

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mariana Braga de Oliveira

**Produção e caracterização de iogurte produzidos com culturas lácticas comerciais
fermentadoras de lactose ou sacarose**

Juiz de Fora
2023

Mariana Braga de Oliveira

**Produção e caracterização de iogurte produzidos com culturas lácticas comerciais
fermentadoras de lactose ou sacarose**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Orientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Moreira Hungaro

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Braga de Oliveira, Mariana .

Produção e caracterização de iogurte produzidos com culturas lácticas comerciais fermentadoras de lactose ou sacarose / Mariana Braga de Oliveira. -- 2023.

77 f. : il.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientadores: Rodrigo Stephani, Humberto Moreira Húngaro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Iogurte. 2. Bactérias lácticas. 3. Contagem de bactérias lácticas. 4. *Streptococcus thermophilus*. 5. Fermento láctico. I. Tuler Perrone, Ítalo, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Moreira Húngaro, Humberto, coorient. IV. Título.

Mariana Braga de Oliveira

**Produção e caracterização de iogurte produzidos com culturas lácticas
comerciais fermentadoras de lactose ou sacarose**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Aprovada em 06 de outubro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ítalo Tuler Perrone – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Humberto Moreira Húngaro – Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Rodrigo Stephani – Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Mirian Pereira Rodarte
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Érica Felipe Maurício
Chr. Hansen Indústria e Comércio

Juiz de Fora, 06/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por Italo Tuler Perroni, Professor(a), em 06/10/2023, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por ERICA FELIPE MAURICIO, UsuárioExterno, em 07/10/2023, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Stephani, Professor(a), em 09/10/2023, às 07:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mirian Pereira Rodarte, Professor(a), em 09/10/2023, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Humberto Moreira Hungaro, Professor(a), em 11/10/2023, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1458234 e o código CRC 889BCDD7.

Dedico este trabalho especialmente à memória de minha mãe, ao meu pai e à minha família, bem como aos meus colegas de laboratório e aos meus professores que me inspiraram e proporcionaram o suporte e apoio fundamentais para realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Neste momento tão significativo e desafiador da minha jornada acadêmica, gostaria de expressar minha sincera gratidão a Deus e todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

Primeiramente, quero homenagear a memória da minha amada mãe Alciléia, que mesmo não estando fisicamente presente, sempre foi e continuará sendo minha maior inspiração. Seu amor, dedicação e valores moldaram a pessoa que dou hoje, e esta dissertação é dedicada a sua memória eterna. Sua ausência é profundamente sentida, mas sei que ela estaria orgulhosa deste marco em minha vida.

Gostaria de agradecer ao meu pai José Almir por ser meu maior exemplo, por me ensinar tão bons valores desde cedo e por me apoiar nos diferentes caminhos que já escolhi em minha vida. Agradeço a toda minha família Tia Anicéia, Tia Alcéia, Tia Alcione e Tia Cida pelo apoio incondicional ao longo dos anos, seus encorajamentos, incentivos e orações que foram fundamentais para minha jornada. Ao meu namorado, Leonardo Assis, por ser o meu apoio, por me incentivar a seguir o que meu coração mandar e acreditar sempre em mim.

Aos meus orientadores Ítalo Perrone, Rodrigo Stephani, expresso minha gratidão, por confiarem no meu trabalho e me ajudarem a evoluir na minha trajetória. E ao Professor Humberto Húngaro, agradeço por ter me cedido o espaço no LAAA, por todos os ensinamentos sou muito grata pela oportunidade de trabalhar e aprender com você.

Não posso deixar de mencionar meus colegas de trabalho/estudo, do QUIMTEC aqueles que compartilho a trajetória desde 2019 Caroline Barroso, Igor Lima, Natália Alves, Nathália Campos e Júlia Francisquini só gratidão por ter vocês desde então na minha trajetória, todo apoio, e por compartilhar sempre seus conhecimentos comigo. Gostaria de agradecer ao Matheus Mendes pela sua amizade, seu empenho e dedicação com os experimentos, e não posso deixar de agradecer a Elisa Reis por me ajudar no momento em que

mais precisei, minha eterna gratidão. Agradeço também por compartilharem o dia-a-dia e fazendo com que os dias fiquem mais leves os demais amigos de laboratório, Taynan Barroso, Jaqueline Celestino, Monisa Gouvêa, Carolina Neves, Natalia Casa, Cristian Medina, Biany Aparecida, Vitória Souza, Maria Ester, Kamila Souza, Júlia Maria muito obrigada pela amizade. Não poderia deixar de agradecer também aos colegas do LAAA que não mediram esforços para me ajudar, gratidão pessoal!

Gostaria de agradecer às agências de fomento, CAPES e CNPq, cujo financiamento tornou possível a concretização dos projetos. Também gostaria de estender meus agradecimentos aos Departamento de Química, à Faculdade de Farmácia, ao Programa de Pós Graduação e ao Mestrado Acadêmico para Invocação, assim como à empresa de parceria Chr Hansen® por sua inestimável colaboração e apoio durante o meu mestrado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta dissertação. Seja através de apoio moral, revisão crítica (meu GT) ou simplesmente estando ao meu lado nos momentos difíceis, cada gesto foi importante.

Este trabalho não teria sido possível sem o suporte e o amor que recebi. Dedico-o também a todos vocês, com profunda gratidão e amor.

Muito obrigada.

Mariana Braga de Oliveira

RESUMO

Dentre os leites fermentados, o iogurte merece destaque diante da crescente demanda dos consumidores por alimentos saudáveis. Portanto, o objetivo deste estudo é produzir iogurtes a partir de fermentos lácticos comerciais fermentadores de lactose ou sacarose e caracterizá-los quanto ao pH, acidez e contagem de bactérias lácticas totais, utilizando diferentes meios de cultivo e suplementações com carboidratos. Para tanto, buscar-se-á investigar o impacto do uso de diferentes fermentos lácticos (YOFLEX® MILD 1.0 e YOFLEX ACIDIFIX®), com lactose e sacarose como substratos, na contagem de bactérias lácticas totais na fabricação do iogurte, a fim de atender à legislação vigente. Dando ênfase ao papel das bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e à relação dos substratos de lactose e sacarose na contagem das bactérias lácticas, bem como a suplementação desses carboidratos. Foram então empregados os diferentes fermentos lácticos, cada um com suas características específicas, a fim de avaliar como influenciam o crescimento e a contagem de bactérias lácticas. Além disso, foram utilizados meios de cultura M17 de marcas distintas, como Biokar, Merck e Oxoid, destacando a importância de selecionar o meio de cultura apropriado para fins analíticos. A relação entre os substratos de lactose e sacarose na contagem das bactérias lácticas foi investigada, explorando como esses açúcares influenciam o crescimento. Este estudo enfatiza a importância da escolha adequada de meios de cultura e suplementação nas análises das diferentes bactérias lácticas nos iogurtes produzidos, onde os meios M17 das marcas Biokar e Merck mostraram resultados semelhantes, enquanto o meio M17 Oxoid, especialmente quando suplementado com lactose. A confirmação da presença das bactérias lácticas (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) por meio de técnicas microbiológicas confirmou a identidade. Quanto ao pH e à acidez, observou-se uma tendência à redução do pH ao longo do tempo, mas a acidez permaneceu dentro dos limites regulatórios.

Palavras-chaves: iogurte. Bactérias lácticas. Contagem de bactérias lácticas. *Streptococcus thermophilus*. Fermento láctico.

ABSTRACT

Among fermented milks, yogurt stands out given the growing demand from consumers for healthy foods. Therefore, the objective of this study is to produce yogurts using commercial lactic ferments that ferment lactose or sucrose and to characterize them regarding pH, acidity, and total lactic bacteria count using different culture media and carbohydrate supplements. To achieve this, the study will investigate the impact of using different lactic ferments (YOFLEX® MILD 1.0 and YOFLEX ACIDIFIX®), with lactose and sucrose as substrates, on the total lactic bacteria count in yogurt production, aiming to comply with current legislation. Emphasis will be placed on the role of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* bacteria and the relationship between lactose and sucrose substrates in lactic bacteria counting, as well as the supplementation of these carbohydrates. Different lactic ferments, each with their specific characteristics, were employed to assess how they influence growth and lactic bacteria count. Additionally, M17 culture media from different brands, such as Biokar, Merck, and Oxoid, were used, highlighting the importance of selecting the appropriate culture medium for analytical purposes. The relationship between lactose and sucrose substrates in lactic bacteria counting was investigated, exploring how these sugars influence growth. This study emphasizes the importance of the proper choice of culture media and supplementation in the analysis of different lactic bacteria in produced yogurts, where M17 media from Biokar and Merck brands showed similar results, while M17 Oxoid, especially when supplemented with lactose, exhibited inconsistent results. Confirmation of the presence of lactic bacteria (*S. thermophilus* and *L. bulgaricus*) through microbiological techniques confirmed their identity. Regarding pH and acidity, there was a trend towards a reduction in pH over time, but acidity remained within regulatory limits.

Keywords: Yogurt. Lactic bacteria. Lactic bacteria count. *Streptococcus thermophiles*. Lactic ferment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de iogurtes	19
Figura 2 - Efeito do tratamento térmico e acidificação nas micelas de caseína e desnaturação das soro proteínas	22
Figura 3 - Representação esquemática de formação de gel no processo de fabricação de iogurte	23
Figura 4 - Representação esquemática das fases de crescimento de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> e os fatores mais importantes que determinam seus comportamentos de crescimento	24
Figura 5 - Imagem de microscopia ótica de bactérias lácticas <i>S. thermophilus</i> aumentada	27
Figura 6 - Imagem de microscopia ótica de <i>L. bulgaricus</i> aumentada.....	28
Figura 7 - Representação esquemática de características do metabolismo de <i>S. thermophilus</i> , incluindo: lactose e sacarose	30
Figura 8 -Esquema da produção de iogurte	36
Figura 9 - Representação esquemática da análise de <i>S. thermophilus</i> em meios de cultura M17 suplementados com lactose ou sacarose no D1.....	39
Figura 10 - Representação esquemática da análise de <i>S. thermophilus</i> em meios de cultura M17 suplementados com lactose ou sacarose no D1 e D50	41
Figura 11 - Representação esquemática da análise de <i>S. thermophilus</i> em meios de cultura M17 suplementados com diferentes concentrações de lactose no D1.....	42
Figura 12 - Representação esquemática da análise de coloração de Gram	44
Figura 13 - Fotografias do processo de isolamento para envio das colônias para as análises de DNA.....	46
Figura 14 - Curva de acidificação do iogurte fermentado por YOFLEX® MILD 1.0 (FC), e o iogurte fermentado através do YOFLEX® ACIDIFIX®TM (FT) (n = 2).....	50
Figura 15 - Representação gráfica comparativa das diferentes suplementações de sacarose e lactose nos tratamentos FC e FT, nos meios de cultura M17 Biokar e Oxoid (D1).....	52
Figura 16 - Representação gráfica comparativas formulações controle e teste <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	55
Figura 17 - Representação gráfica comparativa das diferentes suplementações de sacarose e lactose nos tratamentos FC e FT, nos meios de cultura M17 Biokar, Merck e Oxoid (D50)	56
Figura 18 - Representação gráfica da comparação dos meios de cultura M17 Biokar, Merck e Oxoid no shelf-life (D1 e D50).....	58
Figura 19 - Representação gráfica comparativa das diferentes concentrações de suplementação de lactose no meio de cultura M17 Oxoid	61

Figura 20 - Representação gráfica comparativa das diferentes concentrações de suplementação de lactose no meio de cultura M17 (Oxoid, Biokar e Merck)	62
Figura 21 - Morfologia das colônias de <i>S. thermophilus</i> no meio de cultura M17 Biokar	63
Figura 22 - Morfologia das colônias de <i>S. thermophilus</i> no meio de cultura M17 Merck	64
Figura 23 - Morfologia das colônias de <i>S. thermophilus</i> no meio de cultura M17	65
Figura 24 - Morfologia das colônias de <i>L. bulgaricus</i> no meio de cultura	66
Figura 25 - Confirmação das colônias <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> através da coloração de Gram	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Requisitos técnicos para iogurtes	31
Tabela 2 - Formulações dos iogurtes.....	34
Tabela 3 - Esquema detalhado de identificação atribuído aos lotes e tratamentos das formulações de iogurte	35
Tabela 4 - Composição dos meios de culturas	37
Tabela 5 - Preparo das concentrações de lactose utilizadas para suplementar o meio de cultura M17 Oxoid.....	42
Tabela 6 - Análise composicional, pH e acidez dos leites desnatado de diferentes lotes	48
Tabela 7 - Análise composicional, pH e acidez das misturas (leite desnatado, leite em pó desnatado e creme de leite) de diferentes lotes.....	49
Tabela 8 - Variação dos valores de pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de shelf-life.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 IOGURTE.....	18
2.1.1 Aspectos gerais e definição sobre iogurte	18
2.1.2 Etapas do processo tradicional de fabricação do iogurte	19
2.2 CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS LÁCTICAS.....	27
2.2.1 Cultura tradicional	27
2.2.2 Fermento YOFLEX® MILD 1.0	28
2.2.3 Fermento YOFLEX® ACIDIFIX®.....	29
2.3 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS OBRIGATÓRIOS E REQUISITOS	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 METODOLOGIA	33
4.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AMOSTRAS DE LEITE	33
4.2 CULTURAS MICROBIANAS.....	33
4.2.1 Preparação do inóculo	34
4.3 PREPARAÇÃO DO IOGURTE.....	34
4.3.1 Curva de fermentação	36
4.4 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADOS NAS ANÁLISES COMPARATIVAS.....	37
4.4.1 Preparo do meio de cultura M17 para contagem de <i>Streptococcus thermophilus</i>	37
4.4.2 Preparo meio de cultura MRS para contagem de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	38
4.4.3 Preparo do diluente	38
4.5 ANÁLISES DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS TOTAIS	38
4.5.1 Avaliação da contagem de <i>S. thermophilus</i> em meio de cultura M17 no dia 1 (D1) de <i>shelf-life</i>	38
4.5.2 Avaliação da contagem de <i>L. bulgaricus</i> em meio de cultura MRS no dia 1 (D1).	40
4.5.3 Avaliação da contagem de <i>S. thermophilus</i> em meio de cultura M17 no dia 50 (D50) de <i>shelf-life</i>	40

4.5.4 Avaliação da contagem de <i>S. thermophilus</i> em meio de cultura M17 com diferentes concentrações de lactose no dia D1 de <i>shelf-life</i>.	41
4.6 VERIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS	43
4.7 CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM	43
4.8 CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16 S RDNA	44
4.9 DETERMINAÇÃO DO PH E ACIDEZ TITULÁVEL NOS IOGURTES.....	46
4.10 ANÁLISE DE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE DESNATADO E DA MISTURA DA FORMULAÇÃO	48
5.2. CURVA DE FERMENTAÇÃO DOS IOGURTES PRODUZIDOS.....	49
5.3 CONTAGEM <i>S. thermophilus</i> NO D1.....	51
5.4 CONTAGEM DE <i>L. bulgaricus</i> NO D1	54
5.5 CONTAGEM <i>S. thermophilus</i> NO D50.....	55
5.5.1 Comparação estatística <i>shelf-life</i> D1 e D50	57
5.6 COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE..	60
5.7 ANÁLISE DAS COLONIAS DOS MEIOS DE CULTURA M17 E MRS	63
5.8 CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS DE <i>S. thermophilus</i> E <i>L. bulgaricus</i> PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM	66
5.9 VARIAÇÕES DO PH E ADICEZ TITULÁVEL NOS IOGURTES PRODUZIDOS	67
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais buscando alimentos saudáveis, impulsionando o aumento no consumo de produtos fermentados, como o iogurte (BRASIL DAIRY TRENDS, 2020). Esses produtos oferecem benefícios para a saúde, como o reforço da imunidade e uma dieta rica em proteínas de alta qualidade, minerais e vitaminas biodisponíveis (MIR; RASTOGI; HARIPRIYA, 2021).

O iogurte, sendo um produto fermentado, é amplamente recomendado devido aos seus benefícios nutricionais, podendo conter probióticos que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal (ABDI-MOGHADAM et al., 2023). A diversidade de iogurtes disponíveis reflete não apenas as preferências dos consumidores, mas também a constante inovação da indústria alimentícia (LACTALIS INGREDIENTS, 2023).

A fermentação do iogurte envolve culturas iniciadoras, como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que atuam sinergicamente na coagulação do leite (BRASIL, 2007). O *S. thermophilus* destaca-se por sua capacidade de adaptação à matriz láctea, desempenhando um papel crucial na produção industrial de iogurtes (HAN; LIAO; WU; GONG; BAI, 2020).

A combinação de *S. thermophilus* com *L. bulgaricus* resulta em acidificação intensa, aprimorando características desejadas do iogurte (INGENIERÍA; ALIMENTOS, 2017). Além disso, a capacidade do *S. thermophilus* em produzir ácido láctico contribui para inibir microrganismos indesejados, justificando a busca por novas cepas com funcionalidades diferenciadas (GASSER et al., 2022; HOLS 2005; BOLOTIN 2004).

