

AValiação DA PÓS-ACIDIFICAÇÃO E VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS UTILIZANDO O MÉTODO CONVENCIONAL E O SISTEMA COMPACT DRY® TC DURANTE ESTOCAGEM REFRIGERADA DE IOGURTES

Evaluation of post-acidification and viability of lactic bacteria using traditional method and system Compact Dry® TC during refrigerated storage yogurt

*Leticia C. S. DUALDO
Sabrina N. CASAROTTI
Aline T. PAULA
Roberta T. MELO
Daise A. ROSSI*

SUMÁRIO

A pós-acidificação e a viabilidade de bactérias lácticas de iogurtes foram avaliadas durante 42 dias de estocagem refrigerada. Foi analisada a eficiência do Compact Dry® TC associado ao caldo *De Man Rogosa Sharp* (MRS) pH 5,4 para enumeração de bactérias lácticas. Aliquotas foram diluídas e plaqueadas, simultaneamente, em placas contendo ágar MRS, incubadas em microaerofilia, e em placas de Compact Dry® TC, incubadas em duas condições de atmosfera distintas: em jarras hermeticamente fechadas com gerador de microaerofilia ou acondicionadas em filme plástico transparente (PVC). Para o cultivo no Compact Dry® TC a última diluição foi realizada em caldo MRS pH 5,4. Após 48 horas, as colônias formadas foram enumeradas e as contagens foram comparadas por análise de variância ($p < 0,01$). O valor de pH apresentou redução durante o período de estocagem refrigerada. Os resultados obtidos indicam que o Compact Dry® TC associado ao caldo MRS pH 5,4 e envolvido por PVC pode ser considerado uma alternativa viável ao método convencional de plaqueamento para enumeração de bactérias lácticas em iogurtes.

Termos para indexação: bactérias lácticas, pós-acidificação, Compact Dry® TC, iogurte.

1 INTRODUÇÃO

As culturas microbianas empregadas na fabricação do iogurte são compostas por bactérias lácticas. Neste grupo estão inseridos vários gêneros e espécies. Embora estejam em gêneros filogeneticamente distintos, possuem características em comum: são imóveis, não formam esporos, Gram-positivo, catalase negativo, não possuem citocromos e são ácido tolerantes moderados. Morfologicamente são cocos ou bacilos. São classificadas como

mesofílicas (20-30°C) e termofílicas (35-45°C), aeróbicas ou aerotolerantes. Homofermentativas, produzindo quase que exclusivamente ácido láctico via Embden-Meyerhof ou heterofermentativas, produzindo ácido láctico, e outros compostos, como CO₂ e etanol, via fosfoctolase. As bactérias lácticas necessitam de nutrientes específicos, como aminoácidos e vitaminas, sendo classificadas como microrganismos fastidiosos (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Além de agregar vantagens para saúde de seus consumido-

1. Universidade Estadual Paulista, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos. Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil.
2. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. Av. Ceará. s/n - BI 2D, sala 43, 38405-303 Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: daiser@umuarara.ufu.br

* A quem a correspondência deve ser enviada.

res, as bactérias da cultura tradicional do iogurte modificam as características sensoriais, tecnológicas e nutricionais do leite, proporcionando melhorias na qualidade do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004; SHAH, 2007). A Comissão do *Codex Alimentarius* para leites fermentados (CODEX STAN 243-2003) estabelece que os microrganismos da cultura tradicional de iogurtes devem estar viáveis, ativos e abundantes no produto final durante todo o prazo de validade. Em relação ao número mínimo viável, a norma brasileira específica que o total de bactérias lácticas presentes em iogurtes deve ser superior a $1,0 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2000). Portanto, a viabilidade das bactérias lácticas é um importante critério analítico a ser verificado para o cumprimento das especificações estabelecidas para o iogurte (TABASCO et al., 2007).

Com a obrigatoriedade das contagens de bactérias lácticas viáveis e estabelecimento do número mínimo aceitável em iogurtes pela legislação, as indústrias foram obrigadas a introduzir essa análise em sua rotina. O método tradicional de cultivo em placas recomendado para contagem de bactérias lácticas pelo *International Dairy Federation* (LIMA et al., 2009) utiliza o meio *De Man Rogosa Sharp* (MRS), que preconiza a incubação das placas em ambiente de microaerofilia. Portanto, esta técnica apresenta maior custo devido ao uso da atmosfera modificada e a necessidade de maior espaço para incubação das amostras.

