



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

JOSIANE SCHUCK

**QUALIDADE DO LEITE CRU NAS CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
FERMENTATIVAS DE IOGURTE INTEGRAL NATURAL**

Londrina
2014

JOSIANE SCHUCK

**QUALIDADE DO LEITE CRU NAS CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
FERMENTATIVAS DE IOGURTE INTEGRAL NATURAL**

Dissertação de Mestrado apresentado à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientador: Prof. Rafael Fagnani
Co-Orientador: Prof. Bruno Garcia Botaro

Londrina
2014

JOSIANE SCHUCK

**QUALIDADE DO LEITE CRU NA FERMENTAÇÃO,
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
MICROBIOLÓGICAS NO IOGURTE INTEGRAL NATURAL**

Dissertação apresentada à UNOPAR - Universidade Norte do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof.Dr. Rafael Fagnani
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Joice Sifuentes dos Santos
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Londrina, 30 de junho de 2014.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter conquistado esta jornada que ficará marcada durante toda minha vida, e com Sua bênção pude lutar e conquistar mais uma vitória na minha vida.

À minha mãe, Marinês Schuck, que mesmo distante geograficamente, está sempre perto do meu coração, torcendo por mim, me apoiando de todas as maneiras, muitas vezes abrindo mão de sua própria vida para poder suprir e realizar este meu sonho. Obrigada por ser essa mãe tão amada e dedicada.

Ao meu pai, Egon Schuck, que há anos está ao lado de Deus, mas nos meus pensamentos diários. Meu eterno agradecimento pelo carinho, pelos momentos juntos e, ao lado de minha mãe, me dar a chance em ter uma vida feliz e cheia de realizações. Meu amor incondicional aos dois.

Ao meu dedicado orientador de curso Profº. Dr. M.V. Rafael Fagnani, professor competente que soube me direcionar com muita sabedoria. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos, paciência e na confiança depositada em mim ao longo desses meses de trabalho.

Ao Profº. Dr. M. V. Bruno Botaro, admirável co-orientador, me ensinando e indicando o caminho a seguir para a concretização deste sonho. Muito obrigada pela dedicação e atenção.

À Profº. Dra. Lina Casale Aragon Alegro, coordenadora do Mestrado de Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, e aos demais Professores deste curso, pessoas de grande valor e sabedoria. Fico muito feliz e honrada pela oportunidade de poder atuar e aprender ao lado desses excelentes profissionais, incansáveis na tentativa de ensinar e consolidar os ensinamentos adquiridos durante todo o curso.

Aos atenciosos técnicos de laboratório e estagiários que estiveram ao meu lado, agradeço pela doação do seu tempo e disposição ao meu trabalho e suas inúmeras repetições.

A CAPES, por financiar este estudo e facilitar a busca ao conhecimento.

Muito obrigada!

*“O conhecimento nos faz responsáveis”
(Che Guevara)*

SCHUCK, Josiane. **Qualidade do leite cru nas características físico-químicas, microbiológicas e fermentativas no iogurte integral natural**. 2014. 56 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade do Norte do Paraná, Londrina, 2014.

RESUMO

O iogurte é um produto consolidado no mercado mundial e pode ser considerado nobre, pela alta exigência da qualidade da matéria-prima. Dependendo da quantidade e do tipo de micro-organismo presentes, a sua produção e rendimento podem ser prejudicados, reduzindo a vida de prateleira e a aceitação do produto final. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da qualidade microbiológica do leite cru na cinética de fermentação, durante a produção de iogurte, e nas suas características microbiológicas e físico-químicas durante a vida de prateleira. Três tratamentos foram avaliados: (1) produção de iogurte a partir de leite cru com até 4h de armazenamento a 4°C; (2) produção de iogurte a partir de leite cru com 72h de armazenamento a 4°C; (3) produção de iogurte a partir de leite cru com 168h de armazenamento a 4°C. Durante a produção do iogurte, os parâmetros avaliados foram a velocidade máxima de produção de ácido láctico (g/L.h), a velocidade máxima de crescimento de *Streptococcus thermophilus* (UFC/L/h) e a velocidade máxima de crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Para avaliar as características físico-químicas e microbiológicas durante a vida de prateleira, o iogurte de cada tratamento foi avaliado em três momentos: (1) com 24h de armazenamento a 4°C; (2) com 7 dias de armazenamento a 4°C; e (3) com 15 dias de armazenamento a 4°C. Os parâmetros avaliados foram: pH, acidez Dornic, proteína total, gordura, lactose, sólidos totais, cinzas, contagem de *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli*. A qualidade microbiológica do leite cru foi prejudicada pela estocagem por 186h, aumentando proporção de psicrotóxicos sobre mesófilos, que afetou negativamente a produção e a vida de prateleira do iogurte, diminuindo a velocidade de produção de ácido láctico, crescimento de *S. thermophilus* na fermentação e reduzindo o percentual proteico do produto final.

Palavras-chave: fermentação, cinética, psicrotóxicos, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*.

SCHUCK, Josiane. **Quality of raw milk on physicochemical, microbiological and fermentative of whole set yogurt.** 2014. 56 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade do Norte do Paraná, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Yogurt is a consolidated product on the world market and can be considered noble, due requirement of high quality raw material. However, milk with high bacterial counts, especially psychrotrophics, directly affects the production and yield of dairy products, reducing the shelf life and product acceptance. The goal is evaluate how microbiological quality of raw milk influences the kinetics of fermentation on production of yogurt and its microbiological and physical-chemical properties during shelf life. Three treatments were evaluated: (1) production of yogurt from raw milk with up to 4h of storage at 4°C, (2) production of yogurt from raw milk at 72h of storage at 4°C, (3) production of yogurt from raw milk at 168h of storage at 4°C. During the production of yogurt, it was evaluated the speed of production of lactic acid (g/Lahr), the speed of growth of *Streptococcus thermophilus* (CFU/L/h) and the speed of growth of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. To evaluate the physical-chemical and microbiological parameters during shelf life, yogurt of each treatment was evaluated in three stages: (1) at 24h of storage at 4°C; (2) at 7th day of storage at 4°C; and (3) 15th day of storage at 4°C. Parameters evaluated were be: pH, Dornic acidity, total protein, fat, lactose, total solids, ash, count *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, yeast and mold, total coliforms and *E. coli*. The microbiological quality of raw milk was impaired by storage during 168h, increasing proportion of psychrotrophic on mesophilic, and adversaly affected production and shelf life of yogurt, slowing production of lactic acid, reducing growth of *S. thermophilus* during fermentation and reducing percentage of protein on final product.

Keywords: fermentation, kinetics, psychrotrophic, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de fluxograma para produção de iogurte Natural e de iogurte Batido.....	12
Figura 2 - Morfologia da célula de <i>Streptococcus thermophilus</i>	14
Figura 3 - Morfologia da célula de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	15
Figura 4 - Esquema demonstrativo da relação de simbiose entre <i>L. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i> na produção de iogurte.....	16
Figura 5 - Mediana e quartis ($Q_{1/4}$ - $Q_{3/4}$) da contagem de aeróbios mesófilos (Am), de psicrotróficos (Psi), de coliformes totais (Ct) e de <i>E. coli</i> (Ec) em leite cru, segundo o tempo de armazenamento a 4°C.....	37
Figura 6 - Mediana e quartis ($Q_{1/4}$ - $Q_{3/4}$) de pH, gordura e proteína em leite cru segundo o tempo de armazenamento a 4°C.....	39
Figura 7 - Variação das contagens de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> durante a fermentação de iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	42
Figura 8 - Variação do pH, na concentração de ácido láctico e na velocidade de formação de ácido láctico em iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	42
Figura 9 - Variação de pH, gordura e proteína durante a vida de prateleira do iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	44
Figura 10 - Variação na porcentagem de proteína em iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	46
Figura 11 - Variação de <i>S. thermophilus</i> e de <i>L. bulgaricus</i> durante a vida de prateleira de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo da participação (%) da aquisição de leite nas regiões brasileiras, no segundo trimestre dos anos 2012 e 2013.....	17
Tabela 2 - Mediana (<i>Mdn</i>), média (\bar{X}), desvio padrão (σ) e valores mínimos e máximos (F) de pH, acidez Dornic, gordura, proteína, contagem de aeróbios mesófilos (<i>Am</i>), de psicotróficos (<i>Psi</i>), de coliformes totais (<i>Ct</i>) e de <i>E. coli</i> (<i>Ec</i>) em leite cru, segundo o tempo de armazenamento a 4°C.....	36
Tabela 3 - Mediana (<i>Mdn</i>), média (\bar{X}), desvio padrão (σ) e valores mínimos e máximos (F) da velocidade média de produção de ácido láctico ($V_m.$ ác); de crescimento de <i>S. thermophilus</i> ($V_m.$ St) e de <i>L. bulgaricus</i> ($V_m.$ Lb), do tempo até pH 5.0 ($t_{pH\ 5,0}$) e pH 4.5 ($t_{pH\ 4,5}$) tempo para velocidade máxima de produção de ácido láctico ($t_{vmáx\ \acute{A}c}$); tempo para velocidade máxima de crescimento de <i>S. thermophilus</i> ($t_{vmáx\ St}$) e <i>L. bulgaricus</i> ($t_{vmáx\ Lb}$) em de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	40
Tabela 4 - Mediana (<i>Mdn</i>), média (\bar{X}) e desvio padrão (σ) de pH, acidez Dornic, gordura, proteína, contagem de <i>S. thermophilus</i> (<i>St</i>), de <i>L. bulgaricus</i> (<i>Lb</i>), de coliformes totais (<i>Ct</i>), de <i>E. coli</i> (<i>Ec</i>) e de bolores e leveduras (<i>Bl</i>) durante a vida de prateleira de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.....	43

SUMÁRIO

1 Revisão bibliográfica	11
1.1 Iogurte e bactérias ácido-láticas.....	11
1.2 Qualidade do leite, derivados lácteos e micro-organismos psicrotóxicos...	16
Referências.....	23
2 Objetivos	26
2.1 Gerais.....	26
2.2 Específicos.....	26
3 Artigo para publicação	27
Resumo.....	28
Abstract.....	29
3.1 Introdução.....	30
3.2 Material e métodos.....	31
3.2.1 Matéria-prima.....	31
3.2.2 Processamento e análises.....	31
3.2.2.1 Leite.....	31
3.2.2.2 Cultura.....	32
3.2.2.3 Iogurte integral natural.....	33
3.2.3 Envase e armazenamento.....	34
3.2.4 Estatística.....	35
3.3 Resultados e discussão.....	35
3.3.1 Leite cru.....	35
3.3.2 Fermentação.....	39
3.3.3 Iogurte.....	43
3.4 Conclusão.....	48
Referências.....	49
4 Fluxograma	52
5 Conclusões Gerais	53
Anexos.....	55
Anexo A – Informativo Técnico Cultura CHR FD-DVS YF-L812 Yo-Flex®.....	56

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 IOGURTE E BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

A origem do iogurte não é bem esclarecida, mas acredita-se que ocorreu juntamente à domesticação do gado leiteiro e à utilização do leite do rebanho para alimentação humana. A transformação do leite em iogurte era uma maneira de promover maior tempo de vida útil para esse alimento, em épocas onde a refrigeração era escassa. Existem registros de leite fermentado já nos tempos do velho Egito (TAMINE e ROBINSON, 1999).

Nos dias atuais, o consumo de iogurte está amplamente difundido no mercado brasileiro e mundial. Os maiores consumidores de iogurte são a Ásia e a Europa Central, sendo a Bulgária quem apresenta a maior quantidade *per capita*. No Brasil, o iogurte foi introduzido nos anos 1930, com a imigração europeia; entretanto, o consumo só foi considerado significativo a partir de 1970 (KROLOW, 2008).