A complexidade das interações microbianas na produção de iogurte (NOGUEIRA, 2015) destaca a importância de atender ao Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do iogurte, regulamentado pela Instrução Normativa no 46 (BRASIL, 2007). A análise de contagem total de microrganismos, especialmente aqueles que utilizam *S. thermophilus*, é um critério de qualidade essencial (GOMES et al., 2021). Contudo, a inovação no mercado direciona o foco para culturas iniciadoras capazes de metabolizar sacarose, visando diversificar opções e aprimorar propriedades dos produtos lácteos (LIU et al., 2020).

À medida que o mercado de iogurte cresce, as regulamentações tornam-se mais relevantes para garantir a qualidade e segurança alimentar. No Brasil, normativas rigorosas, como a Instrução Normativa N° 46 de 2007, estabelecem requisitos específicos, incluindo a contagem total de microrganismos (BEHRENS, 2010).

Introduzir novas culturas de bactérias lácticas requer atendimento a exigências de segurança e conformidade, com avaliações detalhadas das características microbiológicas, físicas e químicas dos produtos resultantes (GASSER et al., 2022). Tanto o *S. thermophilus* que utiliza lactose quanto o que utiliza sacarose têm potencial para atender às normativas, mas uma avaliação minuciosa é fundamental (GOMES et al., 2021).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para compreender o impacto de diferentes fermentos lácticos, foi realizado um estudo para investigar como realiza-se uma fermentação láctica, e a avaliação das bactérias lácticas durante o processamento de iogurte.

2.1 IOGURTE

O iogurte, conforme definido pela legislação brasileira, é um produto lácteo obtido por meio da fermentação do leite com bactérias lácticas, especificamente *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Além disso, é possível incluir, de maneira complementar, outras bactérias ácido-lácticas cuja atividade contribui para a definição das características do produto final., conforme estabelecido na Instrução Normativa no 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007). Esse processo de fermentação é crucial para a transformação da lactose presente no leite em ácido láctico, conferindo ao iogurte seu sabor característico e textura cremosa (FERREIRA NETO & VIEIRA; SOUZA, et al., 2022).

2.1.1 Aspectos gerais e definição sobre iogurte

Definido como um produto lácteo obtido por coagulação e diminuição do pH por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbiótico de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (BRASIL, 2007). A fermentação bacteriana não apenas confere um sabor único ao iogurte, mas também contribui para prolongar sua vida útil, reduzindo a viabilidade de bactérias patogênicas e deteriorantes (GRANATO, 2007).

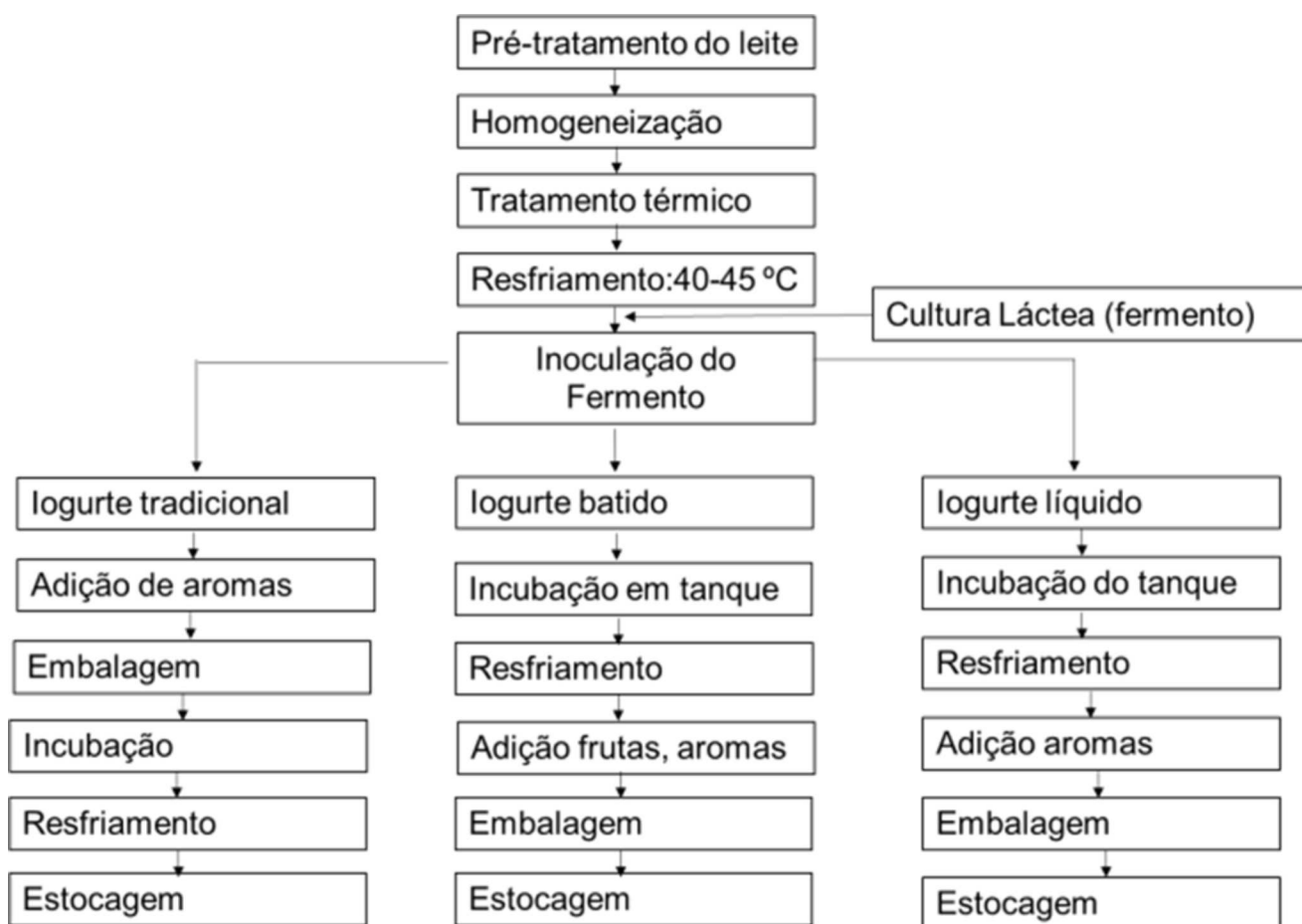
A fermentação tem sido empregada ao longo da história como uma técnica para preservar alimentos, especialmente em épocas que não havia disponibilidade de métodos como pasteurização e refrigeração (LEUCAS, 2012). O progresso tecnológico ao longo do tempo, a produção industrial de iogurte continua a crescer, impulsionada pela atividade econômica, apreciado por seu sabor, textura e benefícios à saúde, resultantes de seu processo de fermentação. Sua popularidade

continua a crescer, tornando-o uma escolha nutritiva versátil para consumidores em todo o mundo (NUTRITION BUSINESS JOURNAL, 2002).

2.1.2 Etapas do processo tradicional de fabricação do iogurte

O processo de produção de iogurte é amplamente reconhecido pela sua rentabilidade, oferece uma série de vantagens, desde benefícios à saúde até a versatilidade. Isso se deve a sua característica única de não requerer etapas de concentração, ou seja, a quantidade de leite que é introduzida no início do processo permanece constante, entretanto, seu volume pode ser aumentado no final do processo com a adição de polpas de frutas, por exemplo (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de iogurtes



Fonte: Robert (2021)

2.1.2.1 Preparo da matéria-prima

O leite utilizado no processo de produção do iogurte deve atender a diversos critérios que podem variar de acordo com o tipo de produto desejado. Esses critérios incluem o teor de gordura, que pode ser padronizado ou não, dependendo das especificações do produto, como se será desnatado ou não segundo a Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018) de 26 de novembro de 2018. Além disso, é fundamental que o teor de sólidos seja considerado, pois um maior teor de sólidos contribui significativamente para consistência do iogurte. Deve ser composto por 5% de lactose, 3,3% de proteína e de pH de 6,6 – 6,7 (ABDI-MOGHADAM et al., 2023)

Para garantir uma fermentação efetiva e evitar inibição ou desequilíbrios no processo, o leite deve ser livre de antibióticos e de outras substâncias inibidoras. É igualmente importante manter uma baixa carga microbiana, uma contagem de células somáticas reduzidas e um baixo nível de concentração de psicrotróficos, fatores essenciais para alcançar a textura desejada, cremosidade e sabor do iogurte final (SOUZA, et al., 2022).

Além desses aspectos, análises físico-químicas do leite também são cruciais para garantir a qualidade do iogurte. segundo a Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018) de 26 de novembro de 2018 parâmetros como acidez, devem estar entre 0,14 a 0,8 g/ ácido láctico. Quanto maior o teor de sólidos, melhor será a consistência, viscosidade e cremosidade do produto final.

Portanto, a escolha e o preparo adequado do leite são etapas fundamentais na produção de iogurte, por influenciar diretamente a qualidade e características do produto final.

2.1.2.2 Homogeneização

A homogeneização está ligada à redução do tamanho dos glóbulos de gordura presentes na mistura. Esse fenômeno ocorre devido à ação mecânica intensa durante o processo, que efetivamente quebra os glóbulos, resultando em partículas menores. Isso por sua vez, contribui para a melhoria da consistência e viscosidade do produto final (VÉLEZ et al., 2017).

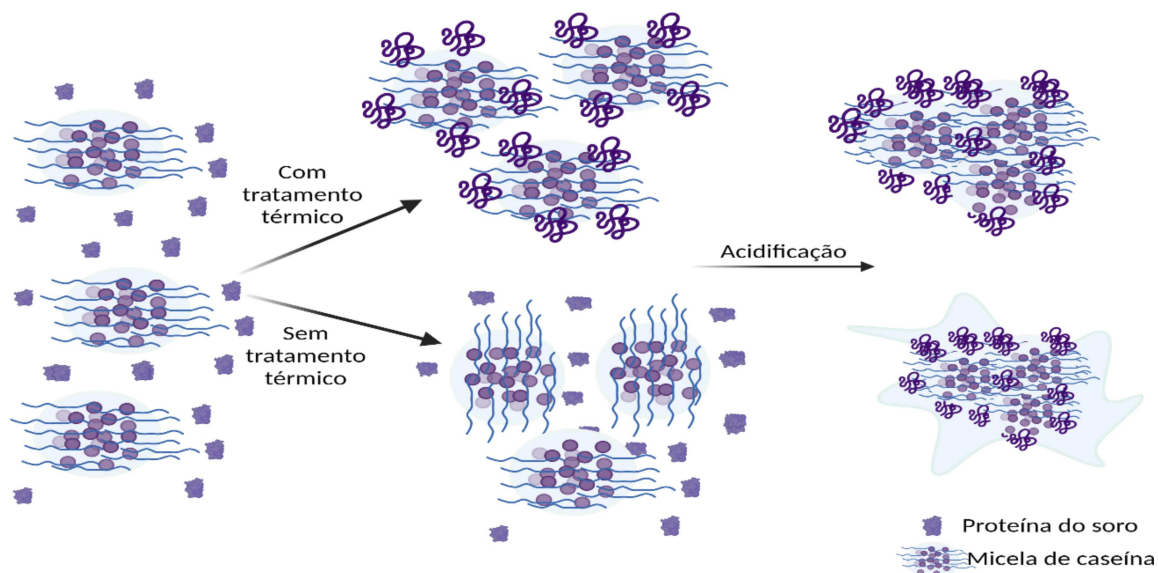
2.1.2.3 Tratamento térmico

O tratamento térmico ideal para produção de iogurte é estabelecido na faixa de temperatura entre 90 a 95 °C, com um tempo de exposição que varia de 5 a 10 minutos. Esse processo é essencial não apenas para eliminar bactérias patogênicas e parte da microbiota comum da mistura, mas também desempenha um papel fundamental na otimização das propriedades do leite como substrato para as bactérias inoculadas na cultura láctea (M KIM, 2018 e OLIVEIRA 2017).

Um aspecto relevante a ser considerado é a desnaturação das proteínas do soro durante o tratamento térmico. Isso significa que suas estruturas tridimensionais e funcionais são alteradas, resultando em uma modificação nas propriedades físico-químicas do leite (CENITI, 2020).

A Figura 2 ilustra as micelas de caseína, que representam cerca de 80% das proteínas do leite e possuem um peso molecular significativamente maior do que as proteínas do soro (SILVA et al., 2019). Durante o tratamento térmico, as micelas de caseína permanecem próximas às proteínas do soro. A desnaturação das proteínas do soro, em especial as beta-globulinas passam a interagir de maneira mais eficaz com as caseínas, contribuindo para a textura, viscosidade e estabilidade do iogurte (SOUZA, et al. 2022). Essa interação fortalecida entre as proteínas do leite é fundamental para a formação da estrutura do gel e as características do iogurte (GOMES et al., 2021).

Figura 2 - Efeito do tratamento térmico e acidificação nas micelas de caseína e desnaturação das soro proteínas



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Após a etapa de pasteurização da mistura, é crucial realizar o resfriamento reduzindo e ajustando a temperatura para a faixa de 37 a 44°C antes de proceder à inoculação do cultivo selecionado.

3.1.2.4 Inoculação do fermento láctico

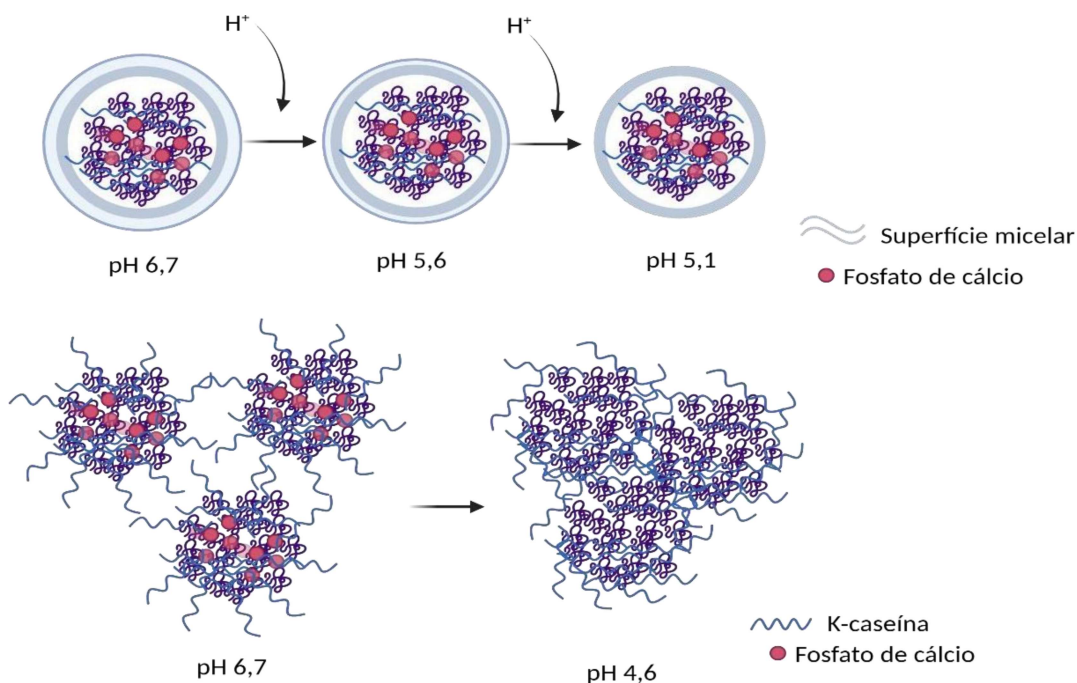
Após a etapa de resfriamento do leite a 37 - 44°C temperatura ótima de inoculação do fermento láctico, adiciona-se (1 a 3%) recomendado pelo fabricante de fermento láctico previamente preparado. Após a adição das culturas, realizar uma agitação constante, distribuindo assim, o fermento em todo o conteúdo, deixar em repouso até que, ao final, o coágulo apresente pH entre 4,4 e 4,6 com 0,9% de ácido láctico (LUCEY & SINGH, 2003).

2.1.2.5 Fermentação láctica

Durante o processo de fermentação do leite para a fabricação do iogurte, as bactérias lácticas utilizam a lactose como substrato, resultando na produção de ácido láctico. Essa produção de ácido láctico desencadeia a redução do pH do leite, um fenômeno desejado que visa atingir um pH 4,6, correspondente ao ponto isoelétrico (PI) das caseínas (SILVA et al., 2022).

Nesse contexto, a acidificação resultante provoca uma desestabilização das micelas de caseína. Isso ocorre devido à solubilização do fosfato de cálcio coloidal e a aproximação do PI das micelas de caseínas, o que leva à sua agregação (SILVA et al., 2019). Esse fenômeno é conhecido como geleificação ou coagulação ácida (Figura 3), e é responsável pela formação do iogurte.