Nos últimos anos várias metodologias de análises alternativas têm sido oferecidas às indústrias de alimentos, buscando-se rapidez e simplicidade, sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. Entre as novas tecnologias desenvolvidas para enumeração de microrganismos está o sistema Compact Dry®, que contém enzimas cromogênicas capazes de detectar atividades de enzimas características dos microrganismos pesquisados (KODAKA et al., 2006a; KODAKA et al. 2006b).

O Compact Dry® *Total Count* (TC) é recomendado para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e possui validações da A.O.A.C. n°. 010404 (A.O.A.C., 2008), Nord-Val n°. 033 (NORDVAL, 2008) e MicroVal

n° MV0703-001LR (MICROVAL, 2007). Entretanto, para utilização na contagem de bactérias lácticas, algumas modificações precisam ser feitas na metodologia de análise. As amostras devem ser diluídas em caldo MRS e incubadas em condições anaeróbias ou microaerófilas (NERO et al., 2006; ORTOLANI et al. 2007; GONÇALVES et al., 2009).

Validações internacionais e nacionais de métodos de análise podem e devem ser repetidas para verificar se há interferência de variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia nos resultados obtidos. Testes internos por comparação com os métodos tradicionais de análise devem ser realizados, já que muitas vezes, características intrínsecas dos alimentos podem interferir nos resultados.

Considerando que o número de bactérias lácticas viáveis em iogurtes é essencial para se obter as características tecnológicas e funcionais do iogurte, e que muitas vezes seu monitoramento é limitado por questões físicas de espaço, este estudo possuiu como objetivos: comparar a metodologia tradicional de análise em ágar MRS com o Compact Dry® TC, para enumeração de bactérias lácticas em iogurte; verificar se a população de bactérias lácticas atende ao padrão estabelecido pela legislação até o final da validade dos produtos; realizar teste de coloração de Gram, catalase e coagulase nas colônias enumeradas para confirmação de algumas características bioquímicas das bactérias lácticas e determinar as variações no pH de iogurtes durante o armazenamento refrigerado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas imediatamente após a produção de uma fábrica de laticínios de Uberlândia-MG, 30 amostras de iogurtes sabor morango do mesmo lote, em embalagens de 180 g. As amostras foram acondicionadas e transportadas em caixa isotérmica para o laboratório onde foram armazenadas sob refrigeração por 1, 21 e 42 dias após fabricação, sendo analisadas em duplicata.

2.2. Análises microbiológicas

Um volume de 10 mL das amostras foram adicionados em 90 mL de água peptonada 0,1% (AP) e depois realizadas diluições decimais seriadas em 9 mL de AP, sendo utilizadas para semeadura em placas as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Para o cultivo no Compact Dry® TC a última diluição foi realizada em 9 mL de caldo MRS pH 5,4. A quantificação de bactérias lácticas viáveis foi obtida por diferentes métodos:

- tradicional de análise;
- Compact Dry® TC em atmosfera de microaerofilia;
- Compact Dry® TC com atmosfera modificada por filme plástico.

2.3. Contagem de bactérias lácticas pelo método tradicional e pelo sistema Compact Dry®

A contagem de bactérias lácticas foi realizada em paralelo pela técnica de análise convencional e pelo teste rápido Compact Dry®. O protocolo de análise tradicional foi realizado de acordo com recomendações de Silva et al. (2007), utilizando 9 mL de água peptonada 0,1% como diluente e o método por profundidade em agar *De Man Rogosa Sharp* (MRS) acidificado até pH 5,4 (IDF, 1997), em duplicata. Para as placas de Compact Dry® TC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) foram empregadas as mesmas diluições que o método tradicional e em substituição à água peptonada tamporada nas diluições de trabalho foi utilizado 9 mL do caldo MRS pH 5,4 como diluente. Para análise, 1 mL das diluições selecionadas foram adicionadas em duplicata às placas de Compact Dry®. As placas de ambos os métodos foram colocadas de forma invertida em uma jarra de anaerobiose, adicionando um gerador de microaerofilia (Probac microaerobac generator®). Somente para o teste de Compact Dry® a placas foram acondicionadas, também, em filme plástico transparente (PVC) em camada dupla de forma a dificultar trocas gasosas com o ambiente. As placas de

ambos os métodos foram incubadas na temperatura de 30 °C por 72 horas. Ao final do período de incubação as colônias foram contadas e o total foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso como UFC.mL⁻¹.