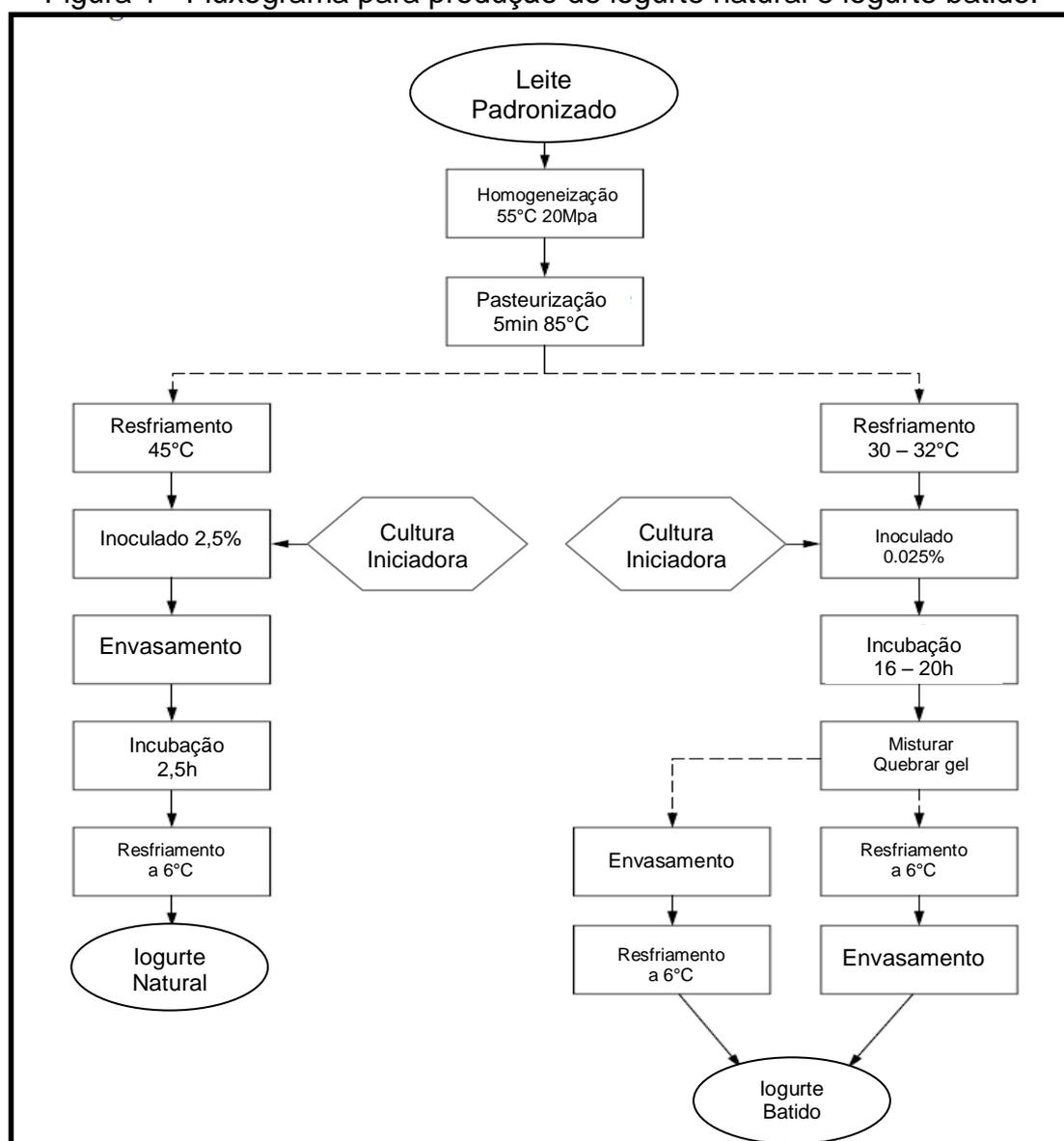
A Instrução Normativa nº 46/2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, enquadra o iogurte no gênero de produtos lácteos fermentados, que se define por um alimento obtido pela coagulação e diminuição do pH do leite por fermentação láctica, mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos, adicionado ou não de outros produtos lácteos e/ou outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2007).

Para ser considerado iogurte propriamente dito, a fermentação deve ser realizada com culturas mistas dos micro-organismos ácido-lácticos *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e de forma complementar outras bactérias ácido-lácticas podem contribuir para a determinação das características do produto final. O iogurte natural pode ser assim designado quando produzido somente com leite e cultura fermentadora. Na descrição do produto pode-se mencionar “desnatado”, quando a quantidade de gordura máxima presente no iogurte for de 0,5%; “semi-desnatado”, entre 0,5 a 2,9% de gordura; ou “integral” quando tiver no mínimo 3% de gordura. Com a inclusão de demais aditivos como açúcar, frutas, espessantes e adoçantes, o iogurte perde sua denominação de “natural” (BRASIL, 2007).

Existem diversas maneiras de manufaturar o iogurte, que diferenciam-se por

seu processamento e ingredientes, dentre os quais podemos citar o iogurte natural, o batido, de frutas, sorvete de iogurte e iogurtes para beber. As versões mais consumidas são o natural e o batido (Figura 1). No iogurte natural, o processo de envase é feito antes da fermentação, promovendo a formação do coágulo na própria embalagem que chegará ao consumidor. Ao contrário, no iogurte batido a fermentação é feita em larga escala, formando um grande gel, o qual é quebrado por agitação, para assim, ser envazado e comercializado. A temperatura para inoculação e a quantidade de cultura presentes em cada tipo de iogurte são diferentes, influenciando no tempo de fermentação e nas suas características finais (WALSTRA et al., 2006).

Figura 1 - Fluxograma para produção de iogurte natural e iogurte batido.



Fonte: Walstra et al., (2006)

O leite, quando ordenhado de um úbere saudável, é essencialmente estéril e se contamina no momento da ordenha. Dentre os micro-organismos contaminantes, as bactérias ácido-láticas (BAL) estão presentes em maior número, principalmente quando não é feito o resfriamento do leite imediatamente após a ordenha. Sem refrigeração, as BALs se desenvolvem rapidamente, metabolizando a lactose em ácido láctico, reduzindo o pH do leite, promovendo a precipitação da caseína e, assim formando o gel que caracteriza o iogurte. Entretanto, para obter-se as características esperadas deste nobre produto lácteo, é necessária a adição de BALs específicas, cujos metabólitos promovam sabor, cremosidade e homogeneidade característicos do iogurte (FOX e McSWEENEY, 1998).

De acordo com Mozzi et al. (2010), as BALs tem a propriedade de metabolizar carboidratos presentes no meio e transformá-los em ácido láctico, sendo que, no caso do leite, este carboidrato é a lactose. Na sua grande maioria, as BALs são Gram-positivas, anaeróbias facultativas e não apresentam capacidade de esporular. Os principais gêneros deste grupo são os *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, entre outros. Estas bactérias estão presentes em muitos alimentos, por contaminação ou adicionadas, cujas enzimas também são responsáveis por características reológicas, sensoriais e nutricionais do produto final.

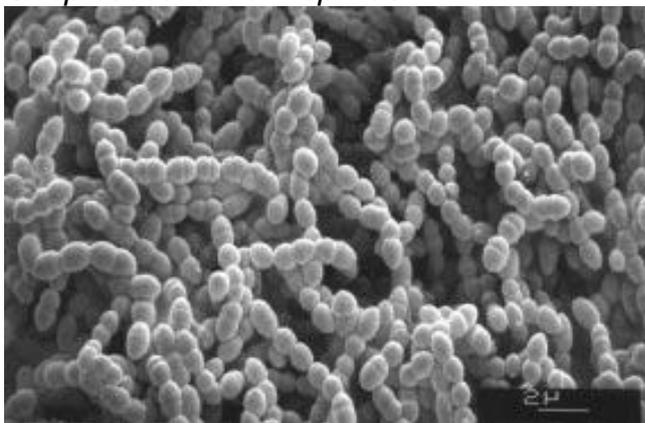
A cultura ácido-lática específica para produção de iogurte, formada pelas bactérias *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, tem característica lactose-homofermentativa. Na homofermentação, a lactose entra na célula da BAL, no citoplasma é hidrolisada pela β -galactosidase e transformada em glicose e galactose. A glicose é catabolizada em piruvato e tem como metabólito final o lactato ou ácido láctico, enquanto a galactose retorna livre para a fase aquosa do leite (TAMINE; ROBINSON, 1999).

De acordo com Oliveira et al. (2009), as bactérias lácticas fermentam o leite utilizando lactose e citrato, os quais permitem acúmulo de ácido láctico e outros compostos que beneficiam as qualidades sensoriais e de textura do produto. O ácido láctico é derivado da lactose (piruvato). O diacetil e acetoína são derivados do metabolismo do citrato, ambos produtos aromáticos que agregam propriedades específicas para iogurtes.

A textura do iogurte resulta de uma complexa interação entre as proteínas do leite, ácido láctico e dos exopolissacarídeos (EPS) produzidos por algumas culturas. Características importantes esperadas no iogurte incluem firmeza, suavidade, viscosidade e estabilidade do gel (HAYES; BOOR, 2001). EPS em produtos lácteos podem promover estabilidade e viscosidade ao iogurte, por fixar moléculas de água ao gel e afetar positivamente na textura, sensação de boca e sabor (BROADBENT et al., 2003).

Streptococcus thermophilus (Figura 2) são bactérias Gram-positivas, de forma ovóide, anaeróbias homofermentativas, formadores de cadeias e produtoras de lactato, acetaldeído e diacetil, quando em meio lácteo. Algumas cepas podem produzir EPS. São termófilas, portanto sua multiplicação é inibida abaixo de 15°C e podem crescer até 45°C, sendo 37°C a temperatura ideal para desenvolvimento (TAMINE; ROBINSON, 1999). São bactérias que mantêm a textura e viscosidade dos iogurtes durante o armazenamento (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 2 - Morfologia da célula de *Streptococcus thermophilus*

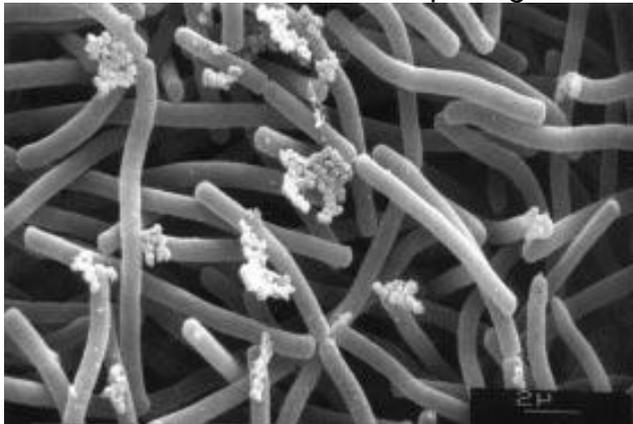


Fonte: Walstra et al. (2006)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (Figura 3) são as BALs mais ácido-tolerantes e começam sua multiplicação em pH 6,2 a 5,5. São capazes de reduzir o pH do leite inoculado para abaixo de 4,0 (HAYES; BOOR, 2001). São importantes pela produção de ácido láctico em grandes volumes durante a fermentação, essencial para a formação do gel. Entretanto, continua lentamente a formação deste ácido mesmo durante o armazenamento refrigerado (pós-acidificação), podendo provocar acidez intensa e desagradável ao iogurte, característica recusada pelo consumidor (MOHAMMADI et. al, 2012). Tamine e Robinson (1999) definem estes micro-

organismos como bactérias homofermentativas obrigatórias que produzem lactato, acetaldeído e, algumas cepas, EPS. Em temperaturas de refrigeração (<10°C), pode ocorrer leve crescimento, assim como em temperaturas a 55°C. Sua temperatura ótima para desenvolvimento é 45°C.

Figura 3 - Morfologia da célula de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

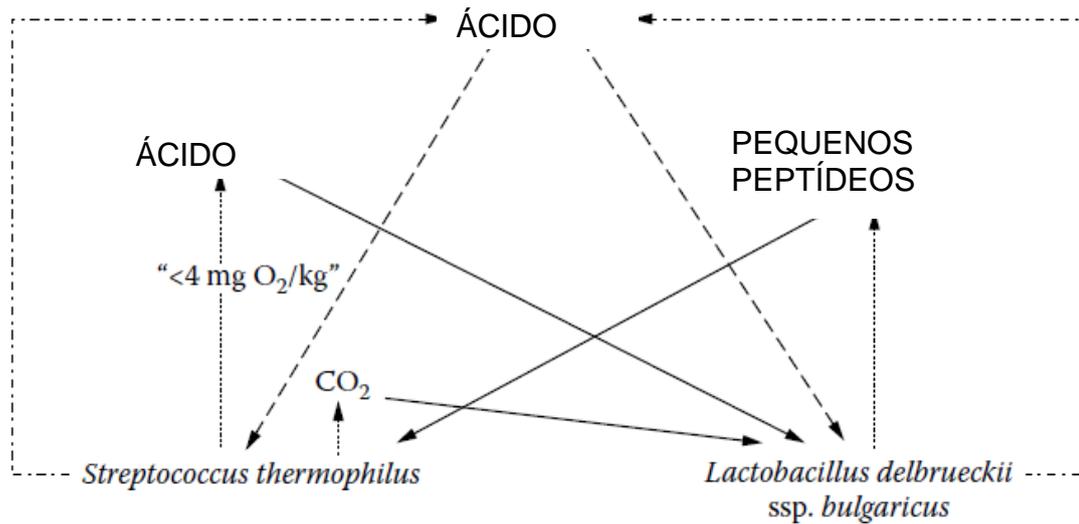


Fonte: Walstra et al. (2006)

Os micro-organismos característicos da produção do iogurte multiplicam-se em uma relação de simbiose (Figura 4), resultando em uma rápida acidificação do leite: o *L. bulgaricus* libera os aminoácidos e peptídeos da caseína que estimulam a multiplicação do *S. thermophilus*; já este, remove o oxigênio do meio, baixando o pH e produzindo ácido fórmico e piruvato que favorecem o desenvolvimento de *L. bulgaricus* (HAYES; BOOR, 2001).

Béal et al. (1994) compararam as características de multiplicação, acidificação e produtividade de culturas mistas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e de culturas puras isoladas. Concluíram que os micro-organismos em conjunto tem uma produtividade até 2,4 vezes maior do que culturas isoladas. Ainda, observaram que *L. bulgaricus* é mais ácido-tolerante que *S. thermophilus*, e que sua multiplicação é significativa a um pH baixo, enquanto o do *S. thermophilus* é interrompido. A união destas duas cepas na mesma cultura promove o aumento no percentual de células viáveis no iogurte, aumento na taxa de multiplicação das duas cultura e produção de ácido láctico durante a fermentação.

Figura 4 - Esquema demonstrativo da relação de simbiose entre *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* na produção de iogurte.



Fonte: Walstra et al. (2006)

1.2 QUALIDADE DO LEITE, DERIVADOS LÁCTEOS E MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS

Com a implantação do Programa Nacional de Qualidade do Leite em 1998, o Brasil começou a empregar esforços para garantir a qualidade do leite em toda cadeia produtiva. Entre outras ações, o programa previu a publicação da Instrução Normativa nº51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a qual estabeleceu padrões mínimos de qualidade e identidade para o leite produzido (BRASIL, 2002).