Figura 3 - Representação esquemática de formação de gel no processo de fabricação de iogurte

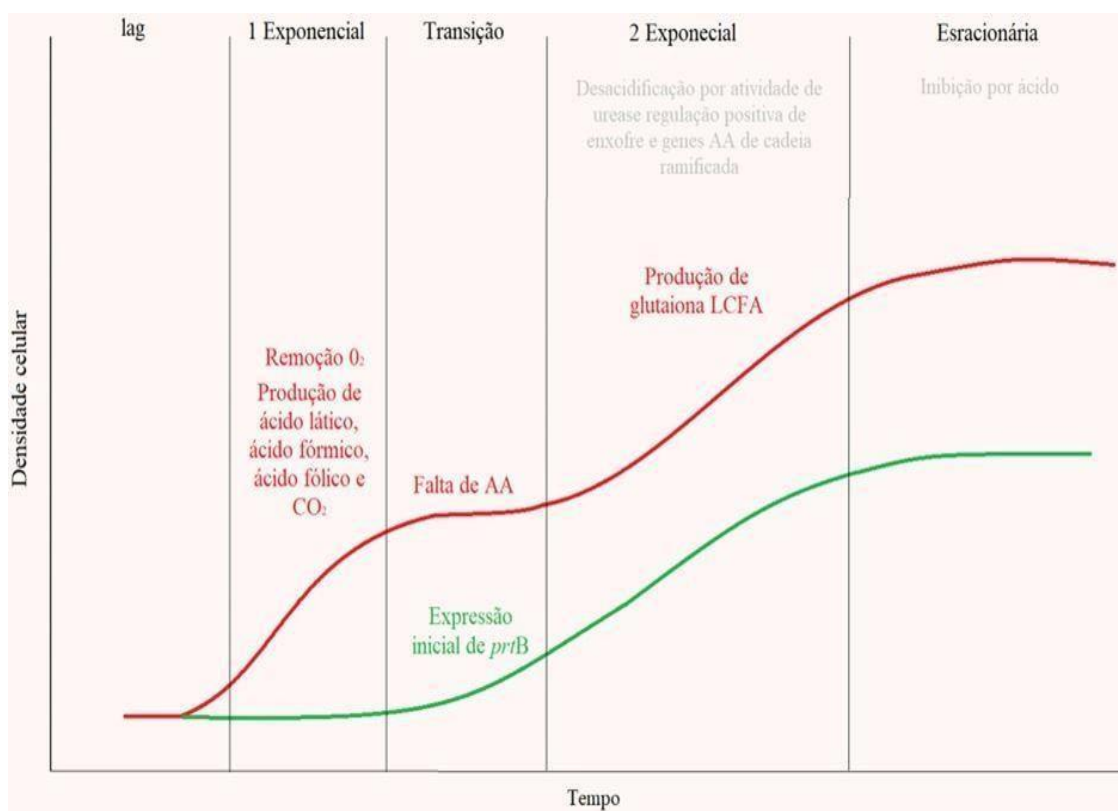


Fonte: Elaborada pela autora (2023)

No início do processo de fermentação, é comum que a proporção numérica entre o crescimento da bactéria *S. thermophilus* e sua relação simbiótica com os *L. bulgaricus* seja aproximadamente 1:1 (TAMINE, 2007). Que se baseia na troca de metabólitos benéficos para o crescimento de *S. thermophilus* onde ele recebe aminoácidos e peptídeos produzidos pelo sistema proteolítico de *L. bulgaricus*, enquanto este se beneficia dos metabólitos como ácido fórmico, ácido fólico, ácido pirúvico, dióxido de carbono (CO₂) e ácidos graxos de cadeias longas que são produzidos pelos *S. thermophilus* (MARCO et al., 2017).

Pode-se observar na figura 4, após a completa adaptação dos microrganismos ao ambiente, inicia-se a fase exponencial, na qual observa-se um crescimento significativo de *S. thermophilus*, enquanto o crescimento de *L. bulgaricus* é relativamente baixo. Isso ocorre devido à maior tolerância de *S. thermophilus* ao pH neutro (TAMINE, 2007).

Figura 4 - Representação esquemática das fases de crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e os fatores mais importantes que determinam seus comportamentos de crescimento



Legenda: AA: Aminoácidos; LCFA: Ácidos Graxos de Cadeia Longa
Fonte: MilkPoint (2023)

S. thermophilus é o iniciador, promovendo a acidificação do meio. A queda do pH, que ocorre até atingir um nível de cerca de 5,0, cria um ambiente favorável ao crescimento de *L. bulgaricus*, que é mais tolerante a pH ácido, proporcionando também a liberação de aminoácidos essenciais (SIEUWERTS, 2016; MARKAKIOU et al., 2020)

Durante o processo de fermentação, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* realizam três transformações bioquímicas principais nos componentes do leite: a fermentação da lactose em ácido láctico, a proteólise das caseínas em peptídeos e aminoácidos livre, e a lipólise da gordura do leite em ácidos graxos livres. Essas reações culminam na redução do pH, na criação de uma textura semi-sólida e no sabor característico do iogurte (SOUZA, et al., 2022).

Além disso, sugere-se que a simbiose entre esses microrganismos não se baseia apenas na troca de nutrientes, mas também na existência de mecanismos de defesa para proteger contra outras substâncias indesejadas (OLIVEIRA et al. 2016 e HERVE-JIMENEZ et al. 2008). Ressaltam também a importância para o desenvolvimento do aroma em produtos lácteos e indicam que a caracterização abrangente dos compostos pode ser útil para criar combinações ideais de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (RAU et al., 2018).

Destaca-se que as substâncias indesejadas referidas no contexto da fermentação láctea, especialmente na produção de iogurte, podem incluir contaminantes indesejados, como microrganismos patogênicos, bactérias deteriorantes ou resíduos de produtos químicos que possam interferir no processo de fermentação ou comprometer a qualidade do produto final. Além disso, a presença de substâncias não desejadas pode afetar o sabor, aroma e textura do iogurte.

Os microrganismos envolvidos na fermentação láctea, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, desempenham não apenas funções fermentativas, mas também têm mecanismos de defesa naturais para competir e inibir o crescimento de microrganismos indesejados. Esses mecanismos podem incluir a produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas que auxiliam na preservação do produto.

É importante mencionar ainda que a escolha e o manuseio adequado das matérias-primas, bem como práticas higiênicas ao longo do processo de produção,

desempenham um papel crucial na prevenção da presença de substâncias indesejadas no iogurte final. As regulamentações sanitárias e de qualidade alimentar também desempenham um papel importante na garantia da segurança e pureza dos produtos lácteos.

2.1.2.6 Resfriamento e quebra da coalhada

O processo de resfriamento desempenha um papel crítico na produção de iogurte e ocorre imediatamente após o produto ter atingido o grau de acidez (pH 4,4 – 4,6) durante a fermentação. A refrigeração é essencial para reduzir a atividade metabólica de bactérias lácticas, controlando assim o nível de acidez do iogurte.

2.1.2.7 Envase

Na etapa de envase, onde o iogurte é embalado após o resfriamento, as condições de temperatura desempenham um papel crucial. O resfriamento é uma etapa crítica na produção de iogurte, sendo realizado logo após o produto ter atingido o pH 4,4 – 4,6, e na segunda etapa, a redução da temperatura da massa deve atingir 20°C (DEETH & TAMIME, 1981). Posteriormente, o produto é armazenado sob refrigeração, sendo recomendada uma temperatura de armazenamento entre 2°C a 5°C para conservar e melhorar a consistência do iogurte (LOBATO, 2000). Esse controle preciso da temperatura durante o envase e o subsequente armazenamento refrigerado são aspectos essenciais para manter as características sensoriais desejadas e garantir a estabilidade do iogurte ao longo do tempo..

2.1.2.8 Pós acidificação

Durante o período de armazenamento do iogurte, são observadas variações em sua qualidade. A atividade metabólica das bactérias lácticas presentes no iogurte diminui significativamente durante o resfriamento. (BOECK et al., 2021) No entanto, o produto final pode sofrer um fenômeno conhecido como pós-acidificação, caracterizado pela redução do pH durante o armazenamento refrigerado, devido à atividade metabólica persistente das bactérias lácticas. (DAMIN et al., 2008)

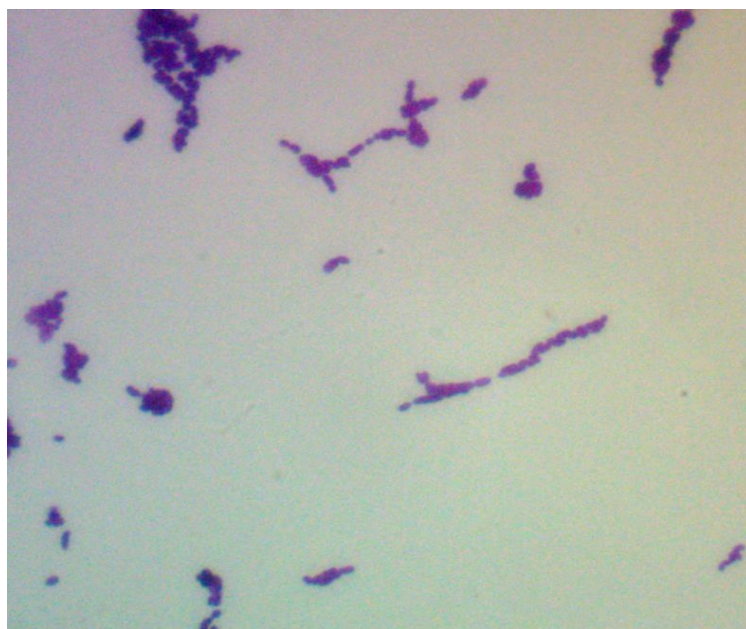
2.2 CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS LÁCTICAS

A fermentação de bactérias lácticas no leite aproveita a lactose, permitindo a produção predominante de ácido láctico o componente principal, além de compostos secundários que desempenham um papel valioso na melhoria das características sensoriais e da textura do produto (SOUZA, et al., 2022).

2.2.1 Cultura tradicional

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes são *S. thermophilus* tem morfologia de cocos, geralmente dispostos em uma cadeia curta como mostra a figura 5. É uma bactéria do gênero *Streptococcus* e é conhecida por sua alta capacidade de crescimento em temperaturas entre 37 e 45°C. Esse microrganismo desempenha um papel fundamental na acidificação do leite, produzindo ácido láctico (MARKAKIOU et al., 2020)

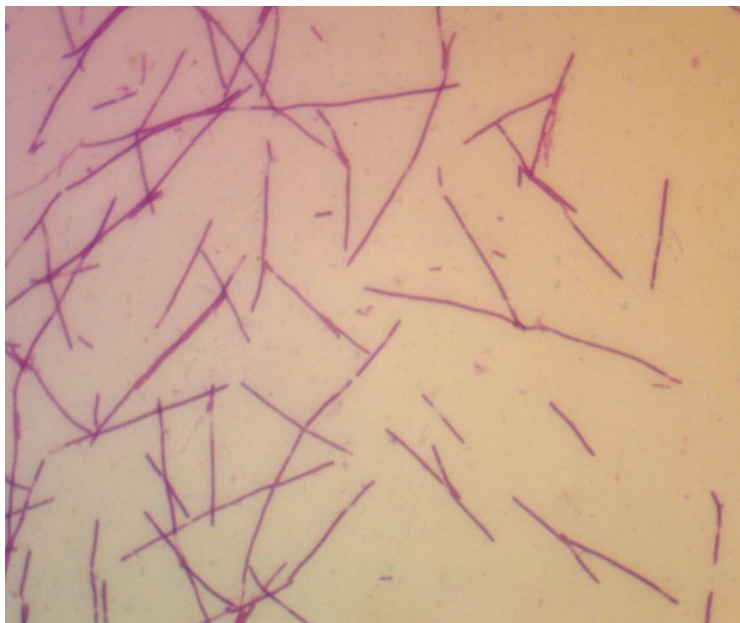
Figura 5 - Imagem de microscopia ótica de bactérias lácticas *S. thermophilus* aumentada



Fonte: Elaborada pela Autora

Já se tratando das características dos *L. bulgaricus* são pequenos bastonetes, unidos por longas cadeias, como pode ser observado na figura 6. É uma bactéria do gênero *Lactobacillus* e é conhecida por suas propriedades acidificantes e contribuição para a textura e sabor do iogurte (SOUZA, et al. 2022).

Figura 6 - Imagem de microscopia ótica de *L. bulgaricus* aumentada



Fonte: Elaborada pela Autora

2.2.2 Fermento YOFLEX® MILD 1.0

O fermento YOFLEX® MILD 1.0 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) é uma cultura bacteriana específica utilizada na produção de iogurtes e produtos lácteos fermentados. Geralmente, essas culturas consistem em duas cepas bacterianas principais: *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Essas cepas bacterianas trabalham em conjunto durante o processo de fermentação para transformar a lactose (açúcar do leite) em ácido láctico, o que resulta na coagulação do leite e na formação do iogurte.

Essa cepa é reconhecida por sua capacidade em proporcionar um sabor suave e delicado ao iogurte, sendo uma característica desejável em algumas variedades do produto. O termo '1.0' na denominação pode indicar a concentração da cepa ou uma versão específica dessa cultura

2.2.3 Fermento YOFLEX® ACIDIFIX®

O fermento YOFLEX® ACIDIFIX®™ (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) é uma inovação patenteada, uma cultura bacteriana específica projetada para converter a sacarose em ácido láctico durante o processo de fermentação. Esta cultura é usada na produção de iogurtes, bebidas lácteas e outros produtos lácteos ou não lácteos fermentados que contenham sacarose como fonte de açúcar.

A capacidade de converter a sacarose em ácido láctico é uma característica importante dessa cultura, pois permite a produção de produtos lácteos com sabor e textura específicos, além de conferir uma estabilidade de pH durante toda a vida útil, mantendo um sabor consistente garantindo o iogurte tenha sempre o sabor pretendido.

Portanto, o YOFLEX® ACIDIFIX® desempenha um papel fundamental na fermentação desses produtos, ajudando a transformar a sacarose em ácido láctico, o que contribui para as características sensoriais.

2.2.3.1 Metabolismo de carboidratos

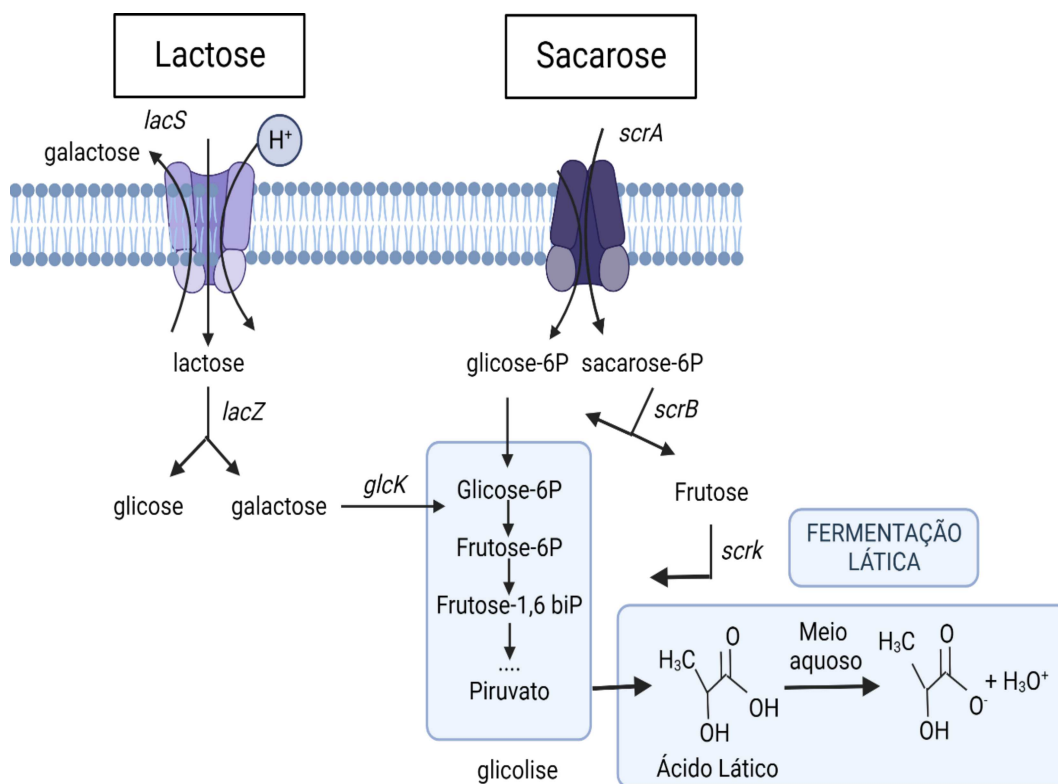
O metabolismo de carboidratos em iogurtes é um processo fundamental que envolve a fermentação láctica por bactérias lácticas, como *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Essas bactérias convertem os carboidratos presentes no leite, principalmente a lactose, em produtos finais, como ácido láctico. (CUI et al., 2016 e HOLS et al., 2005). De fato, a lactose é o açúcar preferido para o crescimento, enquanto o metabolismo de outros carboidratos como sacarose são dependentes da cepa de *S. thermophilus* utilizada que regenera NAD para glicólise principalmente através da formação de lactato (metabolismo homofermentativo), mostrando flexibilidade metabólica (MESTRADO PASTINK, et al., 2009).