2.4. Confirmação das características morfológicas e bioquímicas das bactérias lácticas

As bactérias que desenvolveram em agar MRS pH 5,4 e em Compact Dry®, e apresentaram coloração creme e vermelha, respectivamente, foram submetidas a teste de catalase, coloração de Gram e morfologia (GUEIMONDE, 2004).

2.5. Mensuração do valor de pH

Após análise microbiológica, o pH foi determinado com pH-metro calibrado, modelo Tec-3MP, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras.

2.6. Análise dos resultados

As contagens obtidas foram tabuladas por data de análise e submetidas à análise estatística para verificar a existência de diferenças significativas entre os métodos utilizados e dentro das contagens realizadas nos diferentes dias. Na análise, o delineamento experimental utilizado foi o aleatorizado em blocos com esquema fatorial (3 blocos, 3 tratamentos x 10 repetições). Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância com aplicação do Teste F. Quando o Teste F foi significativo ao nível de 5%, a análise estatística foi continuada, aplicando-se o teste de comparação múltipla de médias de Tukey, ajustado para o valor-p (HAIR, 2005). Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS 10.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Viabilidade das bactérias lácticas durante estocagem refrigerada dos iogurtes

A legislação brasileira preconiza que o número mínimo de bactérias lácticas viáveis

em iogurtes deve ser de $1,0 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ (BRASIL, 2000). No primeiro dia de armazenamento esse número foi observado em apenas 10% (1/10) das amostras de iogurte analisadas, e aos 21 dias em 40% (4/10) das amostras. Após 42 dias, nenhuma das amostras apresentou valores considerados satisfatórios. Esses resultados evidenciam que estes iogurtes estão fora do padrão exigido pela legislação brasileira em relação ao número de bactérias lácticas viáveis.

Durante o processo de estocagem as colônias de bactérias de coloração creme e azul encontradas no método tradicional e no Compact Dry[®] respectivamente, apresentaram morfologia cocoíde ou de bastonetes, catalase negativa e Gram positiva, confirmando a presença de bactérias lácticas no iogurte.

No método tradicional de contagem de bactérias lácticas os valores das médias aritméticas das contagens determinadas nos iogurtes foram: 6,86 log UFC.g⁻¹, 6,98 log UFC.g⁻¹ e 6,68 log UFC.g⁻¹, após 1, 21 e 42 dias de armazenamento refrigerado. De acordo com as médias das contagens pressupõe-se que não houve diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os resultados obtidos nos dias 1 e 21, mas houve diferença significativa quando os dias 1 e 21 foram comparados ao dia 42 ($p < 0,01$), indicando que há tendência de diminuição no número de bactérias lácticas viáveis após 21 dias de armazenamento refrigerado. A diminuição no número viável de bactérias lácticas durante a vida de prateleira de iogurte deve-se a vários fatores, entre eles: utilização inadequada da cultura; deficiência na fabricação do produto ou na sua manipulação, temperatura de armazenamento; permeabilidade do oxigênio através da embalagem; a presença de microrganismos competidores e de conservantes; produção de ácido láctico e o subsequente abaixamento do pH, causados pelos microrganismos fermentadores (EZKAURIATZA et al., 2008). Apesar disso, pesquisas realizadas têm mostrado que as bactérias do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) sobrevivem bem no produto du-

rante a vida de prateleira (DONKOR et al., 2006).

Os resultados obtidos neste estudo são diferentes aos relatados por Hussain, Rahman e Atkinson (2009), no qual observaram população média de bactérias lácticas de $4,6 \times 10^8$ UFC.g⁻¹ em amostras de iogurte comerciais. Lin et al. (2006) analisaram a viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes comerciais e encontraram população superior a 10^8 UFC.g⁻¹.