A IN51/2002 estabeleceu a obrigatoriedade do resfriamento do leite nas propriedades rurais, que trouxe o aumento do tempo entre a ordenha e a chegada do leite nos estabelecimentos processadores. Em 2011, alguns padrões foram revistos e a IN51/2002 foi substituída pela Instrução Normativa nº 62/2011 (BRASIL, 2011), que no momento encontra-se vigente.

Em 2009, o Brasil ocupou a 6ª posição na classificação mundial dos principais países produtores de leite, com uma produção de 27,579 milhões de toneladas do produto. Deste total, cerca de 33% são processados como leite fluido (pasteurizado e UHT) e 34% como queijos em geral (EMBRAPA, 2009). Conforme dados divulgados pelo IBGE (2013), no segundo trimestre do ano 2013, entre os estados brasileiros a região Sudeste destacou-se (Tabela 1), sendo o estado de Minas

Gerais o que mais produziu leite (26,6%), seguido por Rio Grande do Sul (13,9%) e Paraná (11,7%), ambos da região sul do país.

Tabela 1. Comparativo da participação (%) da aquisição de leite nas regiões brasileiras, no segundo trimestre dos anos 2012 e 2013.

REGIÕES BRASILEIRAS	2º TRIM 2012 (%)	2º TRIM 2013 (%)
NORTE	5,5	5,8
NORDESTE	5,4	5,1
SUDESTE	38,6	40,9
SUL	35,7	34,2
CENTRO-OESTE	14,8	14,1

Fonte: IBGE (set/2013)

A temperatura de armazenamento do leite após a ordenha é um dos principais fatores que determinam sua carga microbiológica. O armazenamento refrigerado minimiza o problema do desenvolvimento de micro-organismos mesófilos, que se desenvolvem em temperaturas entre 25 e 30°C, os quais provocam acidificação do leite através da fermentação da lactose. Entretanto, a baixa temperatura favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicotróficos, que embora sejam eliminados durante o tratamento térmico, produzem enzimas proteolíticas e lipolíticas que não são inativadas nos tratamentos usuais da indústria láctea (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Os micro-organismos psicotróficos presentes no leite cru são bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Achromobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Serratia spp.*, *Chromobacterium spp.* e *Flavobacterium spp.*; e Gram-positivas dos gêneros *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Microbacterium spp.*. Destes gêneros, o mais comumente encontrado em leite é o *Pseudomonas*, com destaque para a espécie *P. fluorescens*. Outras espécies incluem *P. fragi*, *P. putida* e *P. aeruginosa* (COUSINS; BRAMLEY, 1981; COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Muitos destes micro-organismos apresentam temperatura ótima de desenvolvimento entre 20 e 30°C, mas também podem se desenvolver em temperatura de refrigeração (MUIR, 1996).

Os principais pontos de contaminação do leite por micro-organismos

psicrotróficos são latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos e utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente (COUSIN; BRAMLEY, 1981; HAYES; BOOR, 2001). Santana et al. (2001) avaliaram cinco propriedades leiteiras na região de Londrina, e concluíram que a água residual de tanques de expansão foi a principal fonte de contaminação por psicrotróficos no processo de produção de leite. Nestes tanques, esta água apresentou contagens de psicrotróficos de até $2,6 \times 10^7$ UFC/mL.

Altas populações de psicrotróficos (até 10^7 UFC/mL) também foram encontradas em amostras de leite coletadas de tanques coletivos e individuais, onde se observou a predominância de bactérias psicrotróficas Gram-negativas (81,2%), dos gêneros *Aeromonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia spp.*, *Chryseomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Ewingella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Hafnia spp.*, *Methylobacterium spp.*, *Moraxella spp.*, *Pantoea spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Sphingomonas spp.* e *Yersinia spp.*. *Pseudomonas spp.* foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens*, a espécie predominante (ARCURI et al., 2008).

Pinto, Martins e Vanetti (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de leite cru refrigerado destinado à produção de leite UHT, e observaram que 100% das amostras dos silos industriais analisados apresentaram contagem de psicrotróficos $>10^5$ UFC/mL, sendo que 50% apresentaram contagem $>10^6$ UFC/mL. Os autores concluíram que as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não foram adequados para minimizar a contaminação microbiana e o desenvolvimento de bactérias psicrotróficas.

Souza et al. (2009) encontraram contagens de mesófilos variando de $6,2 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^7$ UFC/mL, e de psicrotróficos de $3,2 \times 10^2$ a $9,6 \times 10^5$ UFC/mL em amostras de leite cru de propriedades rurais de Minas Gerais. Quando a avaliação foi realizada no tanque comunitário utilizado por estas propriedades, as contagens médias foram de $1,8 \times 10^5$ e $7,4 \times 10^4$ UFC/mL para mesófilos e psicrotróficos, respectivamente.

Enzimas secretadas por micro-organismos psicrotróficos durante o armazenamento refrigerado do leite causam proteólise e lipólise, reduzindo seu valor econômico. A proteólise reduz o rendimento de produtos de base proteica como queijo, iogurte e leite em pó, e está relacionada a defeitos de qualidade como

alterações de sabor em leite pasteurizado e gelificação de leite UHT. O desenvolvimento da lipólise produz ácidos graxos livres, causando a rancidez do leite e produtos lácteos, e conseqüentemente, a rejeição pelos consumidores. Mesmo não havendo legislação determinando limites para estes micro-organismos no leite, existe uma convenção onde a atividade enzimática passa a ter importância quando as contagens de psicotróficos ultrapassam 10^6 UFC/mL (COUSIN, 1982; MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

A produção de proteases de psicotróficos em amostras de leite cru armazenadas a 2°C, 4°C e 7°C por 10 dias foi avaliada por Haryani et al. (2003). Os autores observaram o aumento da contagem de psicotróficos nas amostras nas três temperaturas de armazenamento. Entretanto, as contagens bacterianas foram significativamente maiores a 7°C e pouca proteólise ocorreu no leite armazenado a 2°C por 10 dias. A produção de proteases ou proteólise foi observada em 6 dias a 2°C, 4 dias a 4°C e apenas 2 dias a 7°C. Desta forma, os autores concluíram que para prevenir o desenvolvimento de psicotróficos e, conseqüentemente, a produção de proteases, o leite deve ser armazenado antes do tratamento térmico por períodos mais curtos do que os estudados neste experimento.

Nörnberg et al. (2010) não encontraram correlação entre atividade proteolítica e a contagem de psicotróficos no leite cru refrigerado de dois laticínios do estado do Rio Grande do Sul. Os autores sugerem que a proteólise está principalmente associada a linhagens específicas de bactérias psicotróficas com elevada capacidade proteolítica.

Em outro estudo, Celestino, Iyer e Roginski (1996) avaliaram o efeito do armazenamento refrigerado (4°C/48h) sobre a qualidade do leite cru. O armazenamento resultou em aumento de micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. O número de psicotróficos como proporção da contagem de mesófilos aumentou de 47% para 80% após 2 dias. Os autores ainda observaram uma maior concentração de ácidos graxos livres e menor pH no leite armazenado, resultado de sua maior ação enzimática e bacteriana, quando comparado ao leite fresco.

Outras espécies de psicotróficos com alta atividade proteolítica de leite cru de tanques e silos de armazenamento foram isoladas, tais como *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* e *Aeromonas sp.* As proteases destes micro-organismos

mostraram-se bastante resistentes aos tratamentos térmicos de pasteurização e UHT, causando a coagulação de leite UHT após 5 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Estes resultados evidenciaram o potencial dos micro-organismos psicotróficos para deterioração da qualidade dos produtos lácteos fabricados a partir de leite cru de baixa qualidade (NÖRNBERG et al., 2010).

A vida de prateleira dos produtos lácteos refrigerados é limitada pela alta atividade de água e pH favoráveis para a multiplicação microbiana. A qualidade do leite cru também pode influenciar suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. A deterioração do leite cru afeta negativamente o sabor, aroma e textura dos derivados, mesmo quando armazenados sob refrigeração (MUIR, 1996).

No trabalho realizado por Arcuri et al. (2008), a maioria das bactérias psicotróficas isoladas, de tanques comunitários e individuais, apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica em temperaturas de refrigeração inferiores a 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração do leite e, portanto, prejudicando a manufatura de produtos lácteos. A bactéria deteriorante mais evidenciada foi *Pseudomonas*. A atividade metabólica desses micro-organismos resulta em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que limitam a vida de prateleira dos produtos lácteos.

Muitas enzimas produzidas pela microbiota psicotrófica presente no leite cru são termorresistentes, ao contrário dos seus geradores, que não resistem após a pasteurização. A ação enzimática não é inibida por tratamentos térmicos ou pela fermentação, persistindo ativas mesmo em derivados lácteos beneficiados, como alimentos fermentados. Esta ação enzimática pode causar deterioração do produto final, reduzindo sua vida de prateleira, além de provocar alteração na aparência e defeitos de sabor (NÖNRBERG et al., 2010).

Segundo Pinto, Martins e Vanetti (2006), existe uma grande controvérsia entre a relação do número de bactérias contaminantes e os possíveis defeitos na qualidade do leite e derivados após o processamento. Assim, populações elevadas de psicotróficos não são necessárias para a produção de concentrações significativas de proteases termorresistentes. Ao contrário, Nörnberg et al. (2010) consideram imprudente a fabricação de produtos a partir de leite com contagens

maiores que 10^6 UFC/mL de psicrotróficos, pois a presença destas enzimas produzidas por bactérias psicrotróficas seria de grande significância e prejudicial a sua qualidade.

O leite ordenhado de um animal saudável e em boas condições de higiene é um dos requisitos principais para a obtenção de boa matéria-prima para a produção de derivados lácteos. Logo, outro critério de controle de qualidade do leite cru refrigerado, e de grande relevância na produção de derivados lácteos, é a quantificação de células somáticas presentes no leite (BRASIL, 2012).

O controle de doenças inflamatórias do úbere de um animal lactante pode ser feito pela contagem de células somáticas (CCS). As células somáticas são provenientes da descamação natural do epitélio do órgão mamário, somadas as células brancas de defesa espontânea deste animal, que ficam exacerbadas durante uma inflamação. Pela legislação vigente no Brasil (IN62/2011), é indicado totalizar valores inferiores a 6×10^5 CS/mL de leite, com adendo de redução deste índice para 5×10^5 CS/mL, no ano de 2014.

Quando os níveis de CCS estão muito altos, além de apontar um processo inflamatório mamário (mastite), funcionam como indicadores de baixas características qualitativas e higiênicas do leite. Como resultado desta resposta inflamatória, são observadas mudanças nas concentrações dos macro e micronutrientes no leite, em consequência da alteração de permeabilidade e injúria na mucosa da glândula mamária, onde são sintetizados os principais componentes lácteos. A diminuição das caseínas, o aumento de ácidos graxos livres, o incremento da concentração de minerais e das atividades proteolíticas e lipolíticas apresentam grande impacto na qualidade e rendimento de produtos lácteos (SANTOS, 2003).

Estudos feitos por Najafi et al. (2010) com iogurtes elaborados com leite de ovelha, demonstraram que amostras produzidas com leite contendo altos níveis de CCS apresentaram aumento na acidez, diminuição do pH e redução da concentração de lactose. Verificaram, também, o aumento do percentual de proteínas totais no iogurte, por efeito do grande aumento das proteínas do soro; em contrapartida, ocorreu a baixa no percentual da proteína caseica. Por conseguinte, o iogurte com maior CCS formou um gel mais firme, mas que durante a estocagem provocou maior sinerese e menor aceitação comercial.

Segundo Muir (1996), a vida de prateleira do leite e produtos lácteos pode ser definida como o tempo em que o produto permanece estável e não apresenta alterações físicas ou sensoriais. No caso dos produtos lácteos refrigerados, é diretamente influenciada pelo desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes, como os psicrotóxicos.

REFERÊNCIAS

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, nov. 2008.

BÉAL, C.; SPINLER, H. E.; CORRIEU, G. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 398. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 95-98, 1994

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agropecuária**. Comissão Especial de Planejamento, Controle e Avaliação das Estatísticas Agropecuárias - CEPAGRO, set. 2013. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf>. Acesso em 15 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o de Leite Cru Refrigerado, o de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel: alteração da Instrução Normativa nº 51. **Diário Oficial da União**, n. 251, p. 6-11, 30 dez. 2011. Seção 1.

_____. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, n. 205, p. 4, 24 out. 2007. Seção 1.

_____. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle do leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, p. 8, 14 dez. 2006. Seção I.

_____. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado do leite cru refrigerado e Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, p.13, 20 set. 2002. Seção 1.

BROADBENT, J. R. et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. A review. **Journal of Dairy Science** v. 86, n.2, p. 407–423, fev. 2003.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119-163.

DE BASSI, L. G. et al. Evaluation of physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of fermented milk beverages with buttermilk addition. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 2, p. 282–286, maio 2012.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite. **Centro de Inteligência do Leite**. 2008. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/>>, acesso em 04 set 2013.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Diary chemistry and biochemistry**. Cork: Black Academy & Professional, 1998.

HARYANI, S.; et al. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 15-20, 2003.

HAYES, M. C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L., **Applied Dairy Microbiology**. 2^a ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001, p. 59-75.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M. The starts characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks: Review. **Engineer Life Science**, v. 12, n. 4, p. 399-409, 2012.

MOZZI, F.; RAYA, R.; VIGNOLO, G.M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: novel applications**. Ames: Wiley-Blackwell, 2010.

MUIR, D. D. The shelf–life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

NAJAFI, M. N.; KOOCHKEKI, A.; VALIBAIGY, S. Effects of somatic cell counts on the physicochemical and rheological properties of yoghurt made from sheep's Milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 713–718, 2010.