Através da figura 7, podemos analisar que as bactérias lácticas, *S. thermophilus* apresentam um sistema exclusivo de absorção de lactose, conhecido como LacS é um antiportador de lactose-galactose, mas também atua como um transportador de lactose/galactose. Após a captação e clivagem de lactose pela enzima β -galactosidase (LacZ) a glicose resultante é utilizada na primeira via fermentativa (processo de glicólise) conhecida como glicólise, gerando energia e ácido pirúvico como produtos (CUI et al., 2016; ISKANDAR et al., 2019; TORRAH et

al., 2018) Em seguida, o ácido pirúvico participa da segunda via fermentativa (produção da molécula de piruvato, através da oxidação dos açúcares), gerando o NADH. Deste modo, o piruvato recebe os H^+ provenientes do NADH, e é transformado em ácido láctico. Esse ácido láctico, ao se dissolver no meio aquoso, libera íons H^+ resultando na redução do pH do meio e consequentemente, acidificando o leite (LUVISSUTO, 2014).

As bactérias lácticas, como *S. thermophilus*, têm um sistema especial de absorção de sacarose. Este sistema funciona como um antiportador de sacarose-frutose e também atua como um transportador de sacarose/frutose. Após a captação e quebra da sacarose pela enzima sacarase, a frutose resultante é direcionada para a primeira via fermentativa, chamada de glicólise, onde segue o fluxo semelhante ao da lactose (MARKAKIU et al., 2020).

Figura 7 - Representação esquemática de características do metabolismo de *S. thermophilus*, incluindo: lactose e sacarose



Legenda: *lacS*, lactase; *ScrA*, sacarase; *Glicose-6P*, glicose-6-fosfato; *Frutose-6P*, glicose-6-fosfato; *frutose-1,6 biP*, glicose-1,6-bifosfato; *Sacarose-6P*, sacarose-6-fosfato.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

2.3 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS OBRIGATÓRIOS E REQUISITOS

No que diz respeito à contagem de microrganismos específicos para a regulamentação dos produtos categorizados com iogurte no contexto da legislação brasileira, Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA nº 46 de 2011, estabelece que em iogurtes a contagem de bactérias lácticas totais presentes em iogurtes, como produto final devem apresentar no mínimo a concentração de 10^{17} UFC/g. Parâmetros físico-químicos como pH e acidez, são aspectos críticos, pois tem importante contribuição para sua coagulação, desenvolvimento dos microrganismos e vida útil (SOUZA et. al., 2022). Pode-se observar a contagem de microrganismos específicos e os parâmetros físico-químicos na Tabela 1.

Tabela 1 - Requisitos técnicos para iogurtes	
Contagem de microrganismos específicos	
Norma FIL 117 A:1988	
Contagem de bactérias lácticas totais	Mín. 10^7 (UFC/ g)
Requisitos físico-químicos	
Norma FIL:150 A:1991	
Acidez	0,6 a 1,5 (g de ácido láctico/100 g)
Classificação matéria gorda	
Norma FIL:116 A:1987	
Com creme	mín. de 6,0 g/100 g
Integrais	mín. de 3,0 g a 5,9 g/100 g
Parcialmente desnatados	máx. de 0,6 a 2,9 g/100 g
Desnatados	máx. de 0,5 g/100 g

Fonte: Adaptado Brasil (2007)

3 OBJETIVOS

Este estudo visa produzir iogurtes a partir de fermentos lácticos comerciais fermentadores de lactose ou sacarose e caracterizá-los quanto à pH e acidez, e contagem de bactérias lácticas totais utilizando diferentes meios de cultivo e suplementações com carboidratos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o pH e acidez dos iogurtes produzidos com diferentes fermentos lácticos (YOFLEX® MILD 1.0 e YOFLEX® ACIDIFIX®) nos dias 1, 7, 14, 30 e 50.
- Produzir iogurtes em escala laboratorial com diferentes fermentos lácticos (fermentador de lactose - YOFLEX® MILD 1.0 e fermentador de sacarose - YOFLEX® ACIDIFIX®).
- Realizar a contagem de bactérias lácticas totais nas amostras de iogurtes produzidas, seguindo as diretrizes estabelecidas na norma ISO 7889 IDF 117.
- Realizar comparação dos diferentes fermentos lácticos (YOFLEX® MILD 1.0 e YOFLEX® ACIDIFIX®) a fim de verificar as alterações na contagem de bactérias lácticas, incluindo *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, na constituição do iogurte.
- Avaliar a contagem de *S. thermophilus* em iogurtes produzidos com fermento A e B utilizando diferentes marcas de meio de cultura.
- Comparar a contagem de *S. thermophilus* dos iogurtes produzidos em meios de cultivo suplementados com sacarose ou lactose em dois períodos de armazenamento (1 e 50 dias).
- Avaliar a influência de variações na concentração de lactose na suplementação de meios de cultivo sobre a contagem de *S. thermophilus* presentes nos iogurtes. Analisar o impacto no crescimento de bactérias lácticas nos meios de cultura Biokar e Merck sem suplementação de lactose (0% m/v).
- Isolar e confirmar as espécies de bactérias lácticas presentes nos iogurtes por meios de sequenciamento de gene 16 S rDNA..

4 METODOLOGIA

Nas próximas seções, será descrito de forma detalhada do processo de produção de iogurtes por meio de fermentação de lactose e sacarose por microrganismos. Posteriormente, serão descritas as técnicas empregadas para realizar a contagem total de bactérias lácticas. Além disso, serão conduzidas análises comparativas entre esses microrganismos para confirmar sua classificação dentro da mesma espécie.

4.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE AMOSTRAS DE LEITE

As análises foram conduzidas tanto no leite desnatado quanto na mistura composta por creme de leite e leite desnatado em pó. A composição do leite desnatado e da mistura, foram determinadas a partir dos atributos de gordura, proteína e lactose, utilizando o Ekomilk M Analisador de Leite Ultrassônico Portátil (Cap-Lab®). A densidade foi determinada pelo termolactodensímetro e a determinação do extrato seco total foi obtida através da fórmula de Fleishmann mostrada na equação 1.

$$\% \text{ extrato seco} = 1,2 G + 2,665 \times \frac{(D-1)}{D} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

- D = densidade em g/mL.
- G = % (m/m) gordura.

A acidez titulável foi realizada pela metodologia descrita pela AOAC (947.05) e análise do pH pelo pHmetro de bancada (GEHAKA®), modelo PG 1400. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2 CULTURAS MICROBIANAS

Foram utilizadas nas produções dos iogurtes dois estirpes de culturas puras iniciadoras comerciais (Chr. Hansen Holding A/S, Hoersholm, Denmark): YOFLEX® Mild 1.0 e YOFLEX® ACIDIFIX™. A linha de cultura YOFLEX® é uma série de

culturas altamente concentradas especificamente desenvolvidas para aplicações termofílicas em leites fermentados.

4.2.1 Preparação do inóculo

Na produção dos iogurtes, o processo foi conduzido por meio da incorporação de duas culturas iniciadoras distintas composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Dois fermentos foram empregados nesse processo: o YOFLEX® MILD 1.0, cujo processo fermentativo tem a lactose como seu substrato principal, e o YOFLEX® ACIDIFIX®, cuja fermentação é realizada a partir da sacarose.

4.3 PREPARAÇÃO DO IOGURTE

Foram preparadas duas formulações distintas de iogurte, cuja composição é apresentada na Tabela 2. As misturas foram feitas em cubas de inox com capacidade de 900 g.

Tabela 2- Formulações dos iogurtes

INGREDIENTES	YOFLEX® MILD 1.0		YOFLEX® ACIDIFIX™	
	(%)	Massa (g)	(%)	Massa (g)
Leite desnatado *	81,50	733,5	79,75	717,8
Creme de leite (35%) **	7,50	67,5	7,50	67,5
Leite em pó desnatado***	3,00	27,0	3,10	27,9
Açúcar	8,00	72,0	0,85	7,7
Xarope de açúcar (71 ° Brix)	0,00	0	8,80	79,2
Cultivo	0,02	-	0,2	-
TOTAL	100	900	100	900

Formulações dos iogurtes

* Leite pasteurizado desnatado (Da Fazenda)

** Creme de leite pasteurizado 35% (m/m) (Coalhadas)

*** Leite em pó desnatado (Piracanjuba)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Dessa forma, foram elaboradas quatro amostras de diferentes lotes (A, B, C e D) do leite para cada teste de iogurte, as quais foram identificadas como formulação controle (FC) e formulação teste (FT), seguindo o arranjo apresentado na Tabela 3. No contexto das formulações FC utilizou-se as composições detalhadas na Tabela 2, empregando o fermento YOFLEX® MILD 1.0. Adicionalmente, as formulações FT foram preparadas com a inoculação do fermento YOFLEX® ACIDIFIX®.

Tabela 3 - Esquema detalhado de identificação atribuído aos lotes e tratamentos das formulações de iogurte.

Tratamento/Lote	A	B	C	D
FC*	FCA	FCB	FCC	FCD
FT**	FTA	FTB	FTC	FTD

* FC: Formulação controle com fermento YOFLEX® MILD 1.0

** FT: Formulação teste com fermento YOFLEX® ACIDIFIX®

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Formulações controle e teste foram submetidas a um processo de solubilização a 25 ± 1 °C por 60 minutos, utilizando um sistema de banho-maria equipado com agitadores automáticos para garantir a completa uniformização dos componentes. As amostras foram submetidas ao processo de homogeneização de 200 bar em dois estágios (primeiro estágio 50, segundo estágio 150 bar), a uma temperatura de 65 ± 1 °C. Posteriormente foram tratadas termicamente a 90 ± 1 °C durante 5 minutos em equipamento de banho-maria (QUIMIS®, Modelo Q334M-28, local). Após o tratamento térmico amostras foram resfriadas e fermentadas a 42 ± 1 °C até atingir o pH 4,6.

Na sequência, as amostras foram submetidas a um processo de resfriamento gradual até alcançarem a temperatura de 20 ± 1 °C, com o auxílio de um refrigerador mantido a 7 ± 1 °C. Uma vez atingida a temperatura desejada, o próximo passo envolveu a quebra do gel formado durante a fermentação. Essa etapa foi realizada manualmente por meio de movimentos circulares executados ao longo de 20 segundos. O esquema da Figura 8 mostra todo o processo de produção dos iogurtes.

Figura 8 -Esquema da produção de iogurte.

Mistura dos ingredientes: Leite desnatado + Creme de leite 35% m/m + Leite em pó desnatado (sem adição de açúcar e xarope de açúcar) 60 min / 25 °C	
Formulações Controle Adição de sacarose (8,0%) FCA, FCB, FCC, FCD	Formulações Teste Adição de sacarose (0,85%) FTA, FTB, FTC, FTD
Pré- Aquecimento 65 ± 1 °C	
Homogeneização 200 bar (2 estágios)	
Tratamento térmico 93 ± 1 °C por 5 minutos	
Resfriamento 42 ± 1 °C	
Adição da cultura iniciadora YOFLEX® MILD 1.0 <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	Adição da cultura iniciadora YOFLEX® ACIDIFIX™ <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> e <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>
Fermentação até pH 4,6 42 ± 1 °C	
Resfriamento / Quebra do gel 16 – 20 °C	
Adição do xarope de açúcar* Xarope de açúcar (71 °Brix)	
Envase, resfriamento e estocagem 7 ± 2 °C	

*Adição do xarope de açúcar apenas nas formulações teste
 Fonte: Elaborada pela autora (2023)

4.3.1 Curva de fermentação

O monitoramento da acidificação, foi determinado a cada hora através da medição de pH pelo eletrodo de bancada (PG 1400, GEHAKA®).

4.4 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA UTILIZADOS NAS ANÁLISES COMPARATIVAS

Os padrões de meios de cultura aceitos pela Federação Internacional de Laticínios para enumeração diferencial das espécies de iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, são ágar M17 e MRS, respectivamente (boletim IDF, 1983).

4.4.1 Preparo do meio de cultura M17 para contagem de *Streptococcus thermophilus*

O meio de cultura M17, seletivo para *S. thermophilus*, foi preparado conforme a rotulagem e seu pH ajustado para 6,8 (ISO 7889 IDF 117). Em seguida, o meio M17 foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A Tabela 4 mostra a composição de cada meio de cultura utilizado nas análises comparativas deste estudo.

Tabela 4 - Composição dos meios de culturas M17

Composição	M17		
	Biokar® concentração (g/L)	Merck® concentração (g/L)	Oxoid® Concentração (g/L)
Triptona	2,5	2,5	5,0
Digestão péptica de carne	2,5	2,5	-
Farelo de soja	5,0	5,0	5,0
Extrato de levedura	2,5	2,5	2,5
Extrato de carne	5,0	5,0	5,0
Lactose	5,0	5,0	-
Glicerofosfato de sódio	19,0	19,0	19,0
Sulfato de magnésio	0,2	0,2	0,2
Ácido ascórbico	0,5	0,5	0,5
Ágar – Ágar	15,0	12,7	11,0

Fonte: Adaptação das fichas técnica dos meios de cultura M17 das marcas Biokar, Merck e Oxoid

A suplementação com lactose a 10% (m/v) no meio de cultura M17 foi realizada de forma independente, passando por esterilização separadamente antes de ser incorporada ao respectivo meio de cultura. Foi realizada uma adaptação da ISO 7889 IDF 117 em que foi implementada a suplementação com sacarose a 10% (m/v). O método de preparo para ambas as suplementações foi semelhante, consistindo na dissolução de 10 g de lactose ou sacarose em 100 mL de água destilada.

4.4.2 Preparo meio de cultura MRS para contagem de *Lactobacillus bulgaricus*

O meio de cultura MRS, seletivo para *L. bulgaricus*, foi preparado conforme a rotulagem e seu pH ajustado para 6,5 (ISO 7889 IDF 117). Em seguida, o meio M17 foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. A tabela 4 mostra a composição de cada meio de cultura utilizado nas análises comparativas deste estudo.

4.4.3 Preparo do diluente

Partiu-se de uma solução 0,2% m/v de fosfato dipotássio (K_2HPO_4). Em seguida, procedeu-se à esterilização do diluente a 121°C por 15 minutos.

4.5 ANÁLISES DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS TOTAIS

Para as seções seguintes foram realizadas análises de contagem de bactérias lácticas totais em amostras de iogurtes, seguindo as diretrizes estabelecidas na norma ISO 7889 IDF.

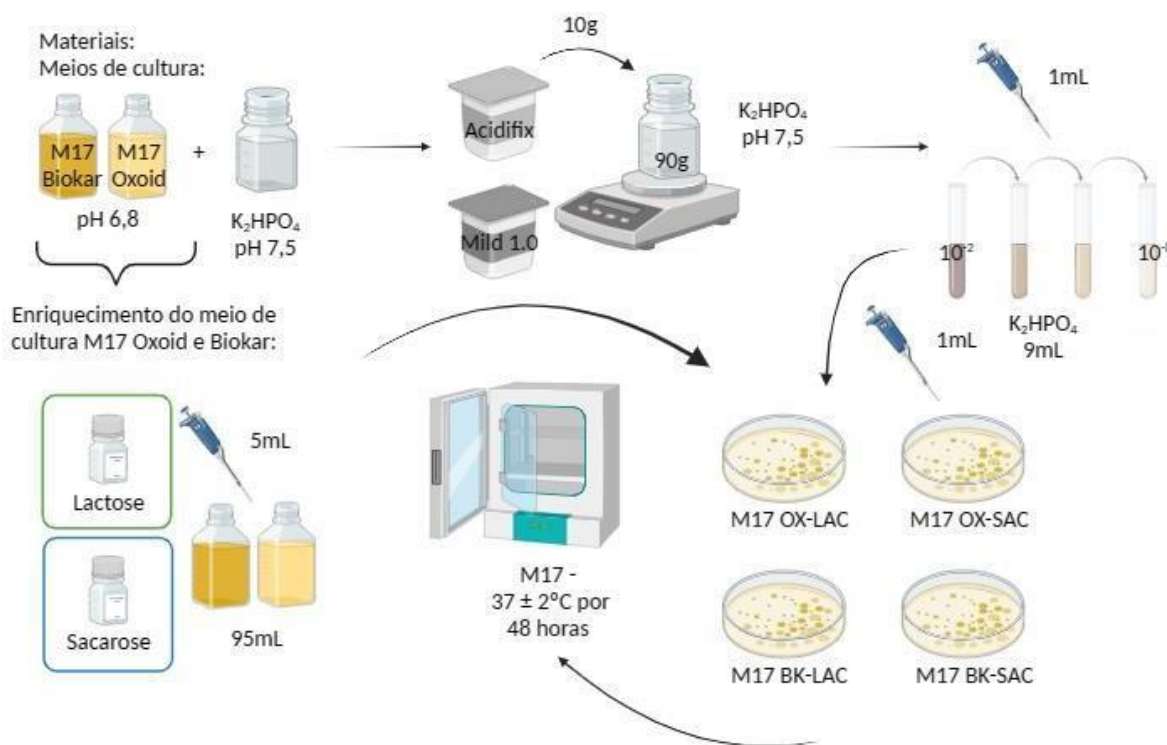
4.5.1 Avaliação da contagem de *S. thermophilus* em meio de cultura M17 no dia 1 (D1) de *shelf-life*.