Em estudo conduzido por Dave & Shah (1997) foi investigada a viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a vida de prateleira de iogurtes elaborados a partir de culturas comerciais. Após, cinco dias de armazenamento as populações de ambas as bactérias apresentaram declínio. Damin et al. (2009) também verificaram a redução na viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes após 35 dias de estocagem refrigerada.

As médias obtidas para contagens nos diferentes períodos utilizando os resultados do Compact Dry[®] em atmosfera de microaerofilia foram 7,88 log.UFC.g⁻¹, 6,80 log.UFC.g⁻¹ e 7,62 log.UFC.g⁻¹, respectivamente, após 1, 21 e 42 dias. Foram observadas diferenças nas contagens ($p < 0,01$) entre os dias 1, 21 e 42. Os resultados das contagens no método Compact Dry[®] envolvido em filme plástico não demonstraram diferenças ($p > 0,01$) após armazenamento por 1, 21 e 42 dias.

3.2. Comparação entre os métodos de análise

Os resultados obtidos no método tradicional e no Compact Dry[®] incubado em jarra com atmosfera de microaerofilia demonstrou diferença ($p < 0,01$) quando as contagens foram realizadas após 1 e 42 dias da fabricação, sem diferença nas contagens aos 21 dias. Porém, não houve diferença em nenhum dos períodos de armazenamento estudados quando a metodologia tradicional foi comparada ao método Compact Dry[®] incubado em atmosfera modificada pelo uso de filme PVC. Este resultado indica que o método tradicional e o

Compact Dry® envolvido em PVC são equivalentes (Tabela 1).

Tabela 1 Comparação das médias das contagens de bactérias lácticas viáveis (log UFC.g⁻¹) obtidas pelo método tradicional e pela metodologia alternativa Compact Dry® incubados a 30°C por 72 horas, em atmosfera microaerófila e modificada pelo envolvimento em filme PVC incubados.

Dias	Tradicional	CD jarra	CD PVC
1	6,86±0,13 ^a	7,88±0,76 ^b	6,51±0,36 ^a
21	6,98±0,12 ^a	6,80±0,24 ^a	6,78±0,28 ^a
42	6,68±0,20 ^a	7,62±0,36 ^b	6,71±0,19 ^a

Tradicional – cultivo em ágar MRS, pH 5,4; CD jarra – Compact Dry®; CD PVC – Compact Dry® em atmosfera modificada pelo envolvimento em filme plástico.

^{a,b} .médias seguidas de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,01).

A equivalência entre os métodos representa ao setor produtivo e aos serviços de fiscalização uma alternativa viável para a contagem de bactérias lácticas em iogurtes e para a implantação de medidas corretivas em casos de não conformidades. Essa concordância facilitará o monitoramento em pequenas empresas onde o uso de geradores e jarras oneram o processo produtivo, pois além de serem dispendiosas, ainda são usadas para pequena quantidade de análises/dia.

Considerando-se os resultados obtidos, o Compact Dry® envolvido em PVC apresentou desempenho apropriado para enumeração de bactérias lácticas em iogurtes. Estudos têm sido conduzidos com o propósito de examinar a aplicabilidade do Compact Dry® em comparação com o método padrão de contagem em placas. Meldrum (2004) reportou os dados obtidos no estudo de validação realizados pela AOAC entre o Compact Dry® TC e o método oficial para enumeração de bactérias mesófilas e considerou os métodos equivalentes. Foram analisadas amostras de carne moída em três diferentes níveis de contaminação (10³, 10⁴ e 10⁵) com cinco repetições de cada, em um total de 15 amostras para cada tipo de matriz. Nestes estudos foi calculado o coeficiente de correlação (r²) para realizar a comparação entre os métodos.

Beuchat et al. (1999); Casarotti, Paula e Rossi (2007); Kodaka et al. (2006a) e Kodaka

et al. (2006b) compararam o Compact Dry® com a metodologia tradicional para a detecção de diferentes grupos de microrganismos em variadas matrizes alimentícias. Estes estudos constataram que o Compact Dry® é equivalente ao método tradicional de análise.