NÖRNBERG, M. F. B. L. et al. Proteolytic activity among psychotropic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, fev. 2010.

OLIVEIRA, R. P.S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128 ,p. 467–472, 2009.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, set. 2006.

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

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: Brito, J. R. F.; Portugal, J. A. B. (Org.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora, 2003, v. 1, p. 139-149.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrótróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SOUZA, V. et al. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, jun. 2009.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-40, 1997.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 2. ed. CRC Press. Boca Raton, 1999.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2.ed. CRC Press. Boca Raton. 2006.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado na cinética de fermentação durante a produção de iogurte e as características microbiológicas e físico-químicas durante a vida de prateleira do iogurte.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru utilizado na fabricação do iogurte em diferentes tempos de estocagem (4h, 72h e 168h), a 4°C;
- Avaliar a cinética de fermentação para *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* em iogurtes produzidos com leite cru armazenado em diferentes tempos (4h, 72h e 168h), a 4°C;
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas durante a vida de prateleira de iogurtes produzidos com leite cru armazenado em diferentes tempos de estocagem (4h, 72h e 168h), a 4°C.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**QUALIDADE DO LEITE CRU NAS CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
FERMENTATIVAS DE IOGURTE INTEGRAL NATURAL**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da qualidade microbiológica do leite cru na cinética de fermentação, na produção de iogurte natural, e nas suas características microbiológicas e físico-químicas durante a vida de prateleira. Três tratamentos foram avaliados: (1) produção de iogurte a partir de leite cru com até 4h de armazenamento a 4°C; (2) produção de iogurte a partir de leite cru com 72h de armazenamento a 4°C; (3) produção de iogurte a partir de leite cru com 168h de armazenamento a 4°C. Durante a produção do iogurte, os parâmetros avaliados foram a velocidade máxima de produção de ácido láctico (g/L.h), a velocidade máxima de crescimento de *Streptococcus thermophilus* (UFC/L/h) e a velocidade máxima de crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Para avaliar as características físico-químicas e microbiológicas durante a vida de prateleira, o iogurte de cada tratamento foi avaliado em três momentos: (1) com 24h de armazenamento a 4°C; (2) com 7 dias de armazenamento a 4°C; e (3) com 15 dias de armazenamento a 4°C. Os parâmetros avaliados foram: pH, acidez Dornic, proteína total, gordura, lactose, sólidos totais, cinzas, contagem de *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, bolores e leveduras, coliformes totais e *Escherichia coli*. A cinética de fermentação do iogurte foi prejudicada quando o leite utilizado para a produção esteve estocado por 168h. A qualidade microbiológica do leite cru foi prejudicada pela estocagem por 168h, aumentando proporção de psicrotóxicos sobre mesófilos, que afetou negativamente a produção e a vida de prateleira do iogurte, diminuindo a velocidade de produção de ácido láctico, crescimento de *S. thermophilus* na fermentação e reduzindo o percentual proteico do produto final. Períodos de armazenamento da matéria prima superior à 72h, mesmo sob refrigeração a 4°C, são suficientes para prolongar o tempo de produção de iogurtes, diminuir seu pH e, conseqüente, sua aceitação e vida de prateleira.

Palavras-chave: fermentação, cinética, psicrotóxicos, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*.

ABSTRACT

The goal of this work was evaluate how microbiological quality of raw milk influences the kinetics of fermentation on production of yogurt and its microbiological and physical-chemical properties during shelf life. Three treatments were evaluated: (1) production of yogurt from raw milk up to 4h of storage at 4°C, (2) production of yogurt from raw milk at 72h of storage at 4°C, (3) production of yogurt from raw milk at 168h of storage at 4°C. During the production of yogurt, it was evaluated the speed of lactic acid production (g/L.h), the speed of growth of *Streptococcus thermophilus* (CFU/L/h) and the speed of growth of *Lactobacillus bulgaricus*. To evaluate the physical-chemical and microbiological parameters during shelf life, yogurt of each treatment was evaluated in three stages: (1) 24h of storage at 4°C; (2) 7th day of storage at 4°C; and (3) 15th day of storage at 4°C. Parameters evaluated were: pH, Dornic acidity, total protein, fat, lactose, total solids, ash, count *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, yeast and mold, total coliforms and *Escherichia coli* counts. Fermentation kinetic of yogurt was impaired when raw milk used for the production has been stored for 168h. Microbiological quality of raw milk was impaired by storage for 168 hours, increasing proportion of psychrotrophic on mesophilic, and adversely affected production and shelf life of yogurt, slowing production of lactic acid, reducing growth of *S. thermophilus* during fermentation and reducing the percentage of protein on final product. Raw milk storage periods up to 72h, even under refrigeration at 4°C, were sufficient to prolong the production of yogurts, decreasing its pH and, consequently, their acceptance and shelf life.

Keywords: fermentation, kinetics, psychrotrophic, *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*.

3.1 INTRODUÇÃO

Para melhoria e manutenção da qualidade microbiológica do leite cru até a chegada à indústria, a refrigeração do leite na propriedade e o transporte a granel são algumas das medidas adotadas em nosso país. Entretanto, temperaturas em torno de 4°C selecionam uma microbiota denominada psicrotrofica, que tem a temperatura ótima em torno de 25°C para desenvolver-se, porém multiplica-se sob refrigeração e produz enzimas termorresistentes que comprometem a qualidade de derivados lácteos, como iogurtes e outros leites fermentados (SANTANA et al., 2001).

O iogurte é um produto consolidado no mercado mundial e pode ser considerado nobre, pela alta exigência da qualidade da matéria-prima. Além de manter todos os valores nutricionais do leite, as diversas culturas lácteas utilizadas na produção do iogurte são benéficas à saúde, proporcionando bem-estar e saúde aos seus consumidores. Entretanto, leite com alta contagem bacteriana, principalmente do tipo psicrotrofica, afeta diretamente a produção e o rendimento do produto final, reduzindo a vida de prateleira e a aceitação do produto (TAMINE & ROBINSON, 1999).

Essa contaminação microbiológica do leite também pode resultar em alterações reológicas, como defeitos de viscosidade, além de problemas rendimento de iogurtes. Iogurtes com teor de acidez mais elevado tem menor preferência do consumidor em relação ao sabor (GIESE et al., 2010). No estudo de Çakmakçi et al. (2012), os iogurtes obtiveram notas sensoriais excelentes quando recém fabricados e armazenados, destacando sabor mais intenso e melhor consistência. No entanto, após 7 dias de estocagem refrigerada, as pontuações sensoriais e de aceitabilidade de todas as formulações diminuíram.

Considerando que a microbiota psicrotrofica pode prolongar o tempo de produção de iogurtes, bem como diminuir sua aceitação e vida de prateleira, pesquisas que avaliam a influência da qualidade do leite sobre a produção de seus derivados podem gerar dados que auxiliem indústrias e produtores a diminuir perdas e otimizar o processo fermentativo.

Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da qualidade

microbiológica do leite cru refrigerado na cinética de fermentação do iogurte natural e em suas características microbiológicas e físico-químicas durante a vida de prateleira.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 MATÉRIA-PRIMA

O leite cru utilizado em todo o experimento foi proveniente de uma propriedade em Rolândia (PR), com ordenha mecânica fechada e pré-resfriador a placas. A propriedade foi selecionada entre todas as cadastradas na Cooperativa Central Agro-Industrial (CONFEPAR), devido à sua tecnificação e repetição de bons índices de qualidade do leite, minimizando a interferência de algumas variáveis confundidoras, como contagem de células somáticas e adição de substâncias fraudulentas.

Após a ordenha e resfriamento (4°C) na propriedade, cinco litros de leite foram coletados em condições assépticas e transportados sob refrigeração em caixas de isopor com gelo reciclável para o laboratório do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da UNOPAR, em Londrina (PR). O leite cru foi mantido a 4°C durante os períodos de avaliação (4h, 72h e 168h), até sua utilização para fabricação do iogurte.

3.2.2 PROCESSAMENTO E ANÁLISES

3.2.2.1 LEITE

A partir da amostra inicial (5 litros), o leite cru foi dividido em três alíquotas: a primeira representando o leite do dia da ordenha, com até 4 horas de produção (D0); e as outras duas alíquotas ficaram armazenadas por 72 horas (D3) e 168 horas (D7) à 4°C, respectivamente. A temperatura de armazenamento foi baseada na legislação, reproduzindo as condições reais de produção (MAPA IN62/2011).

As qualidades físico-químicas e microbiológicas do leite cru foram analisadas em D0, D3 e D7, verificando-se as alterações promovidas pela estocagem. Foram avaliados: pH, acidez titulável, porcentagem de proteína total, gordura, lactose, sólidos totais e cinzas. As análises microbiológicas foram contagem de microorganismos aeróbios mesófilos, de psicotróficos, coliformes totais e *Escherichia coli*.

No leite D0, também foram determinadas a contagem de células somáticas e presença de resíduos de antibióticos.

As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata. O pH foi determinado por potenciômetro (pHmetro) de imersão, previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras para fazer a leitura. A acidez foi avaliada por titulação com solução Dornic de hidróxido de sódio (NaOH), com adição do marcador fenolftaleína. O percentual de proteínas foi avaliado pelo nitrogênio total, quantificado pelo método de micro-Kjeldahl, usando 6,38 como fator de correção. O percentual de gordura foi determinado pelo método de Gerber, com uso de butirômetro para leite. Sólidos totais foram determinados por secagem em estufa a 105°C/16h. Cinzas por determinação de resíduo por incineração e mufla a 550°C/12h (BRASIL, 2006).

As análises microbiológicas de aeróbios mesófilos foram realizadas em placas 3M™ Petrifilm™ para contagem de aeróbios (AC) e incubadas em estufa a 37°C/48h. Os micro-organismos psicotróficos foram determinados por plaqueamento em superfície em meio PCA (Plate Count Agar), mantidos a 21°C/25h, em duplicata. As análises de coliformes totais e *E. coli* foram feitas com incubação da amostra em placas 3M™ Petrifilm™ EC, a 37°C/24h e 37°C/48h, respectivamente (APHA, 2004).

Para mensuração de CCS, as amostras de leite D0 foram encaminhadas ao laboratório da Associação dos Produtores e Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), em Curitiba (PR), e avaliadas pela metodologia de infravermelho (INTERNACIONAL IDF STANDARD 141C, 2000).

O teste para triagem de antibióticos foi utilizando o *kit* SNAP, nas versões: SNAP Beta ST e o SNAP Duo Beta-Tetra, da empresa IDEXX Laboratories, no próprio laboratório do laticínio de origem da matéria-prima.

3.2.2.2 CULTURA

Foi utilizada cultura liofilizada para iogurtes de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, da marca Christian Hansen S/A, código FD-DVS YF-L812 Yo-Flex®. A cultura foi adicionada diretamente ao leite já pasteurizado e resfriado a 43°C, sem nenhuma diluição prévia. A quantidade utilizada foi de 0,1 gramas,

conforme indicação do fabricante (Anexo A).

3.2.2.3 IOGURTE INTEGRAL NATURAL

Três tratamentos foram utilizados para a fabricação de iogurte: (1) Produção de iogurte a partir de leite cru com até 4h de armazenamento à 4°C; (2) produção de iogurte a partir de leite cru com 72h de armazenamento à 4°C; (3) produção de iogurte a partir de leite cru com 168h de armazenamento à 4°C.

O leite cru de cada tratamento, após período de armazenamento, foi pasteurizado (65°C/30min) e resfriado até 43°C para adição da cultura láctica previamente pesada. De cada tratamento, foram feitas análises da cinética de fermentação e do iogurte propriamente dito.

Para análise da cinética de fermentação, porções de 10 a 20mL do inóculo foram acondicionadas em tubos de ensaio estéreis, sendo 20 tubos de ensaio para verificação da alteração do pH e acidez, a cada meia hora de fermentação; e 4 tubos para análise microbiológica, a cada hora de fermentação. Os tubos de ensaio foram vedados com papel filme e acondicionados na estufa para fermentação, juntamente aos recipientes dos iogurtes.

Para posterior análise do iogurte, o leite inoculado também foi envasado em três embalagens estéreis de vidro fechadas com tampa de rosca, cada embalagem com 300mL do inóculo, para fermentação do iogurte e depois armazenamento.

O processo fermentativo foi conduzido em estufa a 43°C, até atingir o pH 4,5. Durante essa etapa, a alíquota utilizada para avaliar a cinética da fermentação foi analisada através da mensuração dos seguintes parâmetros:

a) Velocidade de produção de ácido láctico (g/L.h): A cada trinta minutos, foram retirados dois tubos de ensaio da estufa (análise em duplicata) e verificados o pH e a acidez titulável do leite inoculado para elaboração da curva de fermentação. A fórmula empregada foi (SINCLAIR e CANTERO, 1990):

$$dP/dt = [(ln^{P3} - ln^{P1}) / (t3 - t1)] \times P2$$

Onde:

ln = logarítmo neperiano;

P = concentração de ácido láctico (g/L);

P1 = concentração de ácido láctico no tempo t1;
 P2 = concentração de ácido láctico no tempo t2;
 P3 = concentração de ácido láctico no tempo t3;
 t = tempo de fermentação

b) Velocidade de crescimento de *S. thermophilus* (UFC/L/h) e velocidade de crescimento de *L. bulgaricus* (UFC/L/h): a cada hora de fermentação do iogurte, foi retirado um tubo de ensaio da estufa e feita contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Para estas análises, foi feito plaqueamento em duplicata de *L. bulgaricus* em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) acidificado com ácido acético (pH 5,4) a 37°C/72h, em incubados em anaerobiose; e de *S. thermophilus*, em ágar M17 lactosado, incubados em aerobiose a 37°C/48h (APHA, 2004). A fórmula empregada foi (SINCLAIR e CANTERO, 1990):

$$dP/dt = [(ln^{X3} - ln^{X1}) / (t3 - t1)] \times X2$$

Onde:

ln = logaritmo neperiano;
 X1= concentração de micro-organismos no tempo t1;
 X2= concentração de micro-organismos no tempo t2;
 X3 = concentração de micro-organismos no tempo t3;
 t = tempo de fermentação.

c) Tempo até fermentação atingir pH 5,0: em minutos, avaliado a cada trinta minutos (SINCLAIR e CANTERO, 1990);

d) Tempo até fermentação atingir pH 4,5: em minutos, avaliado a cada trinta minutos (SINCLAIR e CANTERO, 1990).