Pesou-se 10 g das amostras de iogurtes (FC e FT) no D1 de fabricação em um frasco com 90 mL de diluente (10^{-1} g/L). Realizou-se diluições seriadas a partir de 1 mL da solução 10^{-1} até a atingir a solução 10^{-8} .

Transferiu-se 1 mL das diferentes diluições preparadas para as placas de Petri e distribuiu-se os meios de cultura (Biokar e Oxoid) suplementados com lactose ou sacarose, conforme pode ser observado na Figura 9.

As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 48 horas em aerobiose para permitir o crescimento dos *S. thermophilus*. Após a incubação, realizou-se a contagem das colônias nas placas para determinar unidade formadora de colônia por grama (UFC/g) nas amostras.

Figura 9 - Representação esquemática da análise de *S. thermophilus* em meios de cultura M17 suplementados com lactose ou sacarose no D1



Legenda: M17 OX-LAC, M17 Oxoid suplementado com lactose; M17 OX-SAC, M17 Oxoid suplementado com sacarose; M17 BK-LAC, M17 Biokar suplementado com lactose; M17 BK-SAC, M17 Biokar suplementado com sacarose.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.5.2 Avaliação da contagem de *L. bulgaricus* em meio de cultura MRS no dia 1 (D1).

Pesou-se 10 g das amostras de iogurtes (FC e FT) no D1 de fabricação em um frasco com 90 mL de diluente (10^{-1} g/L). Realizou-se diluições seriadas a partir de 1 mL da solução 10^{-1} até a atingir a solução 10^{-5} .

Transferiu-se 1 mL das diferentes diluições preparadas para as placas de Petri e distribui-se os meios de cultura MRS. Em seguida, as placas foram incubadas em ambiente anaeróbico a uma temperatura de 37 ± 2 °C para o crescimento, por um período de 72 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem de colônias.

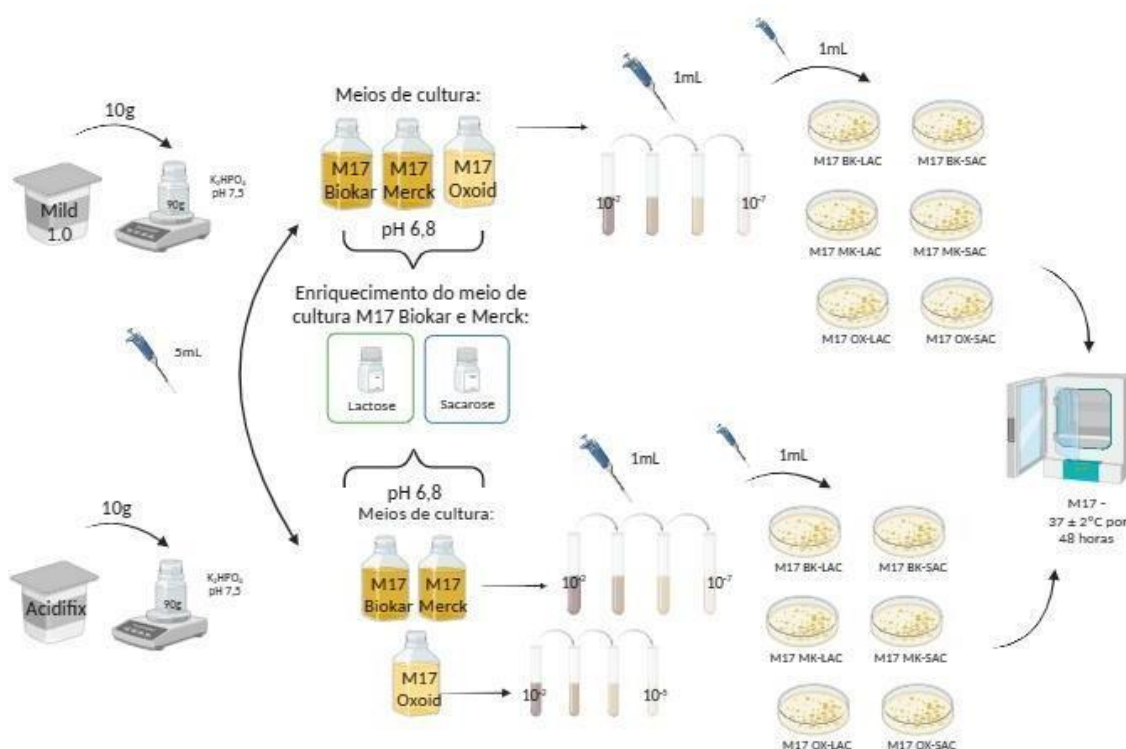
4.5.3 Avaliação da contagem de *S. thermophilus* em meio de cultura M17 no dia 50 (D50) de *shelf-life*.

Pesou-se 10 g das amostras de iogurtes (FC e FT) no D1 e D50 de fabricação em um frasco com 90 mL de diluente (10^{-1} g/L). Realizou-se diluições seriadas a partir de 1 mL da solução 10^{-1} g/L até a atingir a solução 10^{-8} g/L.

Transferiu-se 1 mL das diferentes diluições preparadas para as placas de Petri e distribui-se os meios de cultura (Biokar, Oxoid e Merck) suplementados com lactose ou sacarose, conforme podemos observar na figura 10.

As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 48 horas para permitir o crescimento dos *S. thermophilus*. Após a incubação, realizou-se a contagem das colônias nas placas para determinar unidade formadora de colônia por grama (UFC/g) nas amostras.

Figura 10 - Representação esquemática da análise de *S. thermophilus* em meios de cultura M17 suplementados com lactose ou sacarose no D1 e D50



Legenda: M17 BK-LAC, M17 Biokar suplementado com lactose; M17 BK-SAC, M17 Biokar suplementado com sacarose. M17 MK-LAC, M17 Merck suplementado com lactose; M17 MK-SAC, M17 Merck suplementado com sacarose. M17 OX-LAC, M17 Oxoid suplementado com sacarose; M17 OX-SAC, M17 Oxoid suplementado com sacarose.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.5.4 Avaliação da contagem de *S. thermophilus* em meio de cultura M17 com diferentes concentrações de lactose no dia D1 de *shelf-life*.

Pesou-se 10 g das amostras de iogurtes (FC e FT) no D1 de fabricação em um frasco com 90 mL de diluente (10^{-1} g/L). Realizou-se diluições seriadas a partir de 1 mL da solução 10^{-1} até a atingir a solução 10^{-8} .

Transferiu-se 1 mL das diferentes diluições preparadas para as placas de Petri e distribuiu-se os meios de cultura M17 (Biokar, Oxoid e Merck) suplementados com diferentes teores de lactose conforme apresentado na Tabela 5 e podemos observar o esquema na Figura 11.

As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 48 horas para permitir o crescimento dos *S. thermophilus*. Após a incubação, realizou-se a contagem das

colônias nas placas para determinar unidade formadora de colônia por grama (UFC/g) nas amostras.

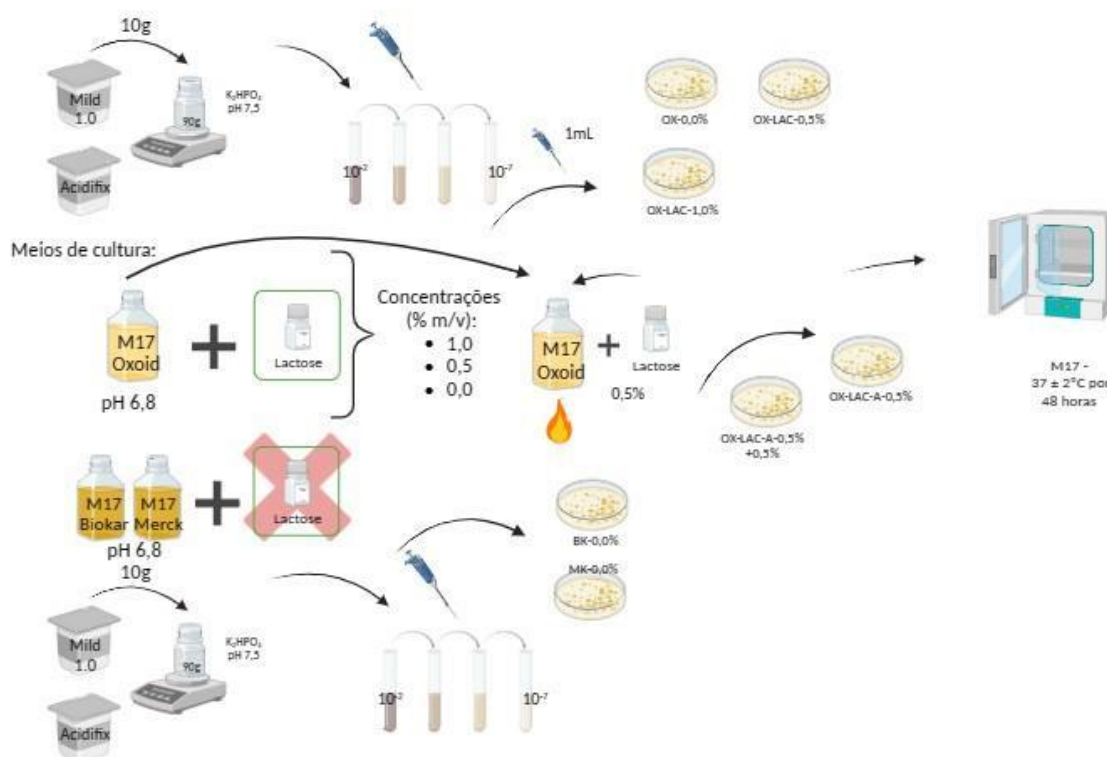
Tabela 5 - Preparo das concentrações de lactose utilizadas para suplementar o meio de cultura M17 Oxoid

Concentração de Lactose	(% m/v)	Oxoid	Merck	Biokar
	0	S*	S	S
0,5	S	N*	N	
1,0	S	N	N	
0,5 A + 0,5*	S	N	N	
0,5 A*	S	N	N	

Legenda: S: Suplementado; N: Não suplementado; 0,5 % A + 0,5 %: Suplementação antes e após o aquecimento; 0,5% A: Suplementação antes do aquecimento

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Figura 11 - Representação esquemática da análise de *S. thermophilus* em meios de cultura M17 suplementados com diferentes concentrações de lactose no D1



Legenda: OX-0,0%, Oxoid sem suplementação de lactose; OX-LAC-0,5%, Oxoid com suplementação de 0,5% (m/v) de lactose; OX-LAC-1,0%, Oxoid com suplementação de 1,0% (m/v) de lactose; OX-LAC-A-0,5%+0,5%: Suplementação antes e após o aquecimento; OX-LAC-A-0,5%: Suplementação antes do aquecimento

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.6 VERIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS

Amostra de interesse (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus* de diferentes meios de cultura M17 (Biokar, Merck e Oxoid) com diferentes suplementações de carboidrato (lactose e sacarose)) foram coletadas para a avaliação da morfologia das colônias,

Pesou-se 10 g das amostras de iogurtes (FC e FT) no D1 de fabricação em um frasco com 90 mL de diluente (10^{-1} g/L). Realizou-se diluições seriadas a partir de 1 mL da solução 10^{-1} g/L até a atingir a solução 10^{-7} g/L.

Transferiu-se 0,1 mL das diferentes diluições preparadas para as placas de Petri contendo os meios de cultura M17 (Biokar, Oxoid e Merck) suplementados com diferentes teores de lactose e/ou MRS já solidificados. A amostra foi espalhada na superfície do meio com o auxílio de uma alça de *Drigalski*.

As placas de Petri foram incubas em condições apropriadas para o crescimento *S. thermophilus* M17 (Biokar, Merck e Oxoid), a temperatura de incubação foi mantida em torno de 37 ± 2 °C em um período de incubação de 48 horas. E no caso do *L. bulgaricus*, as placas de Petri foram submetidas a anaerobiose e foram incubas a uma temperatura de 37 ± 2 °C por 72 horas. Após o período de incubação, foram observados critérios como tamanho, formato e cor. Posteriormente foram feitas fotografias para documentar o registro visual.

4.7 CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM

Para realizar a coloração de Gram, colônias das culturas bacterianas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram cuidadosamente transferidas para uma lâmina de vidro. Em seguida, as amostras foram espalhadas de maneira uniforme sobre a superfície da lâmina, criando assim um esfregaço fino e homogêneo. Esse esfregaço foi posteriormente deixado para secar completamente, utilizando uma fonte de calor suave.

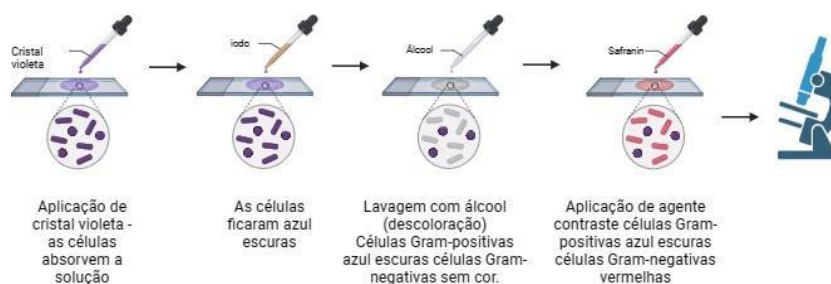
Após a secagem adequada, o esfregaço foi submetido ao processo de coloração de Gram (Figura 12). Inicialmente, o esfregaço foi coberto com o corante cristal violeta por aproximadamente 1 minuto. Após esse período, a lâmina foi submetida a um enxague suave em água corrente para remover o excesso de corante. O esfregaço foi tratado com a solução de Lugol (solução de 5% de iodo

inorgânico) por aproximadamente 1 minuto, seguido por um enxágue adicional com água, com o intuito de remover o excesso de iodo.

Para a etapa de descoloração da lâmina, utilizou-se uma mistura de álcool etílico com acetona, na proporção de 1:1 e, e em seguida foi cuidadosamente gotejado sobre o esfregaço até remoção completa do resíduo de corante, por um período de 15 a 30 segundos. Após esta etapa, foi feito um enxágue em água corrente para interromper a ação da solução.

Posteriormente, o esfregaço foi coberto com corante Safranina por cerca de 1 minuto. Por fim, houve um enxágue com água corrente e o esfregaço foi delicadamente secado. O esfregaço preparado foi então colocado sob um microscópio ótico para possibilitar a observação detalhada das bactérias e sua classificação de acordo com a sua coloração.

Figura 12 - Representação esquemática da análise de coloração de Gram



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.8 CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16 S RDNA

A confirmação de DNA das bactérias lácticas totais foi realizada utilizando o ensaio DMD BACTÉRIA, na região V1-V9 do gene 16S rDNA. Vale destacar que as análises foram realizadas pela empresa Neoprospecta Microbiome Technologies, localizada em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

4.8.1 CONFIRMAÇÃO DE DNA

A identificação das bactérias (gene 16S rRNA) foi realizada usando um método de sequenciamento de DNA de alto desempenho utilizando o Sistema de Sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). A preparação da biblioteca e o sequenciamento de DNA seguiram o protocolo da Neopropecta Microbiome Technologies (VIEIRA et al, 2019), Brasil. A amplificação com iniciadores para a região V1-V9 do gene rRNA 16S de *Streptococcus thermophilus* utilizando como primers iniciador Forward (F): 27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e o Iniciador Reverse (R): 1492R-5'-GGTTACCTTGTGTTACGACTT-3 (FELIS, et al. 2007) foi realizada para as bactérias. As sequências foram analisadas pelo pipeline Sentinel. No pipeline Sentinel, os arquivos fastQ foram avaliados quanto à qualidade Phred (QP) usando o software FastQC v.0.11.8 (VIEIRA et al, 2019). As análises foram realizadas em quadruplicatas.

É fundamental ressaltar que os resultados dos testes de DNA forneceram confirmação de que as bactérias identificadas no presente estudo são, de fato pertencentes às espécies *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus sp.*

4.8.2 Preparo dos isolados para análise de DNA

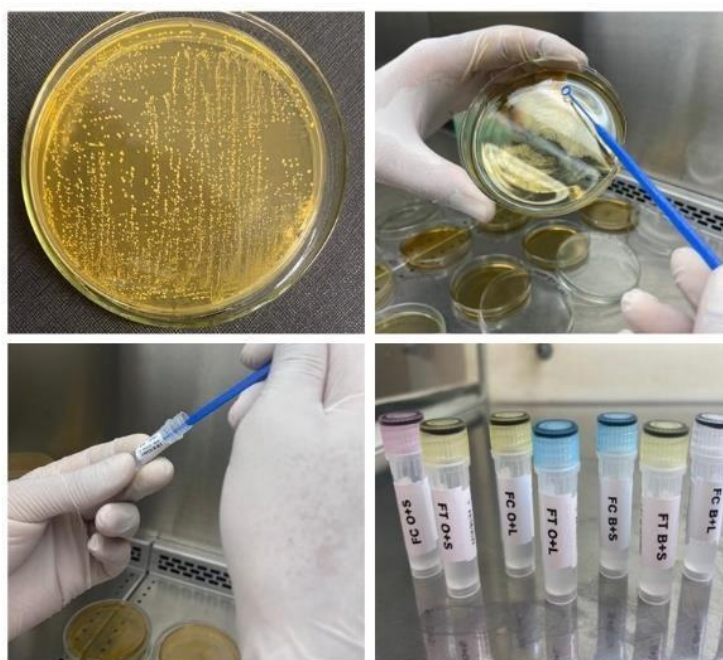
Inicialmente, procedeu-se a seleção de colônias provenientes de placas contendo diferentes meios de cultura M17 (Biokar, Merck e Oxoid) para identificação dos *S. thermophilus* e, MRS para identificação dos *L. bulgaricus* obtidas a partir de dois distintos iogurtes fermentados pelas culturas bacterianas YOFLEX® MILD 1.0 e YOFLEX® ACIDIFIX®.