Pós-acidificação dos iogurtes durante a estocagem refrigerada

As médias de pH determinadas nas amostras de iogurte após 1, 21 e 42 dias de armazenamento foram 4,66; 4,35 e 4,27, respectivamente (Figura 1).

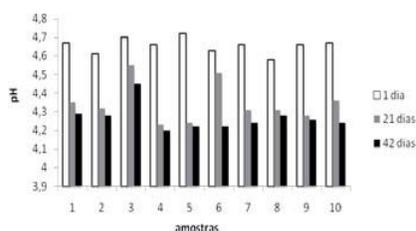


Figura 1. Valores médios de pH determinados nas amostras de iogurte após 1, 21 e 42 dias de estocagem refrigerada.

A diminuição nos valores de pH está relacionada à pós-acidificação do iogurte durante o armazenamento refrigerado apresentando diferença estatisticamente significativa durante os períodos analisados. O *L. bulgaricus* é o principal responsável pela pós-acidificação dos iogurtes, mas por outro lado, contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico do iogurte (SHAH, 2000; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; DAMIN et al., 2009). Segundo Dave e Shah (1997), a presença em menor quantidade de *L. bulgaricus* no produto final favorece a diminuição da pós-acidificação durante a vida-de-prateleira, importante para garantir ao produto final sabor suave.

Conforme sugerido por Beal et al. (1999), a redução do pH nos sete primeiros dias de armazenamento está relacionada ao consumo de lactose e produção de ácido láctico e galactose, mostrando a existência da atividade metabólica da bactéria láctica.

O valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer um determinado grupo em detrimento de outro, sendo que no iogurte as bactérias do gênero *Lactobacillus* crescem e toleram valores de pH mais baixos que o gênero *Streptococcus*. Estudos realizados por Salji e Ismail (1983) e Donkor et al. (2006) mostraram que em iogurtes armazenados sob refrigeração, o pH pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial do mesmo, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas.

Antunes, Cazetto e Bolini (2005) avaliaram o pH de iogurtes desnatados adicionados de concentrado protéico de soro e relataram redução do pH em todos os iogurtes formulados ao longo do tempo de armazenamento. Saint-Eve et al. (2008) verificaram o decréscimo do pH em iogurtes armazenados em diferentes tipos de embalagens durante 28 dias de estocagem a 4°C. Pesquisa conduzida por Kailasapathy et al. (2008) em iogurtes adicionados de polpas de frutas comerciais indicou que ocorreu declínio do valor de pH nos produtos. A média do pH medido variou de 4,45 no dia da fabricação dos produtos, para 4,25 após 35 dias de armazenamento a 4°C.

A legislação brasileira não estabelece limites em relação ao pH de iogurtes (BRASIL, 2000). Segundo a tecnologia de fabricação, o pH do iogurte depende do tipo de cultura utilizada para a fermentação e pode variar de 4,5 a 4,8 em produtos recém elaborados (TAMIME; DEETH, 1980; CHR HANSEN, 2003).

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que as contagens de bactérias lácticas viáveis dos iogurtes analisados apresentaram valores abaixo do padrão estabelecido pela legislação brasileira. Além disso, o número de bactérias lácticas reduziu de forma significativa após 21 dias de armazenamento dos produtos.

O método alternativo Compact Dry® envolto em filme plástico apresentou contagens equivalentes ($p > 0,01$) ao método tradi-

cional e pode ser adotado para a contagem de bactérias lácticas, uma vez que representa uma alternativa prática e viável.

SUMMARY

Post-acidification and viability of lactic acid bacteria (LAB) of commercial yogurts were examined during 42 days of refrigerated storage. The efficiency of Compact Dry® TC associated with Man Rogosa Sharpe (MRS) broth at pH 5.4 was evaluated to enumerate LAB. Aliquots were submitted to dilution and plated simultaneously for LAB enumeration at MRS plates incubated under anaerobiosis and at Compact Dry® TC plates incubated under anaerobiosis in two distinct atmospheres conditions; with microaerofilia generator or with PVC involving the plates. MRS broth at pH 5.4 was employed for the last dilution inoculated on Compact Dry® TC. After 48 hours, the formed colonies were enumerated and were made Gram test, catalase and coagulase. The counts were compared by analysis of variance ($p < 0.01$). The pH value showed reduction during the refrigerated storage. Results indicated that Compact Dry® TC associated to MRS at pH 5.4 and involved by PVC can be considered as a suitable alternative to conventional methods for LAB enumeration in yogurts.

