf](http://www.kasvi.com.br/pdf/4f3887e6bb229eb5e4c8ad4f66151da9_arquivo.pdf). Acesso em 19/10/2014.

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

KRON, S.J., GOW, N.A. R.. Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**., v.7, p. 845–855, 1995.

LACERDA, Y. S. **Resistência das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ao fungicida Benomyl**. 40 p. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

LAND, G.A. *et al.* Evaluation of the new API 20C strip for yeast identification against a conventional method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 357-364, 1979.

LANE, M.M.; MORRISEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Review**, v. 24, p. 17-26, 2010.

LIMA, C. M. F. Monitoramento das temperaturas de equipamentos de refrigeração em supermercados da cidade de Maceio. **Revista Higiene Alimentar**, v. 25, n. 194-195, p. 35-39, 2011.

LOPANDIC, K. *et al.* Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 341-350, 2006.

LOPES, D. L. **Estudo molecular e morfológico de leveduras de processos fermentativos de produção de etanol**. 58 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

MANUAL OXOID – 1ª Edição, 2000. Português. Pg. 2-98.

MANUAL ACUMEDIA – 1ª Revisão, 2011. Disponível em: [http://www.neogen.com/acumedia/pdf/ProdInfo/7591\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/acumedia/pdf/ProdInfo/7591_PI.pdf). Acesso em 19/10/2014

MARTIN, A. F. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas**. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol**. 86 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MARTINS, D. B.G. **Produção de  $\beta$ -galactosidase e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* sob diferentes condições de cultivo**. 149 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

MAURICIO, Roselita. **Produção de Iogurte Batido**. 159 p. Trabalho Planejamento Instalação Industrial. Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, 2009.

MAYORAL, Maria. *et al.* Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**. v. 15, n. 105, p. 27-34, 2005.

MINERVINI, F., *et al.* Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 141-146, 2001.

MORAES, P.C.B.T. **Avaliação de iogurtes líquidos comerciais sabor morango: estudo de consumidor e perfil sensorial**. 121 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade e Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 2004.

MOREIRA, S. R. **Caracterização microbiológica de iogurtes comercializados em Lavras – MG**. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

MOREIRA, Silvana Regina. *et al.* Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 117-122, 2001.

MORENO, V.; KOSIKOWSKI, F. V. Peptides, Amino Acids and Amines Liberated from  $\beta$ -Casein by Micrococcal Cell-Free Preparations. **Journal of Dairy Science**, v.56, n.19, p.39, 1973.

NERO, L. A.; BELOTTI, V.; BARROS, M. A. F. **Desempenho do Simplate<sup>R</sup> Total Plate Count – color indicator (TPC-CI) para contagem de aeróbios mesófilos em diferentes tipos de leite pasteurizado**. XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Fortaleza, 2000.

NGUYEN, T. H; FLEET, G. H; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 206-212, 1998.

NOBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron and Microscopica Acta**, v. 29, n. 6, p. 207-233, 1998.

PEGOTA, D. C.; RAJGARHIA, V.; SILVA, N.A. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 127, 2007.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

RAVEN, P. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.

RECH, R. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces marxianus***. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**; 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ROCHA, S. N. **Expressão e secreção de proteínas heterólogas em leveduras do gênero *Kluyveromyces***. 80 p. Tese (Doutorado em Engenharia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ROOSTITA, L. B. *et al.* Determination of Yeasts Antimicrobial Activity in Milk and Meat Products. **Journal of Food Science and Technology**, v.3, n.6, p. 445-445, 2011.

RUIZ, L.S. **Fungemia por leveduras: perfis fenotípicos e moleculares e sensibilidade de amostras isoladas no hospital das clínicas de Botucatu**. 111 p. Tese (Ciência - Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2008.

SABOYA, L. V; OETTERER, M; OLIVEIRA, A.J. Propriedades Profiláticas e Terapêuticas de Leites Fermentados - Uma Revisão. Artigo Técnico. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2, n.31, p. 176-185, 1997.

SANTANA, E.H.W. *et al.* Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos. **Seminário: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SANTO, A. P. E. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com adição de polpa de frutos brasileiros e fibra dietética total**. 112 p.Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SCHABER, M.; DECHIARA, T. M.; KRAMER, R. A. Yeast Vectors for production of interferon. **Methods in Enzymology**, v. 119, p.416-423, 1986.

SILVA, A. F. **Caracterização Genética de Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações espontâneas de cachaças de alambique da Bahia**. 115 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santa, 2009.

SILVA, C.E.V. **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana de açúcar**. 53 p.Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2008.

SILVA, Jaqueline Otero; CANDIDO, Regina Célia. Avaliação do sistema API20 AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 38, n. 3, p. 261-263, 2005.

SILVA, L. C. *et al.* Aspectos microbiológicos, pH e acidez de iogurtes de produção caseira comparados aos industrializados da região de Santa Maria – RS. **Disciplinarium Scientia**, v.13, n.1, p. 111-120, 2012.

SILVA, N.; SRIKRISHNAN, S. Introduction and expression. Of genes for metabolic engineering applications in *Saccharomyces cerevisiae*. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 12, p. 197-214, 2012.

SILVA, Tassia Gomes Guimarães. **Determinação de Pontos Críticos de Controles (PCC's) em Indústria de Laticínios.** 67 p. (Graduação em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SILVA, Washington de Oliveira; GROOTENBOERZ, Cristina Silva. Sugestão de plano de análises de perigos e de pontos críticos de controle na produção de iogurte. **Pubvet - Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 33, 2008.

SOUZA JUNIOR, C. G. **Aplicação decélulas recombinadas de levedura *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo.** 77 p. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

SOUZA, G. Fatores de Qualidade do iogurte. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos.** V.21, n. 1, p.20-27. 1991.

SPREER, E. **Lactologia industrial.** 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 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.

SWAN, T. M., WATSON, K. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v.169, p. 191-197, 1998.

TOLEDO, N. M. V. **Aproveitamento de subprodutos da industrialização do maracujá para elaboração de iogurte.** 129 p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no Ambiente), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

VERWEIJ, P.E. et al. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. **Journal of Clinical Pathology**, v. 52, p.271-273, 1999.

VALSECHI, O. A. O leite e seus derivados. Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias. Araras – SP. 2001. 35p.

VIANA, T. M. L. **Caracterização Bioenergética de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinário**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

VIEIRA, E. N. R. **Influência do tipo de mosto e do gênero de levedura na formação de aminas bioativas e carbamato de etila em destilados alcoólicos**. 153 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

VILJOEN, B. *et al.* Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. **Food Research International**, v. 36, p. 193-197, 2003.

WANG, L.; JAYARO, B.M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from bulk tank milk. **Journal Dairy Science**, v. 84, 1421-1429, 2001.

WILLEMSSEN, M.; BREYNAERT J.; LAUWERS, S. Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 3, 369-375, 1997.

ZENI, M. P. Influência dos microrganismos psicrófilos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 4, n. 1, 61-69, 2013.