Foi utilizado uma alça de inoculação esterilizada para a colônia desejada e transferiu-se a mesma para um tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido. O meio escolhido foi M17 Biokar suplementado com lactose, devido a sua melhor resposta ao crescimento. A partir disso, foi então colocado os tubos de ensaios em uma incubadora nas condições adequadas de temperaturas para o crescimento dos microrganismos.

Para preparar a cultura para a análise de DNA, foi alçada uma única colônia da cultura pura e transferida para uma placa de Petri contendo o mesmo meio de

cultura. Após esta etapa, a placa de Petri com a colônia isolada foi incubada a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para multiplicação do microrganismo. Após essa extração, como mostra a figura 13. O DNA foi enviado para análise, de sequenciamento de acordo com os protocolos da empresa de análise contratada.

Figura 13 - Fotografias do processo de isolamento para envio das colônias para as análises de DNA



Fonte: Acervo pessoal da autora (2023)

4.9 DETERMINAÇÃO DO PH E ACIDEZ TITULÁVEL NOS IOGURTES

O nível de acidez titulável e o valor de pH foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 30 e 50 dias após a fabricação do iogurte, e essas análises foram conduzidas em duplicata. O pH foi determinado utilizando um medidor de pH (PG 1400, GEHAKA®), enquanto a acidez titulável foi quantificada por meio do método potenciométrico em conformidade com a norma ISO/TS 11869:2012.

4.10 ANÁLISE DE ESTATÍSTICA

O software R (versão 4.2.1) foi usado para o teste de Tukey e software GraphPad Prims 9 foi utilizado para o tratamento estatístico de ANOVA e teste t pareado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas próximas seções, abordar-se-á os resultados relacionados à quantificação e caracterização das bactérias lácticas totais *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em iogurtes submetidos a diferentes fermentações.

5.1. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE DESNATADO E DA MISTURA DA FORMULAÇÃO

A composição e o balanço de massa das bases utilizadas na produção de iogurte são apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os resultados demonstram que a quantidade adicionada de leite em pó desnatado e gordura ao leite desnatado para o preparo das formulações teve um impacto significativo no teor sólidos totais (% m/m) que foi de aproximadamente 9,38% m/m para 13,94% m/m, já o teor de proteína foi de 3,20% m/m para 4,27 % m/m e quanto ao teor de matéria gorda de 0,23% m/m para aproximadamente 4,00% m/m.

Tabela 6 - Análise composicional, pH e acidez dos leites desnatado de diferentes lotes

Lote	pH	Acidez (% ácido lático.mL ⁻¹)	Densidade ⁻³	Gordura (% m/m)	Proteína (% m/m)	Lactose (% m/m)	Sólidos totais (% m/m)
LEITE DESNATADO							
A	6,77 ± 0,01 ^{a*}	0,12 ± 0,01 ^a	1,033 ± 0,001 ^a	0,23 0,01 ^a	± 3,21 0,02 ^a	± 4,39 0,02 ^a	± 9,38 0,01 ^a
B	6,75 ± 0,04 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	1,033 ± 0,001 ^a	0,23 0,01 ^a	± 3,20 0,01 ^a	± 4,39 0,01 ^a	± 9,38 0,01 ^a
C	6,73 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	1,033 ± 0,001 ^a	0,23 0,01 ^a	± 3,19 0,01 ^a	± 4,40 0,01 ^a	± 9,40 0,02 ^a
D	6,72 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	1,033 ± 0,001 ^a	0,23 0,01 ^a	± 3,20 0,01 ^a	± 4,38 0,01 ^a	± 9,39 0,01 ^a

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna, não difere entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Análise composicional, pH e acidez das misturas (leite desnatado, leite em pó desnatado e creme de leite) de diferentes lotes

Lote	pH	Acidez (% ácido lático. mL ⁻¹)	Densidade ⁻³	Gordura (% m/m)	Proteína (% m/m)	Lactose (% m/m)	Sólidos totais (% m/m)
Mistura (Leite desnatado, leite desnatado em pó, creme)							
A	6,65 ± 0,02 ^{a*}	0,12 ± 0,01 ^a	1,040 ± 0,001 ^a	4,03 0,01 ^a	± 4,25 0,01 ^a	± 5,84 0,01 ^a	± 13,94 ± 0,01 ^a
B	6,64 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	1,040 ± 0,001 ^a	3,96 0,01 ^a	± 4,26 0,01 ^a	± 5,84 0,01 ^a	± 13,91 ± 0,01 ^a
C	6,64 ± 0,02 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	1,039 ± 0,001 ^a	4,00 0,01 ^a	± 4,27 0,01 ^a	± 5,84 0,01 ^a	± 13,94 ± 0,01 ^a
D	6,62 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	1,040 ± 0,001 ^a	3,97 0,01 ^a	± 4,27 0,01 ^a	± 5,87 0,01 ^a	± 13,90 ± 0,01 ^a

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna, não difere entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No Brasil, os iogurtes geralmente não recebem uma classificação específica com base em seu teor proteico, embora o teor mínimo de proteínas lácticas comumente seja de 2,90% m/m (BRASIL, 2012). Em relação ao teor de gordura no extrato seco, iogurtes com valores entre 3,00 e 5,90% m/m são considerados integrais. Logo, o teor de gordura em torno de 4,00% m/m, estando dentro da classificação de iogurte integral.

Para produção de um iogurte com características mais uniforme, é essencial aumentar o teor de matéria seca do leite, o que pode ser alcançado através da adição de 2 a 4% de leite em pó. Quando se adiciona leite em pó na formulação, é importante incorporá-lo na mistura antes do processo de aquecimento. Essas práticas contribuem significativamente para a consistência e sabor do produto final.

Ao considerar o valor de pH e Acidez titulável, os teores encontrados nas Tabelas 6 e 7, estão em conformidade, segundo a Instrução Normativa nº 4, de 23 de outubro de 2007.

5.2. CURVA DE FERMENTAÇÃO DOS IOGURTES PRODUZIDOS

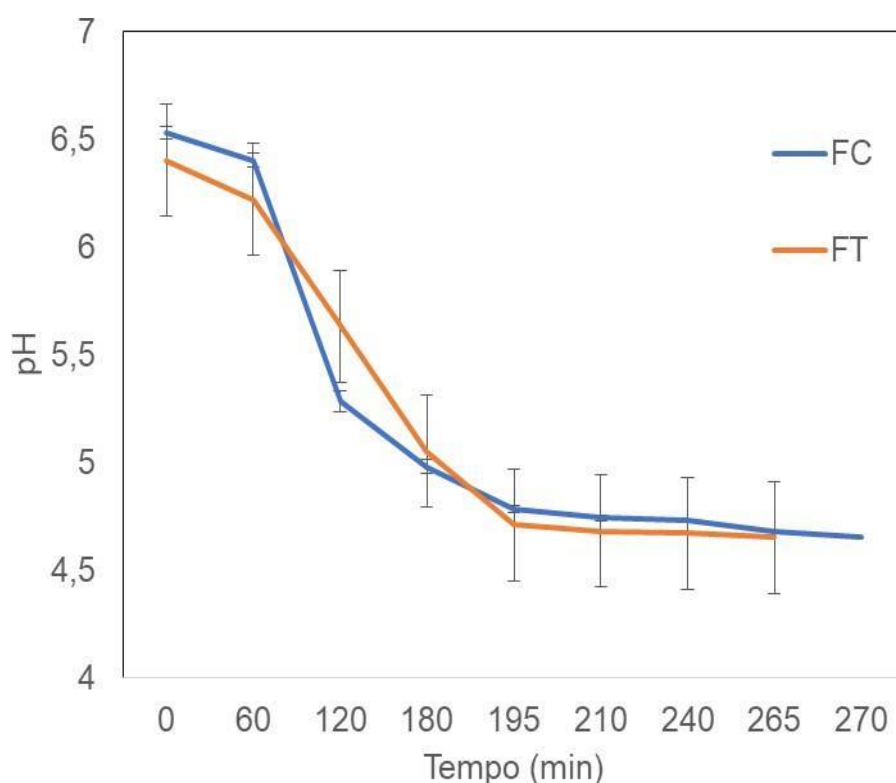
No início da produção de iogurtes, as bactérias lácticas são inoculadas no leite, geralmente, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, à medida que ocorre o processo de fermentação, o pH diminui ocorre o consumo da lactose do meio que é transformado em ácido láctico. (GOMES; CARNEIRO; STEPHANI; CARVALHO *et*

al., 2022). Isso é importante para a coagulação das proteínas do leite e a formação do gel que caracteriza o iogurte (GOMES et al., 2021).

A Figura 14, que demonstra a curva de acidificação, evidencia uma queda do pH ao longo do tempo. A curva atinge o pH em torno de 4,5 a 4,6. Nesse ponto, as proteínas do leite começam a coagular, formando o gel (SILVA et al. 2022).

A curva de acidificação, pH x tempo, é uma representação visual do processo, no qual podemos observar o comportamento na produção de FC (fermentação com lactose) e FT (fermentação com sacarose) foi notavelmente semelhante. Isso contribui para a monitoramento da qualidade do iogurte durante a produção e sugere que a fermentação FC e FT tendem a ter padrões de acidificação comparáveis.

Figura 14 - Curva de acidificação do iogurte fermentado por YOFLEX® MILD 1.0 (FC), e o iogurte fermentado através do YOFLEX® ACIDIFIX®TM (FT) (n = 2)



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

5.3 CONTAGEM *S. thermophilus* NO D1

Os resultados da contagem de bactérias lácticas totais nos iogurtes preparados no D1 estão dispostos na figura 15. Ao observarmos a produção FC todas as amostras atenderam à contagem mínima exigida pela Instrução Normativa do MAPA nº 46 (BRASIL, 2007). No meio de cultura M17 Biokar aplicado para FC e FT, o crescimento de contagem de bactérias atingiu 10^9 UFC/g. O FT mostrou uma média de 10^8 UFC/g. No estudo conduzido por hamid (2009), também foi observado que, após um dia de armazenamento, os valores de contagem bacteriana em iogurte natural atingiram aproximadamente 10^9 UFC/g, utilizando também o meio de cultura M17 da marca Biokar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) reforçando os resultados obtidos nesse estudo. A diferença entre o FC e FT é de um ciclo log, indicando que eles são estatisticamente diferentes, ambos estando acima do limite mínimo de contagem de acordo com a legislação vigente.

Ao analisar o crescimento do FT nos meios de culturas M17 Oxoid ou Biokar usando sacarose como suplemento, não foi observada uma diferença significativa. No entanto, utilizando o meio de cultura M17 Oxoid suplementado de lactose há uma diferença estatisticamente significativa. Quanto ao FC comparamos os meios de cultura M17 Biokar e Oxoid suplementados com lactose ou sacarose, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Foi observado no FT que no meio de cultura M17 Oxoid suplementado com lactose, houve crescimento de algumas colônias isoladas. Já na suplementação com sacarose, o crescimento foi de mais colônias. Esses resultados estão abaixo do limite de contagem estabelecido na legislação, que foi de 10^6 UFC/g.

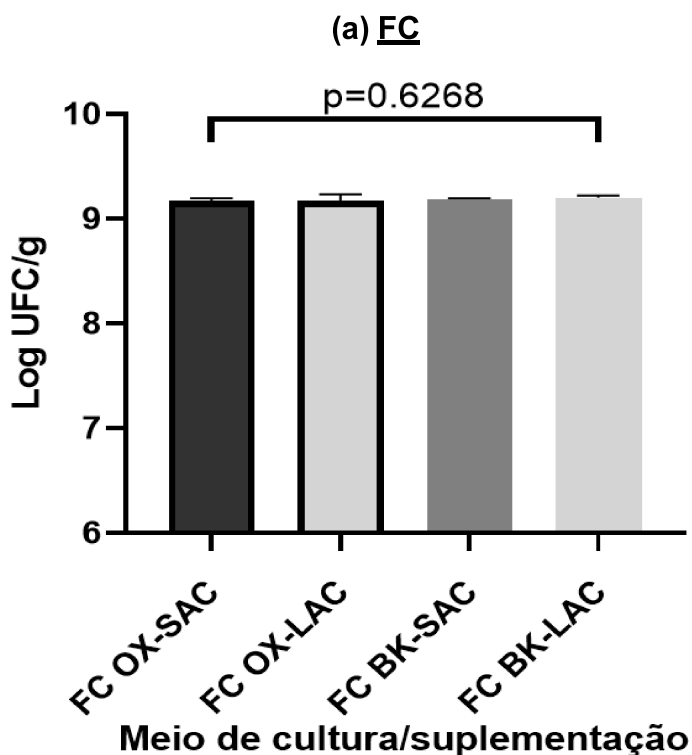
A suplementação de lactose e sacarose no meio de cultura M17 pode ter efeitos diferentes no crescimento dos *S. thermophilus*, uma vez que esses açúcares podem ser utilizados de maneira distinta por essas bactérias lácticas. O *S. thermophilus* é conhecido por utilizar lactose como uma de suas principais fontes de energia. Portanto, a suplementação com lactose pode estimular o crescimento dessas bactérias fornecendo um substrato metabolicamente favorável (GASSER et al., 2022).

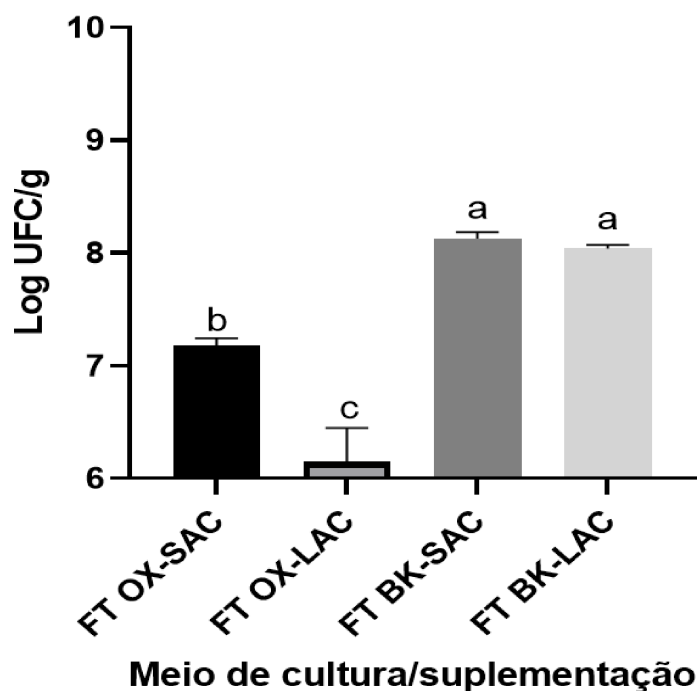
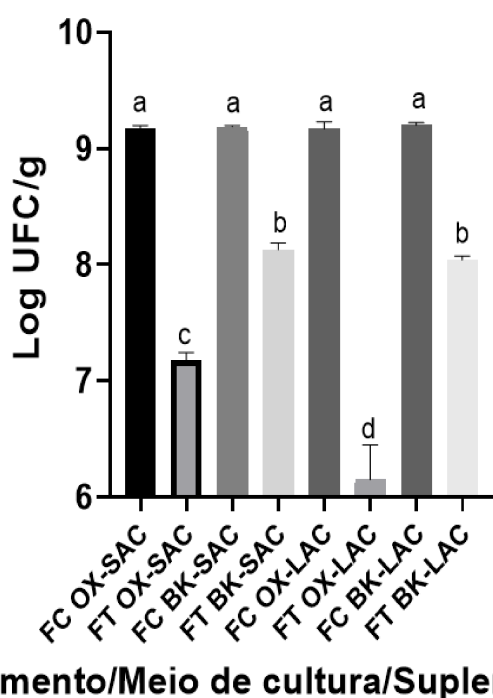
Geralmente essas bactérias lácticas não utilizam sacarose tão eficiente quanto a lactose. A sacarose é um dissacarídeo composto por glicose e frutose e sua metabolização pode ser menos eficaz em comparação à lactose. Então a

suplementação com sacarose pode não fornecer a mesma fonte de energia e substrato que a lactose, o que pode resultar em um crescimento reduzido entre cepas em comparação a lactose (GASSER et al., 2022)

É notável que o FC apresentou um crescimento maior durante a fabricação do iogurte. O FT-OX mostrou uma diferença de quase dois ciclos log em comparação com o FT-BK. Os resultados indicam que o meio de cultura M17 Biokar não apresentou diferença significativa entre lactose e sacarose, enquanto o Oxoid responde de maneira diferente.