Index-terms: lactic acid bacteria, post-acidification, Compact Dry® TC, yogurt.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. Research Institute. Certificate of *Performance Tested*™ Status (Certificate no. 010404) - Nissui Compact Dry Total Count, Washington, 2008.

A.O.A.C. Research Institute. Official methods of analysis - NISSUI Compact Dry total Count, Japan, 2004.

ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO T. F.; BOLINI, H. M. A. Viability of probiotic micro-organism during storage, post-acidification and sensory analysis of fat-free

- yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal Dairy of Technology**, v. 58, n. 3, p. 169-173, 2005.
- BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.
- BEUCHAT, L. R. Spoilage of acid products by heat-resistant molds. **Dairy Food Environmental Sanitation**, v. 18, n. 9, p. 588-593, 1998.
- BRASIL. Resolução nº 5, de 13 de nov. 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 27 de nov. 2000. Seção 1, p. 9.
- CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 278-286, 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2003). Codex standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf> .
- DAMIN, M. R. et al. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **Food Science of Technology**, v. 42, n. 10, p. 1744-1750, 2009.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made with commercial starters cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 8, p. 537-545, 1997.
- DONKOR, O. N. et al. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1181-1189, 2006.
- EZKAURIATZA, E. J. A. et al. Effect of mixing during fermentation in yogurt manufacturing **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4454-4465, 2008.
- GONÇALVES, M. M. et al. Enumeration of starter cultures during yogurt production using Petrifilm™ AC plates associated with acidified MRS and M17 broths. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 2, p. 229-233, 2009.
- GUEIMONDE, M. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 839-850, 2004.
- HAIR, A. **Análise Multivariada de Dados**. Artmed: Porto Alegre. 600 p. il, 2005.
- HUSSAIN, I.; RAHMAN, A.; ATKINSON, N. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 2009.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. **International IDF Standard**, 117/B, 1997.
- KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1317-1322, 2008.
- KODAKA, H. et al. Comparison of the Compact Dry EC with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of *Escherichia coli*

- and coliform bacteria in raw meats. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 100-114, 2006a.
- KODAKA, H. et al. Comparison of the Compact Dry YM with the FDA BAM Method for Enumeration of Yeasts and Molds in Fruit-Based Products: *Performance-Tested MethodSM* 100401. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 127-138, 2006b.
- KOMATSU, T. R. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica*. v. 44 n. 3, p. 329-347, 2008.
- LEROY, F.; DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends of Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- LIMA, K. G. C. et al. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 491-495, 2009.
- LIN, W. H. et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 74-81, 2006.
- MELDRUM, R. Report by the National Public Health Service for Wales for the AOAC Research Institute on the NISSUI Compact Dry Total Count method. **National Public Health Service for Wales**, Penarth, p. 1-9, 2004.
- MICROVAL. **Compact Dry TC complies with de MicroVal Rules and Certification Scheme version 5**. Certificate no MV0703-001LR, Rotterdam, p. 1-4, 2007.
- NERO, L. A. et al. Comparison of PetrifilmTM Aerobic Count Plates and de Man-Rogosa-Sharpe Agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods Automatic Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 249-257, 2006.
- NORDVAL. **Compact Dry TC Method fo the enumeration of total viable organisms**. NordVal n° 033, Oslo, Norway, p. 1-5, 2008.
- ORTOLANI, M. B. T. et al. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in PetrifilmTM Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 387-391, 2007.
- SAINT-EVE, A. Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. **Food and Chemical**, v. 110, n. 2, p. 285-293, 2008.
- SALJI, J. P.; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yoghurt on acidity changes during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 1, p. 249-258, 1983.
- SHAH NP. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.
- Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 3th ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.
- TABASCO, R. et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented Milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 9, p. 1107-1114, 2007.