Ao atingir o pH 4,5 o três recipientes de iogurte foram transferidos imediatamente para refrigerador para reduzir a temperatura de 4°C e interromper a fermentação.

3.2.3 ENVASE E ARMAZENAMENTO

Os três recipientes de iogurte, de cada tratamento, foram armazenados a 4°C durante 24h, 7dias e 15 dias, respectivamente.

Para avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do iogurte durante a vida de prateleira, os parâmetros mensurados em cada momento foram: pH, acidez Dornic, proteína total, gordura, lactose, sólidos totais, cinzas, contagem

de *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli*.

Para as análises físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes produzidos utilizadas as metodologias descritas no item 3.2.2.1 e 3.2.2.3. Para determinação de bolores e leveduras presentes no iogurte armazenado, foi feita contagem em placas 3M™ Petrifilm™ YM, em estufa por 24°C/72h (APHA, 2004).

3.2.4 ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedastidade e não apresentaram distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Dessa forma, as variáveis numéricas (contagem de aeróbios mesófilos, psicotróficos e coliformes totais) foram categorizadas em escala ordinal através da transformação logarítmica.

As possíveis diferenças nas variáveis microbiológicas e físico-químicas durante o armazenamento do leite cru e do iogurte foram mensuradas através do teste de Wilcoxon pareado, e fatores com $p < 0,05$ foram considerados distintos.

Para a análise fermentativa, foram ponderados os efeitos dos três tratamentos de produção de iogurte sobre as seguintes variáveis: velocidade de produção de ácido láctico (g/L.h); a velocidade de crescimento de *Streptococcus thermophilus* (UFC/L/h); a velocidade de crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (UFC/L/h), tempo para pH 5.0 (min); tempo para pH 4.5 (min); tempo para velocidade máxima de produção de ácido láctico (min); tempo para velocidade máxima de crescimento de *Streptococcus thermophilus* (min) e tempo para velocidade máxima de crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (min). As variáveis de cada tratamento também foram comparadas aos pares pelo teste de Wilcoxon e todo o experimento foi repetido em cinco ensaios.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 LEITE CRU

Mesófilos

Após 168 horas (D7) de estocagem do leite cru a 4°C, houve diminuição ($p < 0,05$) na contagem média de aeróbios mesófilos de 6.320 UFC/mL em

comparação à média inicial (Tabela 2). Os valores verificados estão representados na Figura 5, onde as contagens de mesófilos aeróbios apresentaram valores máximo de 4,65 log UFC/mL e mínimo de 3,89 log UFC/mL.

Tabela 2 - Mediana (*Mdn*), média (\bar{X}), desvio padrão (σ) e valores mínimos e máximos (I) de pH, acidez Dornic, gordura, proteína, contagem de aeróbios mesófilos (*Am*), de psicotróficos (*Psi*), de coliformes totais (*Ct*) e de *E. coli* (*Ec*) em leite cru, segundo o tempo de armazenamento a 4°C.

	04h (D0)		72h (D3)		168h (D7)	
	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$
pH	6,70	6,69±0,03 6,64I-6,72	6,79	6,75±0,10 6,62I-6,84	6,68	6,71±0,08 6,63I-6,83
Acidez (°D)	16,30	16,68±2,01 14,0I-20,0	16,30	16,36±0,74 15,0I-18,0	16,00	16,36±0,96 15,0I-18,0
Gordura (%)	3,40	3,52±0,39 3,20I-4,10	3,45	3,40±0,29 3,00I-3,70	3,40	3,38±0,15 3,20I-3,60
Proteína (%)	3,15	3,13±0,20 2,90I-3,32	3,49	3,45±0,38 3,03I-3,79	3,38	3,26±0,30 2,86I-3,54
<i>Am</i> (log UFC/mL)	4,38 ^a	4,32±0,22 4,10I-4,63	4,34 ^a	4,34±0,24 4,11I-4,65	4,05 ^b	4,17±0,26 3,89I-4,57
<i>Psi</i> (log UFC/mL)	4,67	4,57±0,25 4,18I-4,86	4,74	4,65±0,34 4,19I-4,92	4,69	4,73±0,19 4,51I-5,01
<i>Ct</i> (log UFC/mL)	1,78	2,09±0,94 1,30I-3,50	1,90	2,15±0,79 1,70I-3,56	1,15	1,74±1,05 1,00I-3,43
<i>Ec</i> (UFC/mL)	3,00	4,20±3,35 2,00I-10,00	1,00	2,20±2,17 <1,0I-5,00	1,00	3,00±4,06 <1,0I-10,0

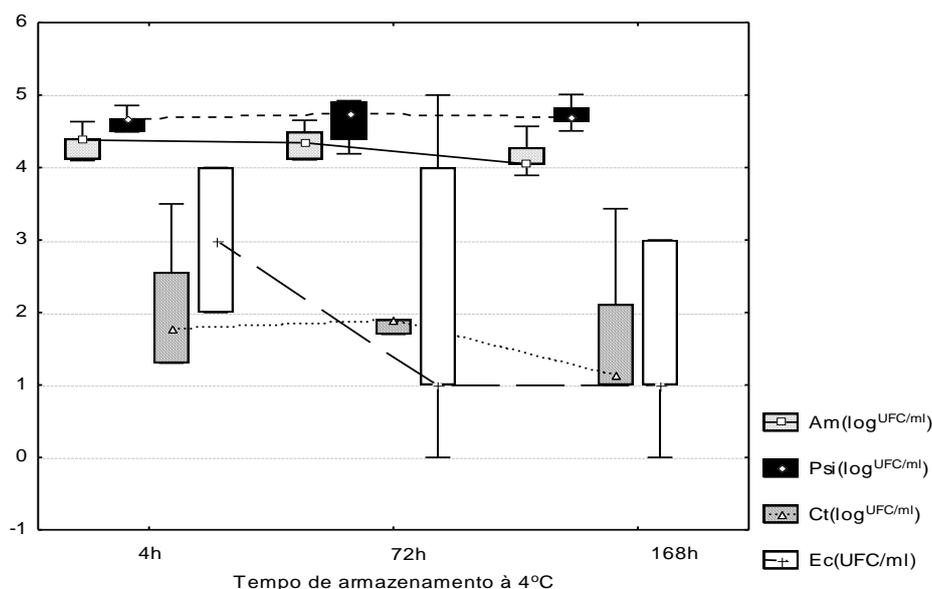
Medianas seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença segundo o teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). Medianas sem letras não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Perin et al. (2012) não observaram aumento na contagem de mesófilos no leite cru armazenado por 48h, quando em temperatura de 4°C; à temperatura de 7°C, verificou crescimento após 48h de estocagem, principalmente nas amostras com contagem inicial maior que 5 log UFC/mL. Vianna e Gigante (2010), verificaram que o leite cru com baixa contagem de mesófilos ($3,7 \times 10^3$ UFC/mL), armazenado a 4°C, levou 8 dias para atingir a contagem limite da legislação vigente naquele período ($7,5 \times 10^5$ UFC/mL). Entretanto, Souza et al. (2009) analisaram tanques comunitários e encontraram contagens iniciais de mesófilos de $2,3 \times 10^5$ UFC/mL, que analisadas 24h após, reduziram para $2,1 \times 10^5$ UFC/mL.

Psicrotróficos

A contagem média de micro-organismos psicrotróficos não teve variação ao longo da estocagem ($p > 0,05$), variando de 4,57 a 4,73 log UFC/mL durante os sete dias de armazenamento, à 4°C (Figura 5). Perin et al. (2012) encontraram diferença significativa na contagem de psicrotróficos no leite cru armazenado em temperaturas a 25°C por 2h, como a 4°C por 24h; estas alterações foram mais evidenciadas em amostras de leite cru com contagem inicial de mesófilos aeróbios < 5 log UFC/mL. Da mesma forma, Santos et al. (2009) observou desenvolvimento exponencial de psicrotróficos em leite cru armazenados em temperatura em torno de 5°C, por até 216h, passando de 2,98 log UFC/mL para 6,47 log UFC/mL.

Figura 5 - Mediana e quartis ($Q_{1/4}$ - $Q_{3/4}$) da contagem de aeróbios mesófilos (Am), de psicrotróficos (Psi), de coliformes totais (Ct) e de *E. coli* (Ec) em leite cru, segundo o tempo de armazenamento a 4°C.



Porém, é importante ressaltar que a proporção entre mesófilos e psicrotróficos diminuiu ($p < 0,05$) durante esse período de estocagem do leite cru. No dia da coleta (D0), a média desta relação foi de 0,95^a; em 72h (D3) a proporção se manteve sem alteração ($p > 0,05$), passando para 0,93^a. Porém, em 168h (D7) de estocagem, a proporção foi reduzida para 0,88^b ($p < 0,05$), representando aumento da proporção de psicrotróficos presentes no leite cru.

A maioria dos psicrotróficos apresenta temperatura ótima de multiplicação entre 20 e 30°C, isto é, são microrganismos mesófilos que se adaptam a

refrigeração. Eles alteram seu metabolismo ácido-lático e produzem enzimas extracelulares hidrolíticas de proteínas e lipídios. Em geral, apresentam multiplicação lenta nestas condições de resfriamento e a população pode ser multiplicada por 10, quando a 4°C (FURTADO, 2005).

Cempírková (2002) encontrou correlação entre mesófilos/psicrotróficos na média de 0,69, variando de 0,32 a 0,81, dependendo do método de ordenha e condições higiênicas aplicadas. Este autor ainda verificou que alterações nesta relação resultam em aumentos nas proporções de bactérias proteolíticas e lipolíticas no leite cru, responsáveis pelos atuais problemas no processamento de leite. Na comunidade europeia, as atuais normas para leite de qualidade superior exigem que contagem bacteriana total (CBT) e psicrotróficos não devam exceder 3×10^4 UFC/mL e 5×10^3 UFC/mL, respectivamente, o que corresponde a uma relação de 6/1.

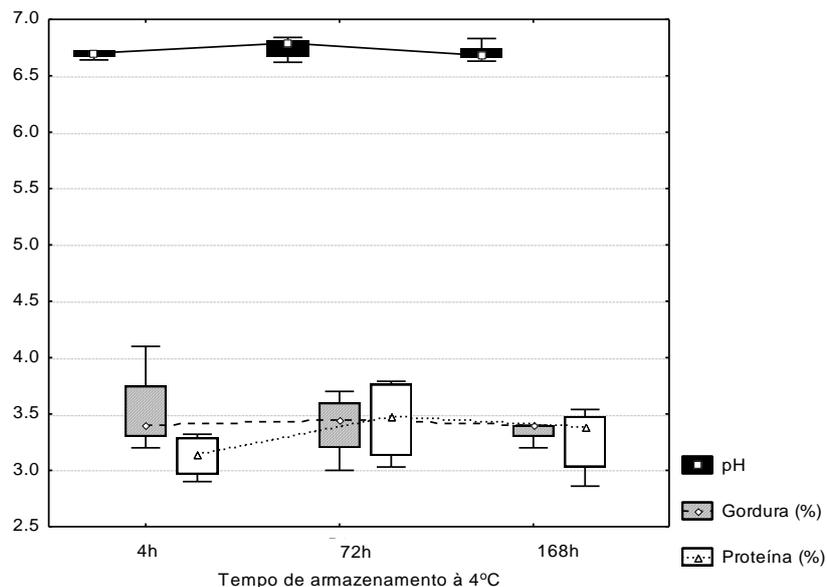
Coliformes totais e E. coli

Para coliformes totais e *E. coli*, a qualidade microbiológica no leite cru permaneceu sem variação ($p > 0,05$) durante o armazenamento (Tabela 2). Na Figura 5, podemos verificar as variações microbiológicas ocorridas no leite cru refrigerado a 4°C, durante o período de armazenamento de até 168h (D7). Nas contagens de coliformes totais, o máximo contabilizado foi de 3,56 log UFC/mL, e mínimo de 1 log UFC/mL. As contagens de *E. coli* totalizaram valores baixos, sendo o máximo verificado de 10 UFC/mL e o mínimo < 1 UFC/mL. Não está previsto em nossa legislação o controle de coliformes e *E. coli* em leite cru, por não ser permitido consumo deste produto *in natura*. Todavia, os resultados deste trabalho, em leite cru, são compatíveis aos esperados para o leite pasteurizado, demonstrando boa qualidade da matéria-prima testada. Holm et al. (2004) encontraram coliformes em 20% das amostras de leite cru analisadas, com contagem média de $1,7 \times 10^4$ UFC/mL.