Figura 15 - Representação gráfica comparativa das diferentes suplementações de sacarose e lactose nos tratamentos FC e FT, nos meios de cultura M17 Biokar e Oxoid (D1)



(b) FC(c) FC e FT

Legenda: FC: Formulação controle com fermento YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulação teste com fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; FC/FT OX-SAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com sacarose; FC/FT OX-LAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com lactose; FC/FT BK-SAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com sacarose; FC/FT BK-LAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com lactose.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

O meio de cultura M17 é um meio de cultura utilizado para o crescimento e cultivo de bactérias lácticas, como *S. thermophilus*. No entanto, a composição exata do meio pode variar entre fabricantes, incluindo a Oxoid e a Biokar. Portanto, é importante considerar que essas pequenas variações na composição podem afetar o desempenho. Os meios M17 podem variar na fonte e na concentração de nutrientes como observamos na Tabela 4. Existem variações nas concentrações de Triptona e de digestão peptídica de carne e lactose.

A ausência da digestão peptídica de carne e lactose em um meio de cultura pode afetar o crescimento dos *S. thermophilus* de várias maneiras, uma vez que esses nutrientes são importantes para o metabolismo e o crescimento das bactérias lácticas. No caso da digestão peptídica de carne fornece uma fonte de nitrogênio e aminoácido para os *S. thermophilus* (DIFICO & BBL, 2009).

A lactose é uma fonte importante de carbono para muitas cepas de *S. thermophilus*. Essas bactérias são conhecidas por sua habilidade de fermentar a lactose para produzir ácido láctico, que é um dos principais produtos finais da fermentação láctica (DIFICO & BBL, 2009). A ausência de lactose no meio de cultura pode afetar a capacidade da bactéria de utilizar uma fonte de carbono disponível, limitando assim o seu crescimento.

Alguns meios vêm pré-suplementados com lactose como também pode ser observado na tabela 4, enquanto outros permitem a adição desses suplementos (lactose) conforme necessário e de acordo com a técnica de análise (ISO 7889 IDF 177)

Em um meio de cultura com falta de nutrientes essenciais, as bactérias podem não crescer de forma eficiente, e isso pode permitir a competição por recurso limitados. Outras bactérias ou microrganismos presentes no meio podem competir pelos nutrientes, o que pode afetar o crescimento (TAIT et al. 2019)

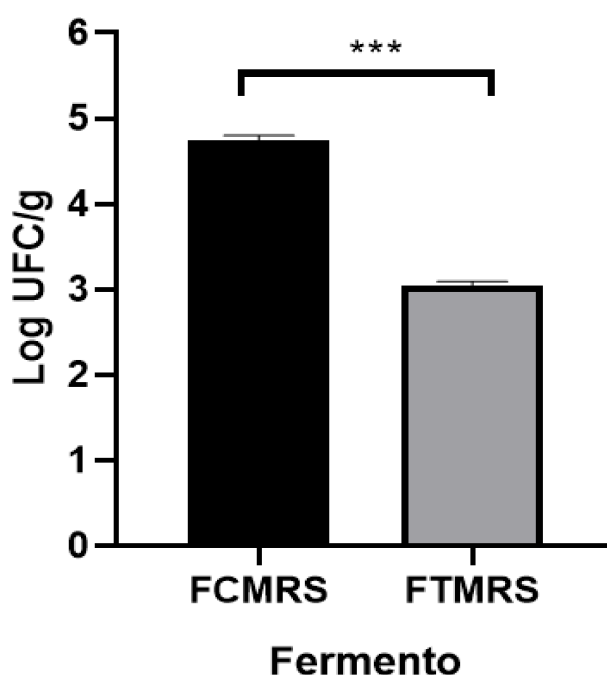
5.4 CONTAGEM DE *L. bulgaricus* NO D1

Observou-se uma menor recuperação de células *L. bulgaricus* no meio de cultura MRS. Fernandes (2011) também encontrou resultados semelhantes, quando comparados as análises de *S. thermophilus* no meio de cultura M17.

De acordo com Tamine e Robison (2007) a proporção de *L. bulgaricus* em pH 4,2 a 4,5, se comparado com *S. thermophilus* deve ser de 1:1. Com o decorrer do

tempo de armazenamento do iogurte, essa proporção tende a diminuir, uma vez que o *L. bulgaricus* é inibido pela própria acidez. Portanto, os resultados encontrados neste estudo estão em concordância com a literatura onde podemos avaliar através da Figura 16, que o FC tem maior concentração de UFC/g quando comparado ao FT.

Figura 16 - Representação gráfica comparativas formulações controle e teste *Lactobacillus bulgaricus*



*** $p < 0,05$ diferença significativa

Legenda: FCMRS: Fabricação controle MRS; FTMRS: Fabricação teste MRS

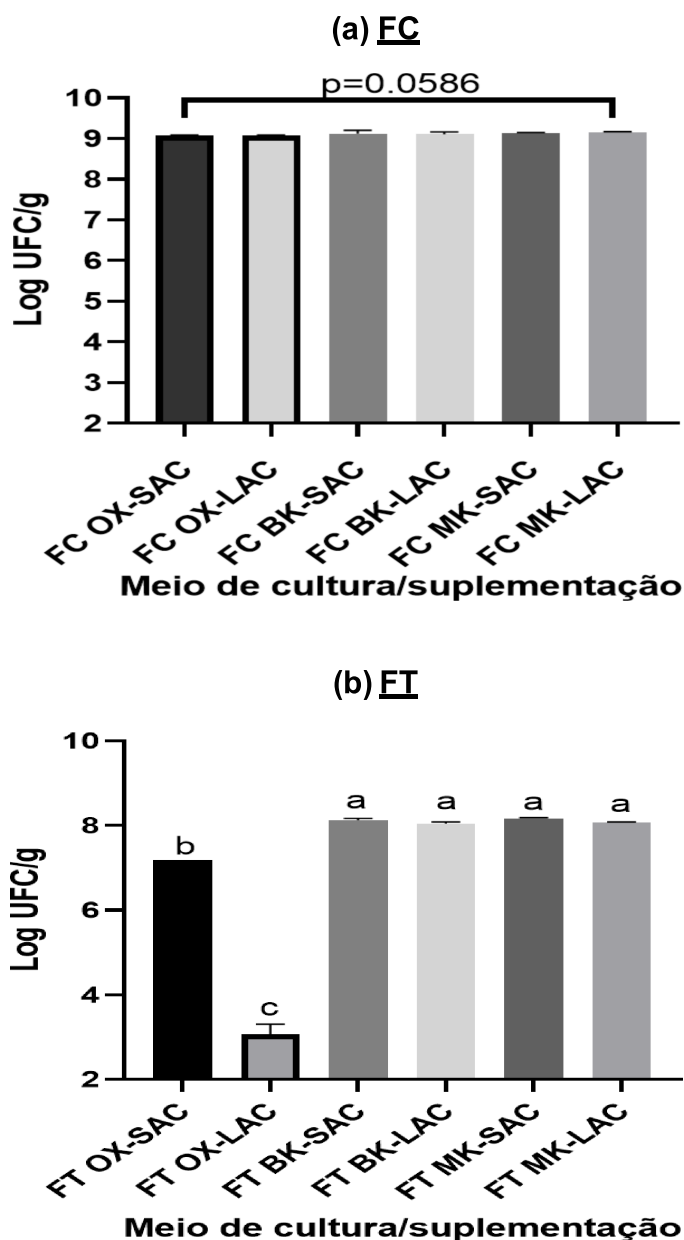
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

5.5 CONTAGEM *S. thermophilus* NO D50

Os resultados da contagem de *S. thermophilus* nos iogurtes preparados no D50 estão dispostos na figura 17. Ao observamos a produção FC, todas as amostras atenderam à contagem mínima exigida pela Instrução Normativa do MAPA nº 46 (BRASIL, 2007). No meio de cultura M17 Biokar aplicado para FC e FT, o crescimento da contagem de bactérias atingiu 10^9 UFC/g. Notavelmente, o comportamento do D1 foi semelhante ao D50, indicando que eles são

estatisticamente semelhantes, ambos estando acima do limite mínimo de contagem de acordo com a legislação vigente.

Figura 17 - Representação gráfica comparativa das diferentes suplementações de sacarose e lactose nos tratamentos FC e FT, nos meios de cultura M17 Biokar, Merck e Oxoid (D50)



Legenda: FC: Formulação controle com fermento YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulação teste com fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; FC/FT OX-SAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com sacarose; FC/FT OX-LAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com lactose; FC/FT BK-SAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com sacarose; FC/FT BK-LAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com lactose; FC/FT MK-LAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Merck suplementado com lactose. FC/FT MK-SAC: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Merck suplementado com sacarose.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

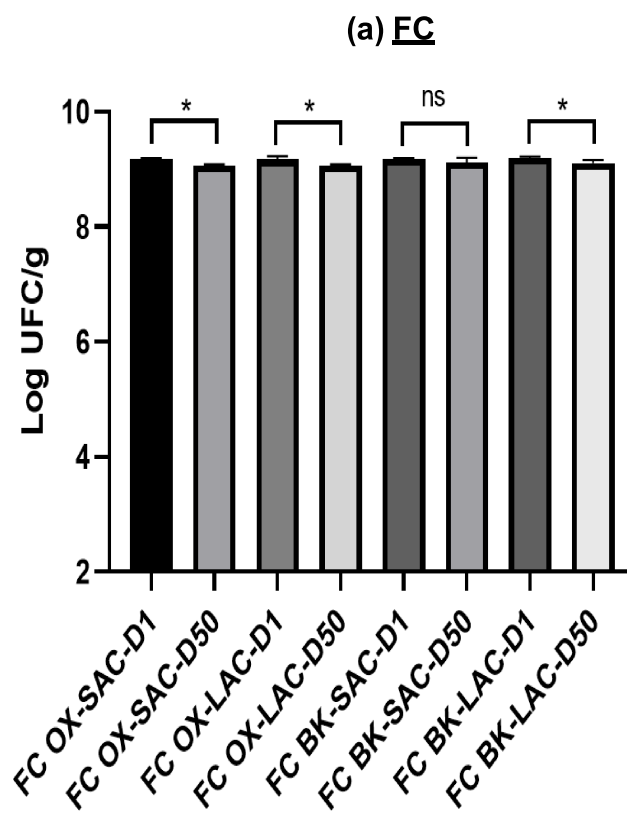
Conforme discutido anteriormente, existem diferenças entre os meios de cultura M17 das marcas Biokar e Oxoid, embora haja uma semelhança notável na composição dos meios de cultura M17 das marcas Biokar e Merck, a diferença composicional de ambas podem ocasionar mudanças no crescimento das bactérias (MANDIGAN, et al 2009 e TORTORA et al. 2005)

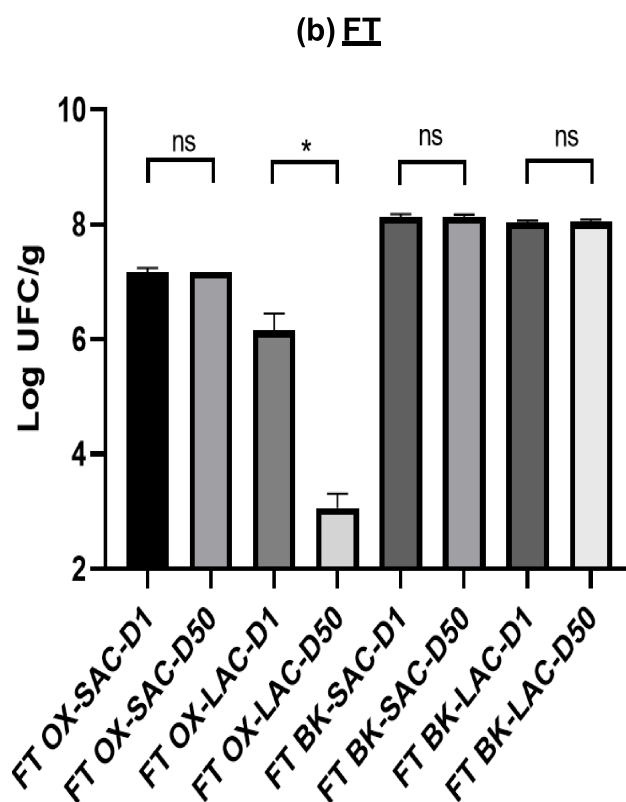
5.5.1 Comparação estatística *shelf-life* D1 e D50

Os resultados apresentados na figura 18. indicam que aos 50 dias de *shelf-life* não houve uma diferença significativa estatisticamente no tratamento FC entre os meios de cultura M17 Biokar, Merck, Oxoid suplementados com lactose ou sacarose, quando comparados ao D1. No caso do iogurte a escolha entre os meios de cultura M17 apresentaram um comportamento igual em termos de contagem total de bactérias lácticas. Isso pode indicar que a escolha entre os substratos para a suplementação não afeta significativamente os resultados da contagem, nas condições testadas.

O comportamento dos meios de cultura M17 Biokar e Merck suplementados com lactose ou sacarose, no D1 apresentaram resultados semelhantes frente ao FT. Nas condições experimentais realizadas sugere-se que essas duas marcas podem ser igualmente eficazes. No caso do meio de cultura M17 Oxoid a contagem ficou abaixo do limite mínimo exigido pela legislação no D1 e D50 quando suplementado com lactose, já quando suplementamos o meio M17 com sacarose obtemos uma melhor resposta na contagem das bactérias, atingindo o limite mínimo exigido pela legislação.

Figura 18 - Representação gráfica da comparação dos meios de cultura M17 Biokar, Merck e Oxoid no shelf-life (D1 e D50)





*p<0,05 diferença significativa

Legenda: FC: Formulação controle com fermento YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulação teste com fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; FC/FT OX-SAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com sacarose com 1/50 dias de produção; FC/FT OX-LAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com lactose 1/50 dias de produção; FC/FT BK-SAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com sacarose 1/50 dias de produção; FC/FT BK-LAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Biokar suplementado com lactose 1/50 dias de produção; FC/FT MK-LAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Merck suplementado com lactose 1/50 dias de produção; FC/FT MK-SAC D1/D50: Fabricação controle/ Fabricação teste M17 Merck suplementado com sacarose 1/50 dias de produção.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Esses resultados sugerem que a escolha do meio de cultura M17 Biokar e Merck suplementados com lactose ou sacarose não afetam os resultados da contagem de microrganismos. Já no caso do meio de cultura M17 Oxoid com sacarose não atingiu os padrões regulatórios. Portanto, os meios de cultura M17 Biokar e Merck são boas opções para contagem de bactérias lácticas no iogurte.

5.6 Comparação estatística DA concentração de lactose

FC e FT sem suplementação de lactose, ambas no meio de cultura M17 Oxoid, obtiveram contagem abaixo do limite, por isso não foram incluídos na estatística. Isso pode indicar que a ausência de lactose como fonte de carbono pode ocasionar o não crescimento do *S. thermophilus*, resultando em contagens abaixo do limite de detecção (MANDIGAN, et al 2009 e TORTORA et al. 2005).

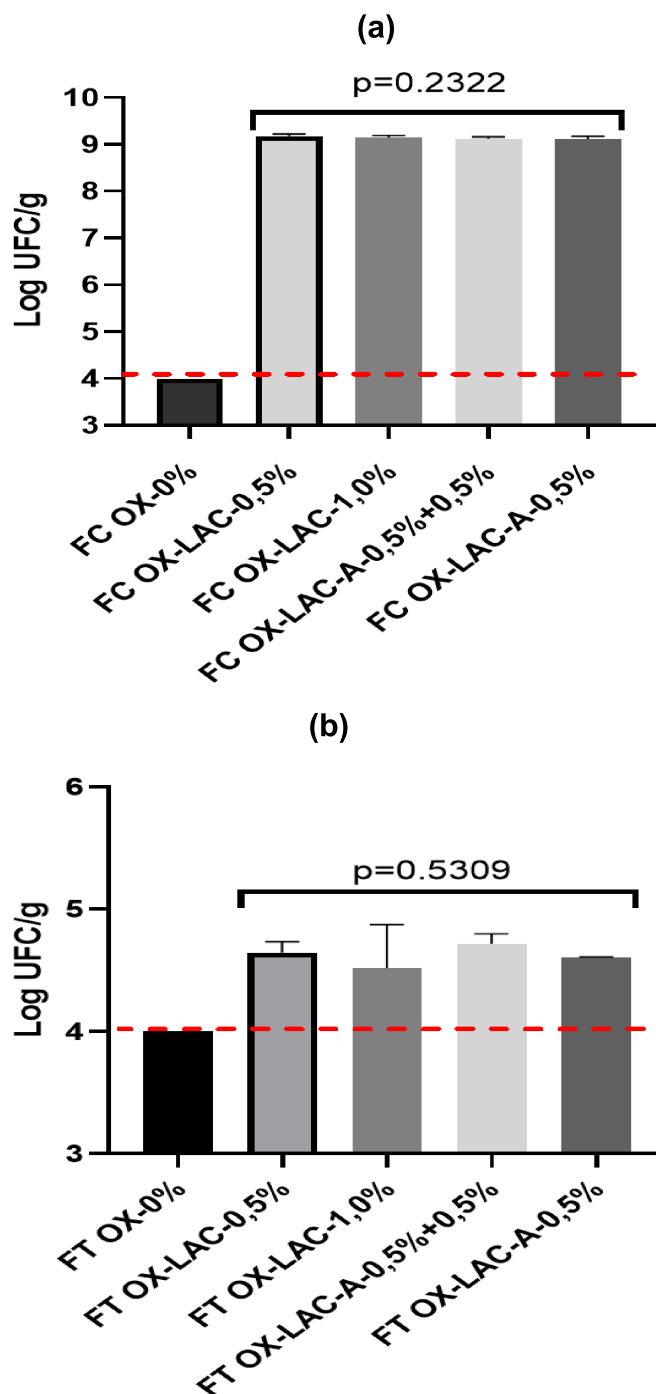
Quando o meio de cultura M17 Oxoid foi suplementado com diferentes concentrações de lactose, não houve diferença estatisticamente significativa entre o FC e o FT. Esses resultados podem ser observados na Figura 19. Esse é um resultado importante a ser considerado, pois indica que a lactose pode ser um componente crítico para o crescimento dos microrganismos em questão nesse meio de cultura (MANDIGAN, et al 2009 e TORTORA et al. 2005)

Quando o meio M17 Oxoid foi suplementado com diferentes concentrações de lactose não houve diferença estatisticamente significativa entre o FC e o FT. Isso sugere que, dentro das concentrações testadas, a adição de lactose ao meio não teve impacto estatisticamente significativo nas contagens de bactérias lácticas. Essa informação pode ser útil para determinar a concentração ideal de lactose a ser usada no meio, garantindo um equilíbrio entre o crescimento adequado.