Acidez titulável, pH e gordura

As características físico-químicas do leite cru refrigerado a 4°C, não apresentaram variações ($p > 0,05$) durante o tempo de estocagem, como demonstrado na Figura 6. O pH, a acidez titulável, a porcentagem de gordura e proteína permaneceram constantes durante os sete dias de estocagem a 7°C.

Figura 6 - Mediana e quartis ($Q_{1/4}$ - $Q_{3/4}$) de pH, gordura e proteína em leite cru segundo o tempo de armazenamento a 4°C.



3.3.2 FERMENTAÇÃO

Velocidade de produção de ácido láctico

A velocidade média de produção de ácido láctico durante a fermentação foi influenciada pelo aumento do tempo de estocagem do leite cru utilizado na produção do iogurte (Tabela 3). Inicialmente, foi maior ($p < 0,05$) nos iogurtes fabricados com leite cru estocado por 72h (D3). Porém, quando o iogurte foi fabricado com leite cru armazenado durante 168h (D7), a velocidade média de formação de ácido láctico diminuiu ($p < 0,05$).

Acredita-se que estas alterações sejam influenciadas pelas contagens médias de aeróbios mesófilos presentes na matéria-prima utilizada para fabricação do iogurte, uma vez que estes micro-organismos têm como característica metabolizar a lactose em ácido láctico, agregando esta função as culturas lácteas adicionadas. Sob refrigeração, esses micro-organismos alteram seu metabolismo de mesófilos para psicotróficos, os quais não produzem ácido láctico e favorecem a redução da acidificação do meio, como demonstrado neste estudo.

Walstra et al. (2006) acreditam que o crescimento e as atividades enzimáticas de bactérias psicotróficas são estimulados por bactérias lácticas. Ainda, afirmam que as bactérias lácticas aproveitam os peptídeos, aminoácidos e amônia resultantes da

atividade proteolítica psicrotrófica para incrementar seu desenvolvimento e produção de ácido láctico. Por outro lado, os ácidos graxos livres liberados pela ação das enzimas psicrotróficas, podem inibir o desenvolvimento de bactérias lácticas.

Tabela 3 - Mediana (*Mdn*), média (\bar{X}), desvio padrão (σ) e valores mínimos e máximos (*I*) da velocidade média de produção de ácido láctico (V_m .ác); de crescimento de *S. thermophilus* (V_m .*St*) e de *L. bulgaricus* (V_m .*Lb*), do tempo até pH 5.0 ($t_{pH\ 5,0}$) e pH 4.5 ($t_{pH\ 4,5}$) tempo para velocidade máxima de produção de ácido láctico ($t_{vm\acute{a}x\ \acute{a}c}$); tempo para velocidade máxima de crescimento de *S. thermophilus* ($t_{vm\acute{a}x\ St}$) e *L. bulgaricus* ($t_{vm\acute{a}x\ Lb}$) em de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.

iogurte fabricado com leite cru armazenado a 4°C durante:						
	04h (D0)		72h (D3)		168h (D7)	
	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$
V_m .ác (g/L.h)	1,89 ^b	1,70±0,69 0,13f-2,83	2,02 ^a	1,84±0,73 0,14f-3,26	1,73 ^c	1,62±0,68 0,13f-3,60
V_m . <i>St</i> (log UFC/L/h)	8,92 ^{ab}	8,88±0,27 8,28f-9,10	9,00 ^a	9,07±0,21 8,86f-9,44	8,84 ^b	8,83±0,141 8,54f-8,97
V_m . <i>Lb</i> (log UFC/L/h)	1,95	1,93±0,37 1,37f-2,41	2,18	2,22±0,39 1,78f-2,79	2,25	2,18±0,53 1,28f-2,79
$t_{pH\ 5,0}$ (min)	186	180±23,66 150f-210	186	180±23,66 150f-210	174	180±12,65 150f-180
$t_{pH\ 4,5}$ (min)	258	240±25,30 240f-300	270	252±25,30 210f-270	240	240±28,28 210f-270
$t_{vm\acute{a}x\ \acute{a}c}$ (min)	150	144±12,65 120f-150	120	138±25,30 120f-180	120	126±12,65 120f-150
$t_{vm\acute{a}x\ St}$ (min)	180	165±27,78 120f-180	150	150±32,01 120f-180	120	135±27,78 120f-180
$t_{vm\acute{a}x\ Lb}$ (min)	180	160±30,98 120f-180	180	180±0,00 180f-180	180	180±0,00 180f-180

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença segundo o teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). Medianas sem letras não diferiram entre si ($P > 0,05$). V_m = velocidade média

Velocidade de produção de *S. thermophilus*

O tempo de estocagem do leite cru interferiu na velocidade média de produção de *S. thermophilus* (Tabela 3), reduzindo significativamente o desenvolvimento das colônias de *S. thermophilus* por hora de fermentação de 9,07 log UFC/L/h quando utilizado o leite estocado 72h (D3), para 8,83 log UFC/L/h quando o leite estocado 168h (D7).

Este micro-organismo tem seu desenvolvimento otimizado pela presença dos pequenos peptídeos hidrolisados por *L. bulgaricus*. Por isso, acredita-se que esta redução tenha acontecido devido à diminuição do percentual de proteínas presentes desde a matéria-prima até o produto final e interferido no desenvolvimento do *S.*

thermophilus (Figura 4).

Bactérias ácido-láticas não podem assimilar nitrogênio inorgânico, mas elas devem ser capazes de degradar proteínas e peptídeos para satisfazer as suas exigências de aminoácidos. Cepas proteolíticas aumentam o desenvolvimento de estreptococos ao formarem pequenos peptídeos e aminoácidos disponíveis para este micro-organismo. *S. thermophilus* são fracamente proteolíticos e o principal aminoácido para seu desenvolvimento é a valina, presentes em pequenas quantidades no leite (WALSTRA et al., 2006).

Tempo até velocidade máxima de produção de ácido láctico

Tempo até pH 5

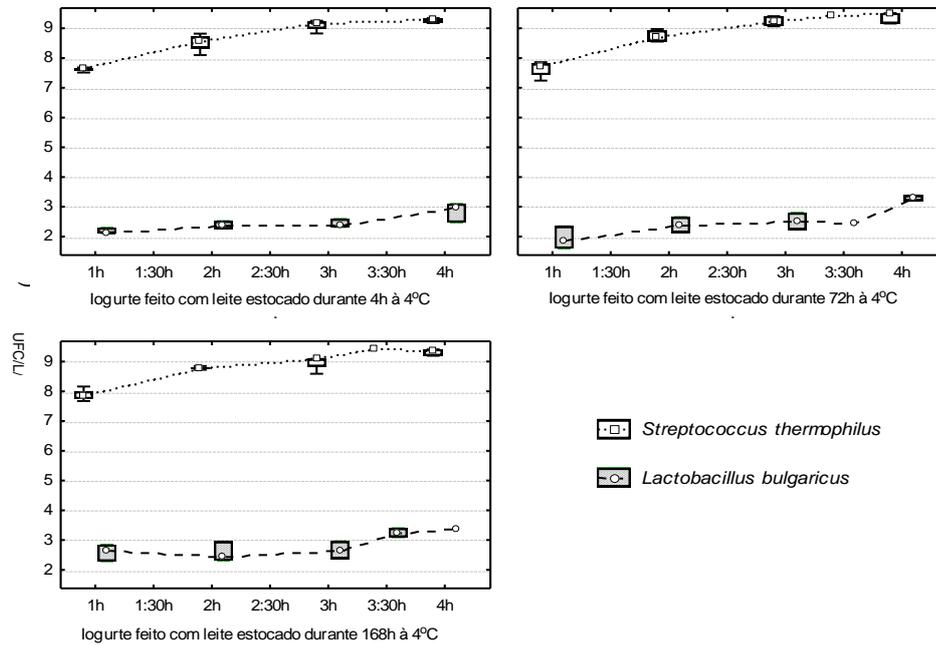
Tempo até pH 4,5

Não foi verificada diferença nos tempos de fermentação dos iogurtes produzidos com matéria-prima com tempos de estocagem diferentes. Neste estudo, o tempo de fermentação para atingir o pH 5 ($t_{pH5,0}$) foi em média 3h; para atingir o pH final 4,5 ($t_{pH4,5}$) foi de 4,2h, em média; e o tempo onde houve máxima produção de ácido láctico foi de 2,2h. Oliveira et al. (2009) testaram a fermentação do leite por estas culturas, com as mesmas condições de incubação, e observaram que levou em média 3,68h para atingir pH 5; 5,47h para o pH final 4,5; e 3h para atingir velocidade máxima de acidificação. No estudo com iogurte de leite de cabra de Bezerra et al. (2012), foi observado que o tempo de fermentação para atingir pH final de 4,6 foi 4,45h; e o tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação chegou a 3,5h.

Contagem de S. thermophilus e L. bulgaricus

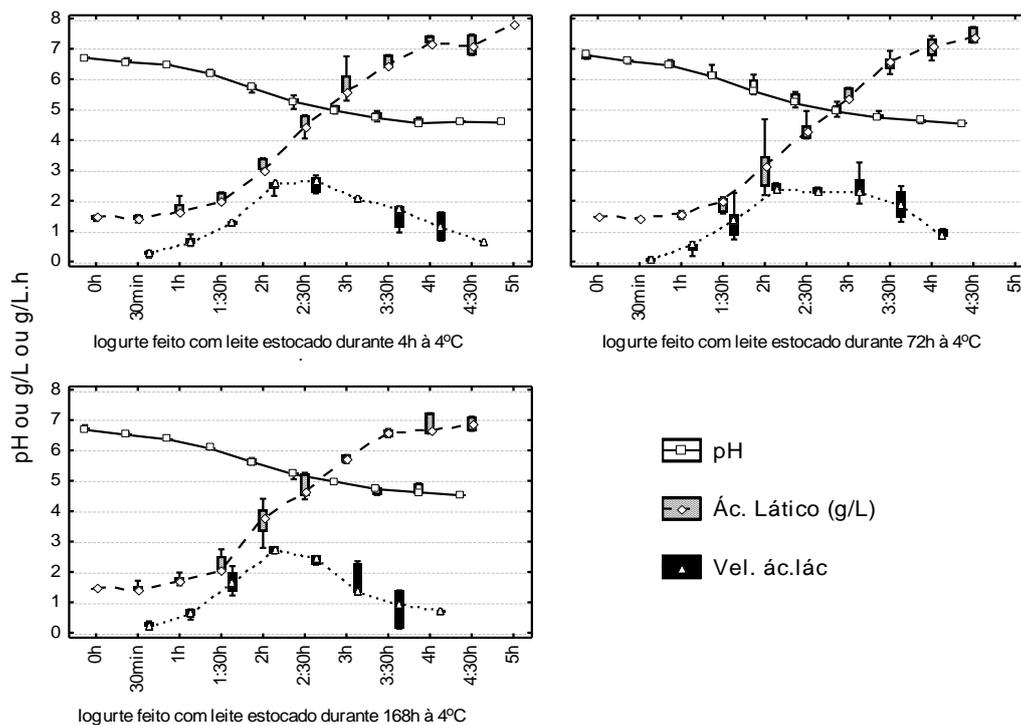
Na Figura 7, é possível observar a diferença na contagem de micro-organismos presentes nas culturas fermentadoras, durante a fermentação do iogurte e no produto final. A população de *S. thermophilus* foi prevalente em todo processo, demonstrando contagens entre 7 a 8 log UFC/mL; em contrapartida, *L. bulgaricus* tiveram contagens entre 2 a 3 log UFC/mL. Acredita-se que esta menor proporção tenha como propósito diminuir a pós-acidificação do iogurte durante estocagem, causada pelo *L. bulgaricus*.

Figura 7 - Variações das populações de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a fermentação de iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.



Na Figura 8, podemos observar a curva de fermentação durante a produção dos iogurtes produzidos com leite cru estocados em períodos distintos, e a relação das médias de pH e acidez ocorrida.

Figura 8 - Variação do pH, na concentração de ácido láctico e na velocidade de formação de ácido láctico em iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h à 4°C.



3.3.3 IOGURTE

pH e acidez titulável

O tempo de estocagem afetou negativamente o pH do iogurte (Tabela 4), reduzindo de 4,5 (pH de fabricação) para 4,1 em 15 dias de estocagem. Entretanto, esta diferença só foi observada no iogurte produzido pelo leite cru estocado por 168h (Figura 9), demonstrando que este tipo de matéria-prima pode reduzir a viabilidade de consumo dos seus derivados, mesmo esta apresentando baixas contagens bacterianas, como neste experimento. Além disso, acredita-se que a degradação das proteínas do iogurte, demonstrada neste trabalho, fabricado com leite cru estocado por longo período, também podem cooperar com acidificação do produto.

Tabela 4 - Mediana (*Mdn*), média (\bar{X}) e desvio padrão (σ) de pH, acidez Dornic, gordura, proteína, contagem de *S. thermophilus* (*St*), de *L. bulgaricus* (*Lb*), de coliformes totais (*Ct*), de *E. coli* (*Ec*) e de bolores e leveduras (*Bl*) durante a vida de prateleira de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.

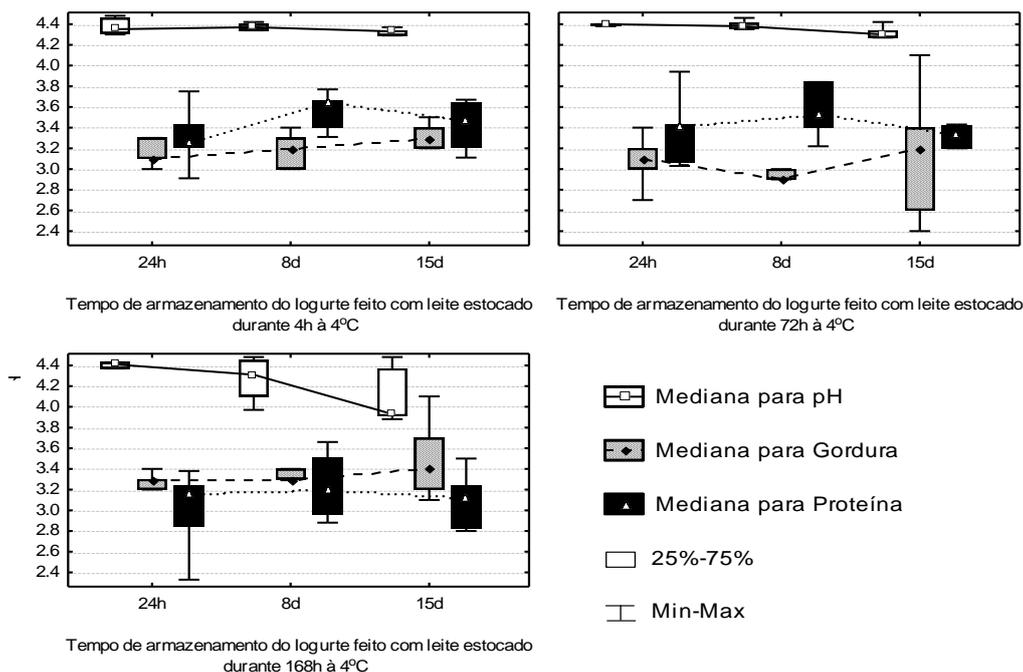
Leite a 4° durante:	iogurte a 4°C durante:						
	1 dia		8 dias		15 dias		
	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	<i>Mdn</i>	$\bar{X} \pm \sigma$	
4h (D0)	pH	4,35	4,38±0,08	4,37	4,34±0,10	4,33	4,25±0,18
	Acidez (°D)	74,5	75,5±3,26	76,3	75,5±1,53	77,0	76,6±2,72
	Gordura (%)	3,10	3,16±0,13	3,20	3,08±0,36	3,30	3,10±0,57
	Proteína (%)	3,25	3,31±0,31	3,64	3,56±0,19	3,47 ^A	3,42±0,25
	<i>St</i> (log UFC/mL)	9,15	9,16±0,08	9,10	9,12±0,07	9,09	9,02±0,20
	<i>Lb</i> (log UFC/mL)	3,35	3,27±0,46	3,53	3,58±0,13	3,50	3,39±0,29
	<i>Ct/Ec/Bl</i> (UFC/mL)	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00
72h (D3)	pH	4,40	4,39±0,06	4,38	4,36±0,10	4,30	4,30±0,10
	Acidez (°D)	75,5	76,1±2,75	75,5	76,4±2,22	76,8	77,3±1,53
	Gordura (%)	3,10	3,08±0,26	2,90	2,86±0,40	3,20	3,14±0,68
	Proteína (%)	3,41 ^{ab}	3,37±0,37	3,53 ^a	3,72±0,55	3,34 ^{bA}	3,14±0,47
	<i>St</i> (log UFC/mL)	9,36	9,38±0,19	9,18	9,17±0,16	9,11	8,88±0,93
	<i>Lb</i> (log UFC/mL)	3,46	3,45±0,18	3,64	3,52±0,32	3,41	3,40±0,40
	<i>Ct/Ec/Bl</i> (UFC/mL)	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00
168h (D7)	pH	4,41 ^a	4,38±0,16	4,31 ^a	4,26±0,22	3,93 ^b	4,11±0,29
	Acidez (°D)	77,0	77,0±4,51	74,0	77,5±5,85	77,3	77,3±3,62
	Gordura (%)	3,30	3,14±0,36	3,30	3,28±0,16	3,40	3,50±0,41
	Proteína (%)	3,16	2,99±0,42	3,20	3,24±0,34	3,11 ^B	3,09±0,29
	<i>St</i> (log UFC/mL)	9,17	8,93±0,69	9,24	8,82±0,87	9,14	9,09±0,09
	<i>Lb</i> (log UFC/mL)	3,65	3,61±0,61	3,37	3,40±0,15	3,50	3,53±0,25
	<i>Ct/Ec/Bl</i> (UFC/mL)	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00	<1	<1±0,00

Medianas seguidas de letras minúsculas distintas nas linhas e maiúsculas na coluna indicam diferença segundo o teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). Medianas sem letras não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Salvador e Fiszman (2004) observaram alteração do pH no iogurte estocado por 91 dias, a 10°C. Sofu e Eckinci (2007) confirmaram que iogurte integral reduziu o pH de 4,2 para 3,76 em 14 dias de armazenamento refrigerado, enquanto o iogurte semi-desnatado não sofreu alteração. Cunha Neto et al. (2005) verificaram redução do pH no iogurte a base de leite de búfala armazenado refrigerado por 30 dias, reduzindo para pH 4,1 quando integral e 4,07 na versão gordura padronizada.

Salji e Ismael (1983) testaram iogurtes com pH inicial de 4,5, 4,2 e 3,9, durante 21 dias de estocagem. Aqueles com pH inicial baixo, permaneceram estáveis (pH 3,82-3,77). Porém, as mudanças de acidez foram mais evidenciadas a 7°C do que a 4°C; e mais intensas na primeira semana de estocagem. Para Duardo et al. (2010), a redução do pH do iogurte armazenado refrigerado de 4,66 para 4,27 após 42 dias, se deve a pós-acidificação promovida pelo *L. bulgaricus*.

Figura 9 - Variação de pH, gordura e proteína durante a vida de prateleira do iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.



A acidez titulável verificada nos iogurtes produzidos e armazenados não demonstrou variação e ficou dentro das normas de identidade e qualidade de leites fermentados. A média de ácido láctico encontrada foi de 0,69 g/100mL, sendo que os padrões limites estabelecem de 0,6 a 2 g/100mL (BRASIL, 2007). A acidez é uma característica esperada em iogurtes, no entanto, a acidificação excessiva (pós-acidificação) do produto apresenta menor aceitação do consumidor e tempo de

prateleira, visto que o sabor muito ácido ($\text{pH} < 4$) é desagradável ao paladar, além de conduzir à separação de soro e deterioração da sua consistência e viscosidade (WALSTRA et al., 2006).

Silva e Ueno (2013) comprovaram que a acidez titulável de 97,9% das amostras analisadas estava dentro dos padrões, mas que havia uma pequena elevação com o decorrer do tempo de estocagem, atingindo patamares de até 1,6g de ácido láctico/100g de iogurte. No estudo de Silva et al. (2012), o valor mínimo verificado foi de 0,75% ácido láctico no iogurte industrial, já o produto caseiro registrou o valor máximo de acidez entre as amostras analisadas (1,08% ácido láctico).

Proteína

O percentual de proteína nos iogurtes (Tabela 4), quando armazenados por 15 dias, apresentou redução ($p < 0,05$) quando a matéria-prima utilizada ficou estocada por mais tempo, sendo 72h ou 168h. Dessa forma, o tempo de estocagem do leite cru pode afetar a vida de prateleira do iogurte, principalmente quando o tempo de armazenamento do iogurte for prolongado, mesmo refrigerado.

Na Figura 9, verificamos que as medianas do percentual de proteínas dos iogurtes fabricados com leite cru estocado por 168h, são menores ($p < 0,05$) do que nos outros tempos de armazenamento do leite cru. Aylward et al. (1980) confirmaram que o tempo de estocagem do leite cru reduz o rendimento de derivados lácteos em torno de 2 a 2,5% ao dia, a partir do 4º dia de estocagem, a 5°C.

Yamazi et al. (2013) concluíram que a estocagem de leite de cabra cru por mais de 48h, à temperatura de refrigeração nas propriedades de origem, apresentaram grande perda proteica pela ação enzimática de micro-organismos proteolíticos, principalmente os psicotróficos, diminuindo o rendimento na produção de queijos.

No estudo de Vianna e Gigante (2010), amostras de leite cru tipo A, acondicionadas a 4°C, levaram 5 dias para atingir contagem de psicotróficos superior a 10^6 UFC/mL, considerada crítica para processamento de derivados. Perin et al. (2012) verificaram que bactérias psicotróficas proteolíticas tiveram

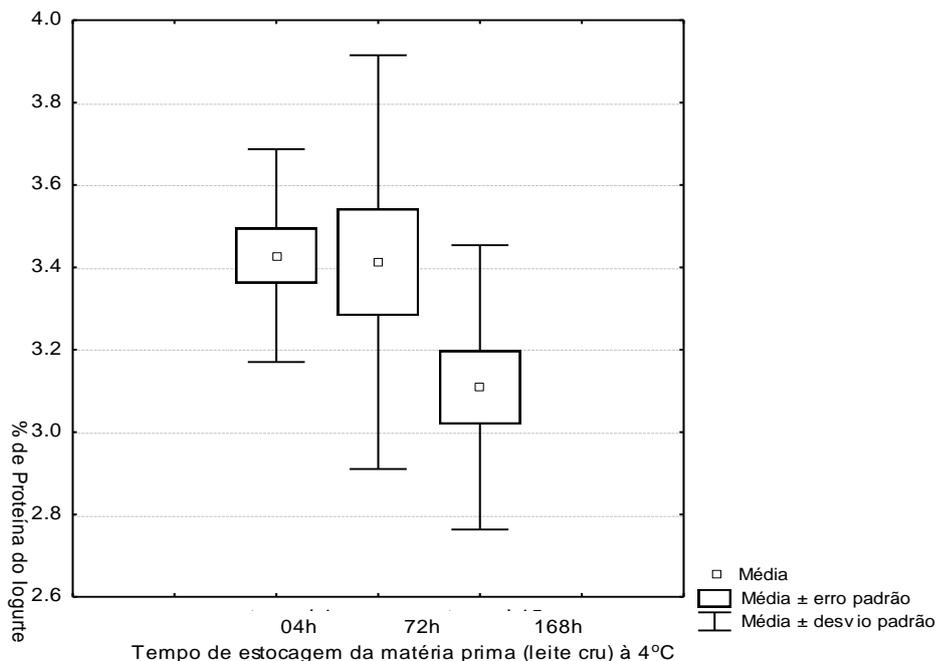
crescimento no leite cru a partir de 24hs de armazenamento sob temperatura de 4°C; e as lipolíticas após 48h.

A quantidade de proteínas nos iogurtes fabricados e estocados refrigerados foi a que demonstrou maior oscilação quando relacionada à matéria-prima utilizada (Figura 10). A média verificada quando utilizado leite cru refrigerado e armazenado por 4h, foi de 3,45%; quando leite cru foi mantido por 72h, a proteína foi 3,41%; e finalmente, quando leite cru foi estocado por 168h a média reduziu a 3,1%.

Entre os micro-organismos psicrotróficos identificados no estudo de Pinto et al. (2006), mais de 80% apresentou atividade proteolítica. Estes números foram verificados em tanques de leite individuais e comunitários, porém as maiores contagens foram observadas nos silos industriais.

Arcuri et al. (2008) acredita que bactérias Gram-negativas são os principais micro-organismos psicrotróficos responsáveis pela deterioração de leite refrigerado, causando rancidez, sabor amargo e redução no rendimento na fabricação de derivados. Nenhuma das bactérias Gram-positivas psicrotróficas identificadas apresentou atividade proteolítica a 4°C, e 50% apresentou atividade a 7°C.

Figura 10 - Variação na porcentagem de proteína em iogurtes fabricados com leite cru armazenado durante 4h, 72h e 168h a 4°C.



Para Nörnberg et al. (2010), bactérias psicrotróficas mantiveram atividade enzimática proteolítica a 7°C e nenhuma destas enzimas reduziu totalmente sua

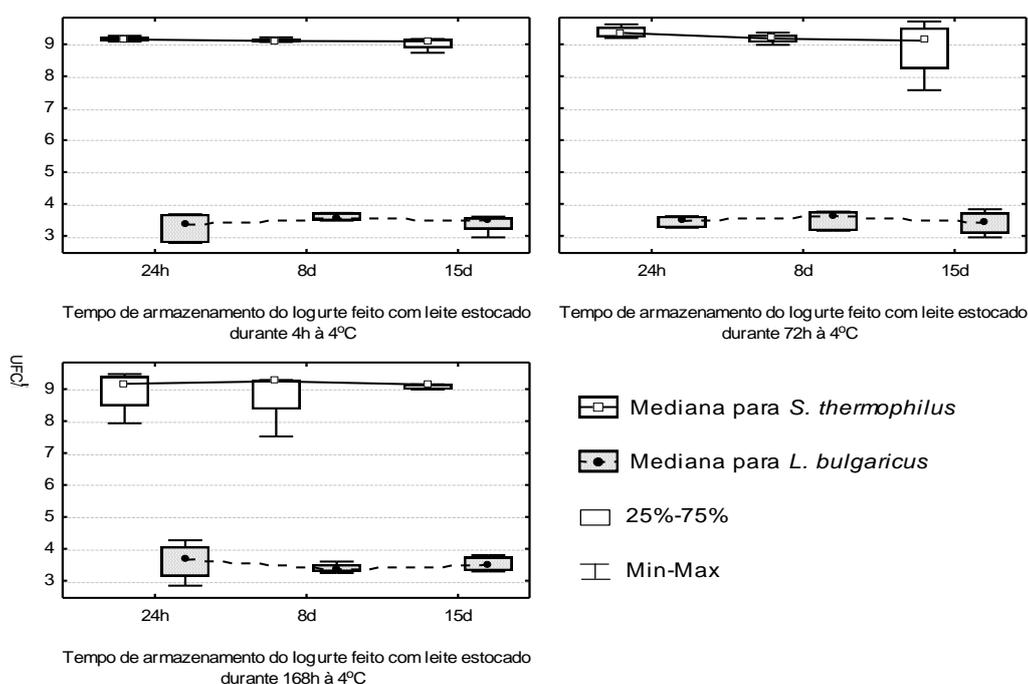
atividade quando expostas a temperaturas de tratamento térmico, como pasteurização e UHT.

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

As contagens médias de micro-organismos do iogurte durante a estocagem de 15 dias permaneceram constantes ($p > 0,05$), independentemente da matéria-prima utilizada (Tabela 4). Na Figura 11, podemos verificar que a contagem de *S. thermophilus* variou de 9,09 a 9,36 log UFC/mL e *L. bulgaricus* de 3,35 a 3,65 log UFC/mL, mantendo a viabilidade do iogurte em relação à contagem de bactérias lácticas totais mínimas de 10^7 UFC/mL (BRASIL, 2007).

Silva e Ueno (2013) verificaram que 41% dos iogurtes comerciais saborizados testados, totalizaram quantidades inferiores ao mínimo de bactérias lácticas totais para iogurtes, mesmo estando dentro do prazo de validade informado na embalagem. Igualmente, Salvador e Fiszman (2004) observaram redução durante a estocagem de iogurtes por 91 dias, a 10°C , onde as contagens diminuíram de 8,6 para 4,2 log UFC/mL para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, no iogurte integral.

Figura 11 - Variação de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* durante a vida de prateleira de iogurte fabricado com leite armazenado durante 4h, 72h e 168h à 4°C .



3.4 CONCLUSÃO

A qualidade microbiológica do leite cru foi influenciada pela estocagem sob refrigeração, com aumento da proporção de psicrotóxicos sobre mesófilos a partir de sete dias de armazenamento.

Mesmo com baixas contagens microbiológicas verificadas neste experimento, o tempo de estocagem do leite cru afetou negativamente a produção de iogurte, diminuindo a velocidade média de formação de ácido láctico, a velocidade média de crescimento de *S. thermophilus* e a na sua vida de prateleira.

Dessa forma, períodos de armazenamento da matéria prima superior à 72h, mesmo sob refrigeração a 4°C, são suficientes para prolongar o tempo de produção de iogurtes, diminuir seu pH e, conseqüente, sua aceitação e vida de prateleira.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. 17^a ed. Washington, 2004.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, nov. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16^a ed. Washington, 1995. v. 1-2.

AYLWARD, E. B.; O'LEARY, J.; LANGLOIS, B.E. Effect of Milk Storage on Cottage Cheese Yield. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1819-1825, 1980.

BEZERRA, M. F.; SOUZA, D. F.; CORREIA, R. T. P. Acidification kinetics, physicochemical properties and sensory attributes of yoghurts prepared from mixtures of goat and buffalo milks. **International Journal of Dairy Technology** v. 65, n. 3, ago. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, n. 205, p. 4, 24 out. 2007. Seção 1.

_____. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle do leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, p. 8, 14 dez. 2006. Seção I.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods) methods**. London: British Standards Institution, 1989. 12p.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinární Medicína**, v. 47, n.8, p. 227–233, 2002.

CUNHA NETO, O. C. et al. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 448-453, jul/set. 2005.

ÇAKMAKÇI, S. et al. Probiotic properties, sensory qualities, and storage stability of probiotic banana yogurts. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 36, n. 3, p. 231-237, 2012.

DUALDO, L. C. S. et al. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema Compact Dry® TC durante estocagem refrigerada de iogurtes. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, n. 374, v. 65, p. 33-40, maio/jun. 2010.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Diary chemistry and biochemistry**. Cork: Black Academy & Professional, 1998.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causa e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora, São Paulo, Brasil, p. 200, 2005.

GIESE, S. et al. Caracterização físico-química e sensorial de iogurtes comercializados na região oeste do Paraná. **Revista Varia Cientia Agrárias**, v. 01, n. 01, p. 121-129, 2010.

HOLM, C. et al. Predominant Microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1151–1157, 2004.

INTERNATIONAL IDF Standard 141C:2000: Whole milk - determination of milkfat, protein and lactose content. **Guidance on the operation of mid-infrared instruments**. Brussels, 2000.

MOREIRA, R. S. et al. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras-MG, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n.1, p. 206-215, 1999.

NÖRNBERG, M. F. B. L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, fev. 2010.

OLIVEIRA, R. P. S. et al. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 467–472, 2009.

PERIN, L. M. et al. Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 333-342, jan/mar. 2012.

SALJI, J. P.; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 258–259, 1983.

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

SANTOS, P.A. et al. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicrótrópicos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, out/dez. 2009.

SILVA, A. B. N.; UENO, M. Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas e variação da acidez titulável em iogurtes com sabor de frutas. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, n. 390, v. 68, p. 20-25, jan/fev. 2013.

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

SOFU, A.; EKINCI, F. Y. Estimation of Storage Time of Yogurt with Artificial Neural Network Modeling. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3118–3125, 2007.

SOUZA, V. et al. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.758-761, 2009.

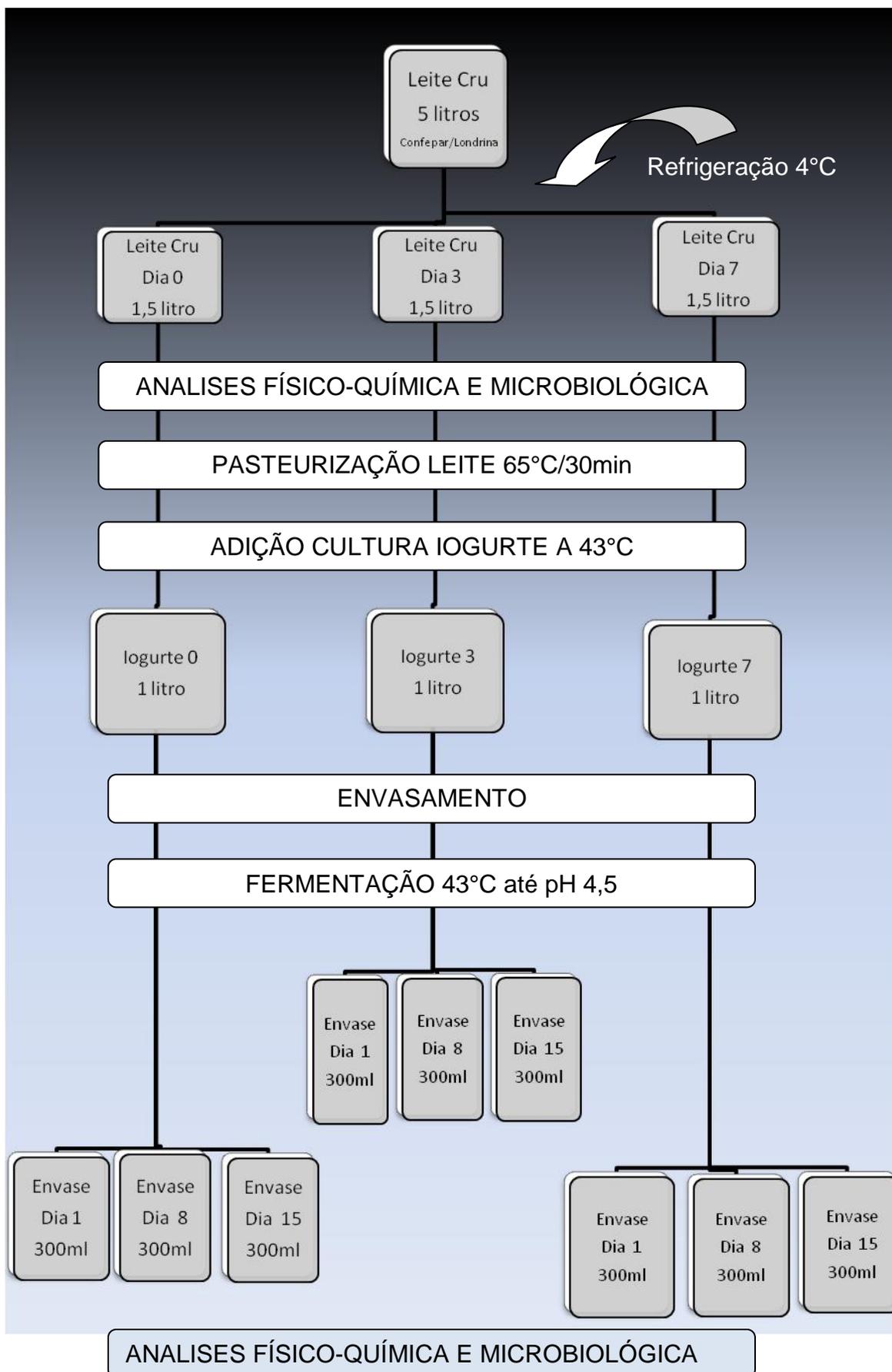
TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 2.ed. CRC Press. Boca Raton, 1999.

VIANNA, P. C. B.; GIGANTE, M. L. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado adicionado de dióxido de carbono. **Revista Instituto Laticínio Candido Tostes**, v. 375, n. 65, p. 51-59, jul/ago. 2010.

YAMAZI, A. K. et al. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 205– 210, 2013.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. CRC Press. Boca Raton. 2006.

4. FLUXOGRAMA



5. CONCLUSÕES GERAIS

A qualidade microbiológica do leite utilizado para a produção de derivados é de verdadeira importância para obter-se produtos com características elevadas. O leite cru, armazenado a 4°C por 168h, utilizado para a produção de iogurtes, demonstrou afetar negativamente na composição centesimal e microbiológica deste produto final, mesmo esta matéria-prima apresentando baixas contagens microbiológicas iniciais.

A contagem de mesófilos aeróbios diminuiu com o tempo de estocagem do leite cru, mas aumentou proporcionalmente a contagem de micro-organismos psicotróficos, em relação à quantidade de mesófilos.

A cinética de fermentação do iogurte foi prejudicada quando o leite utilizado para a produção esteve estocado por longo tempo. Primeiramente, foi incrementada pela presença de mesófilos aeróbios no leite cru, que potencializaram a produção de ácido láctico. Entretanto, quando foi utilizado leite cru de 168h de estocagem, houve redução no desenvolvimento de *S. thermophilus*, devido à degradação das proteínas e redução do metabolismo desta bactéria ácido-láctica. No âmbito geral, o tempo total de fermentação não apresentou alteração quando utilizadas matérias-primas com maior tempo de estocagem.

Os iogurtes produzidos com leite cru com maior tempo de estocagem, ou quando estocados refrigerados por longo prazo, foram os que apresentaram maiores alterações. Verificou-se que o iogurte estocado por 15 dias, teve redução do pH quando foi utilizada matéria-prima de 168h de estocagem; demais iogurtes mantiveram seu o pH estável.

O percentual proteico dos iogurtes foi o parâmetro que sofreu maior alteração neste estudo. Os iogurtes produzidos com matéria-prima estocada por mais tempo (168h), apresentaram redução de proteínas, mas somente quando estocados por 15 dias foi possível verificar essa diferença. Não foram verificadas alterações nas demais características físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes produzidos, independentemente da matéria-prima utilizada na fabricação.

Enfim, concluímos que o tempo de estocagem prolongado do leite cru pode afetar a produção de derivados lácteos produzidos a partir desta matéria-prima, mesmo em condições de estocagem ideais e utilização de matéria-prima de qualidade. Para não haver prejuízos na produção de iogurte, recomenda-se estocar o leite a 4°C, por períodos inferiores à 72h.

ANEXOS

ANEXO A – Informativo Técnico Cultura CHR FD-DVS YF-L812 Yo-Flex®

		<h2>Informativo Técnico</h2>	
<h3>FERMENTO DVS YF L811E 812</h3>			
Descrição:	Cultura láctica termofílica, liofilizada para iogurte. O cultivo contém uma mescla de cepas de <i>Streptococcus salivarius subesp. thermophilus</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus</i> .		
Embalagem:	Envelopes 50U e 200U.		
Aplicação:	Na elaboração de iogurtes e bebidas lácteas fermentadas. A cultura confere ao produto final: - muito alta viscosidade; - sabor muito suave; - baixa pós-acidificação.		
Conservação e Validade:	Produto liofilizado. O produto deve ser mantido sob congelamento à temperatura mínima de -18°C. Nestas condições o produto mantém suas especificações por um período de 24 meses.		
Dados técnicos:	A temperatura para incubação é de 35 - 45°C.		
Modo de uso:	Retirar a cultura do freezer, limpar a parte superior da embalagem com álcool 70°GL. Abrir a embalagem e misturar os grânulos diretamente ao produto pasteurizado, agitando lentamente.		
Dosagem:	1 envelope de 50U para 500 litros. 1 envelope de 200U para 2.000 litros.		
Fabricante/Importador:	Chr-Hansen.		
Cód. Produto:	Envelopes	YF 811	YF 812
	50U	667295	667296
	200U	667330	677350
<p><small>As informações contidas no documento e as recomendações aqui efetuadas são feitas com base nas informações do fabricante. Nenhuma garantia quanto à aplicabilidade e precisão de tais informações é fornecida. Assim, recomendamos aos clientes que, antes de utilizarem qualquer produto em escala industrial, realizem testes preliminares para determinar se o produto é adequado às suas necessidades. Nossa equipe técnica estará à disposição para ajudá-los.</small></p>			
<p>L C Bolonha Ingredientes www.lcbolonha.com.br (41)3139.4455</p>			