A ausência de suplementação dos meios de cultura M17 Biokar e Merck não apresentou diferenças significativas nas contagens de bactérias lácticas (FC e FT) de acordo com a figura 20. Podendo indicar que os meios de cultura são relativamente estáveis em termos de suporte do crescimento dessas bactérias lácticas.

Além disso, quando diferentes concentrações de lactose foram testadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre FC e FT, o que pode ser útil para otimizar a formulação do meio. No entanto é importante notar que a interpretação completa desses resultados pode depender das características específicas dos microrganismos em estudos e dos objetivos do experimento.

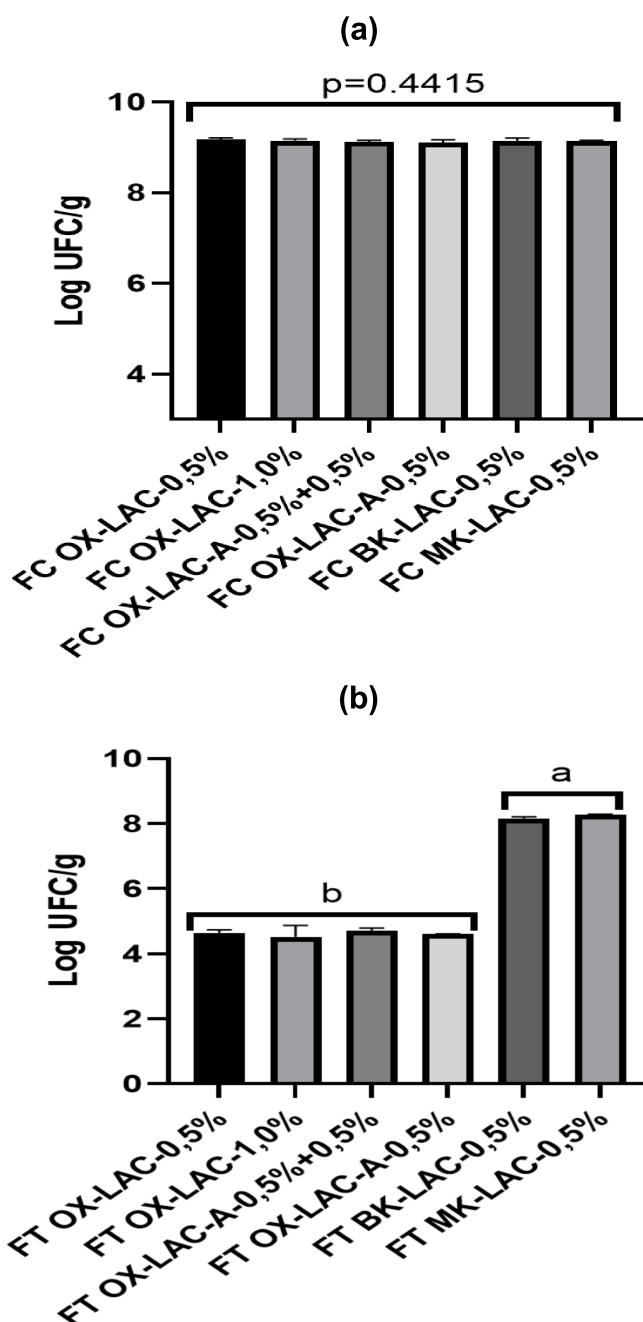
Figura 19 - Representação gráfica comparativa das diferentes concentrações de suplementação de lactose no meio de cultura M17 Oxoid



Legenda: Linha pontilhada vermelha: Abaixo do limite de contagem; FC/FT-OX-0,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid sem suplementação de lactose; FC/FT-OX-LAC-0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 0,5% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-1,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 1,0% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-A-0,5%+0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid suplementação antes e após o aquecimento; OX-LAC-A-0,5%: Suplementação antes do aquecimento.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Figura 20 - Representação gráfica comparativa das diferentes concentrações de suplementação de lactose no meio de cultura M17 (Oxoid, Biokar e Merck)



Legenda: FC/FT-OX-0,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid sem suplementação de lactose; FC/FT-OX-LAC-0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 0,5% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-1,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 1,0% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-A-0,5%+0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid suplementação antes e após o aquecimento; OX-LAC-A-0,5%: Suplementação antes do aquecimento; FC/FT-BK-0,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Biokar sem suplementação de lactose; FC/FT-MK-0,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Merck sem suplementação de lactose.

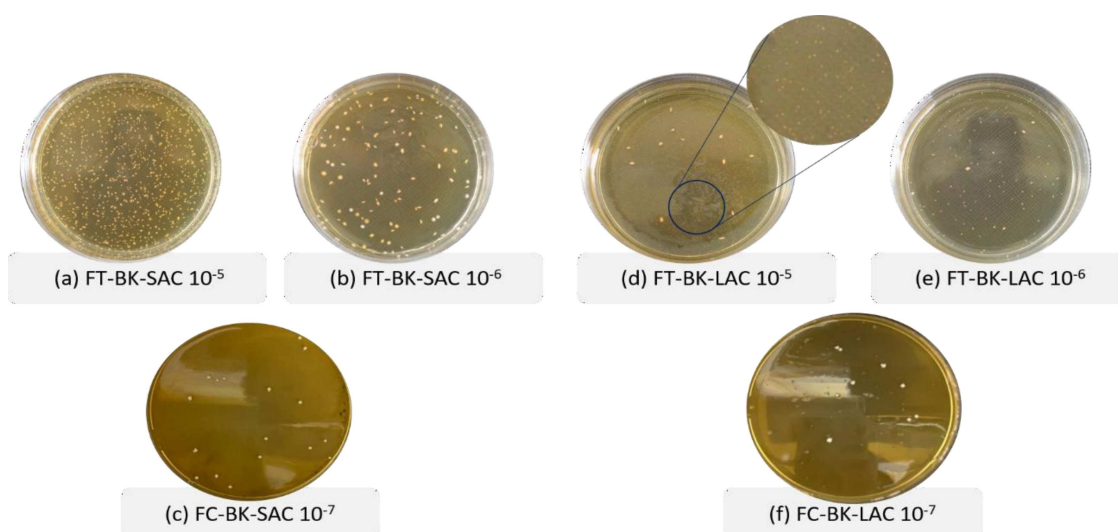
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.7 ANÁLISE DAS COLONIAS DOS MEIOS DE CULTURA M17 E MRS

As bactérias lácticas exibem uma variabilidade marcante em suas características morfológicas, como observado por Souza et al. (2022). As bactérias do gênero *S. thermophilus*, em geral, possuem uma forma arredondada ou oval. A coloração das colônias pode variar, sendo frequentemente brancas, mas ocasionalmente apresentando tons amarelados, dependendo das condições do meio de cultura. É importante ressaltar que a morfologia das colônias pode divergir entre diferentes espécies e mesmo entre cepas da mesma espécie (SALMINEN et al., 2004).

Para uma avaliação visual da morfologia das colônias FC e FT, procedemos a análise das Figuras 21, 22 e 23, correspondentes aos meios de cultura M17 Biokar, Merck e Oxoid, respectivamente. No que diz respeito às colônias FC, podemos notar uma tendência de homogeneidade, com características consistentes com as previamente descritas. Entretanto, no caso das colônias FT, observamos culturas mais heterogêneas, com dimensões notavelmente menores em comparação com a FC, sendo observada a ausência de crescimento de colônias FT. no meio de cultura M17 Oxoid.

Figura 21 - Morfologia das colônias de *S. thermophilus* no meio de cultura M17 Biokar

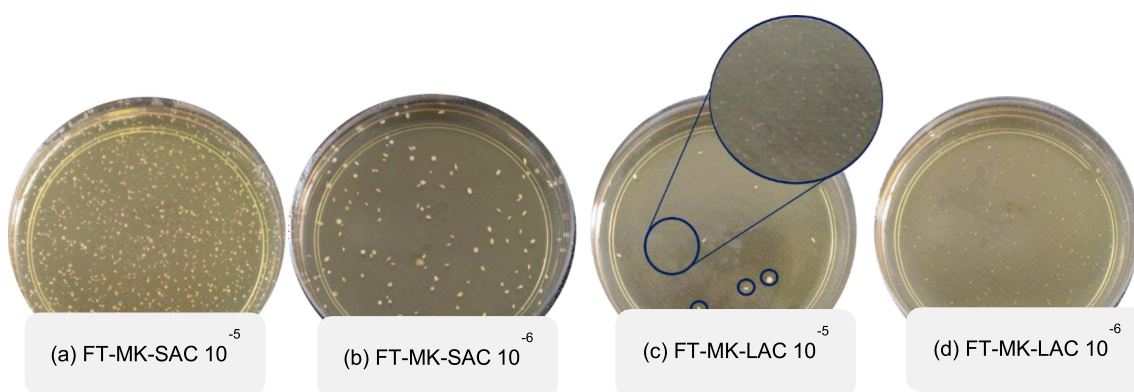


Legenda: FT-BK-SAC: Fabricação teste M17 Biokar suplementado com sacarose; FT-BK-LAC: Fabricação teste M17 Biokar suplementado com lactose; FC-BK-SAC: Fabricação teste M17 Biokar suplementado com sacarose; FT-BK-LAC: Fabricação teste M17 Biokar suplementado com Lactose

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os resultados indicaram que as colônias FT no meio de cultura M17 Biokar quando foram suplementadas com sacarose foram semelhantes aos aspectos da morfologia das colônias do FC. Esse resultado pode sugerir que a sacarose foi eficientemente utilizada como fonte de carbono pelos microrganismos em estudo. No entanto, quando as colônias foram suplementadas com lactose, houve uma diferenciação notável em suas características, com um tamanho reduzido observado. Esse resultado foi observado também como mostra na Figura 22 no meio de cultura M17 da Marck.

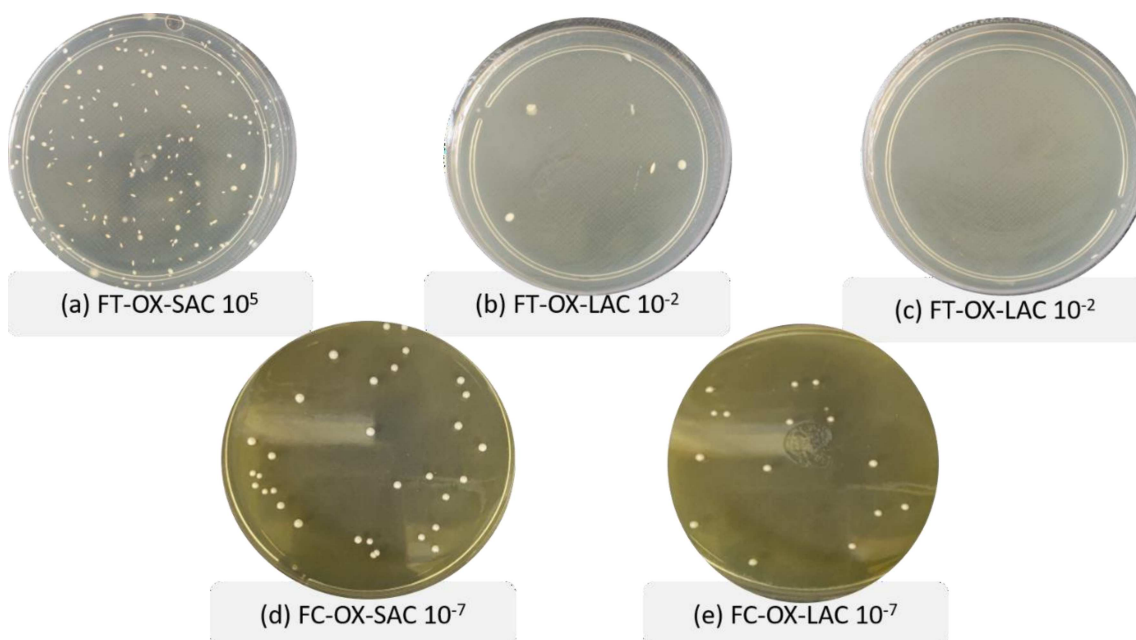
Figura 22 - Morfologia das colônias de *S. thermophilus* no meio de cultura M17 Merck



Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: FT-MK-LAC: Fabricação teste M17 Merck suplementado com lactose; FT-MK-SAC: Fabricação teste M17 Merck suplementado com sacarose

Figura 23 - Morfologia das colônias de *S. thermophilus* no meio de cultura M17



Legenda: FT-OX-SAC: Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com sacarose; FT-OX-LAC: Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com lactose; FC-OX-SAC: Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com sacarose; FT-OX-LAC: Fabricação teste M17 Oxoid suplementado com Lactose

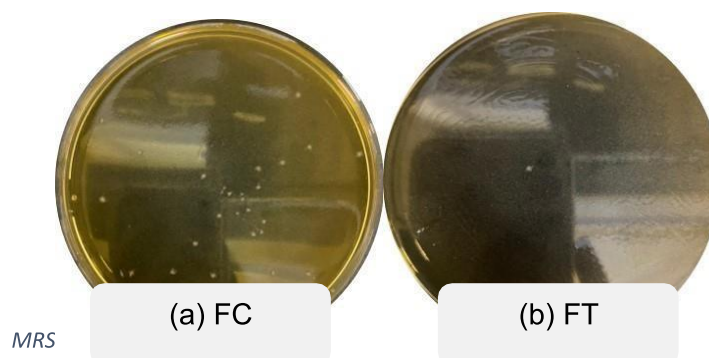
Fonte: Elaborada pela autora (2023)

A observação de diferenças na morfologia das colônias de *S. thermophilus* entre os tratamentos FT e FC, seguida pela confirmação de coloração de Gram, destaca a versatilidade e capacidade de adaptação dessas bactérias a diferentes ambientes de cultivo e ressalta a importância da análise microbiologia (LEVINSON et al. 2016).

As colônias de *L. bulgaricus* são frequentemente descritas como pequenas e arredondadas. Elas tendem a ter uma forma regular, embora possam variar em tamanho, geralmente apresentando dimensões uniformes, com coloração branca e/ou creme (LEVINSON et al. 2016).

Em relação aos tratamentos FC e FT, as morfologias das colônias visualmente foram iguais, conforme descrito acima. Isso pode sugerir que os *L. bulgaricus* nos dois tratamentos produziram colônias com características morfológicas semelhantes, seguindo a descrição típica dessa espécie.

Figura 24 - Morfologia das colônias de *L. bulgaricus* no meio de cultura



Legenda: FC Fabricação controle MRS; FT: Fabricação teste MRS
 Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Essa uniformidade da morfologia das colônias entre os tratamentos pode indicar que os *L. bulgaricus* responderam de maneira consistente aos diferentes substratos de lactose e sacarose, em relação à morfologia. Essa observação é importante para entender como esses microrganismos se comportam em diferentes condições de cultivo e pode ter implicações práticas na produção de iogurte.








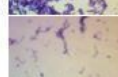


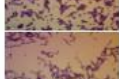


5.8 CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS DE *S. Thermophilus* E *L. bulgaricus* PELA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM

A confirmação da identidade das colônias de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* por meio da técnica de coloração de Gram é um passo fundamental na caracterização desses microrganismos. Essa técnica é amplamente utilizada para diferenciar e identificar bactérias. As bactérias lácticas, com a presença de coco (*S. thermophilus*) e bastonetes (*L. bulgaricus*), gram-positivas, não esporulada e catalase negativa (SOUZA et. al., 2022 e SALMINEN et al., 2004).

Através da Figura 25, fica evidente que os meios M17 utilizados demonstraram seletividade para as cepas bacterianas usadas no presente estudo. Por exemplo, as células de *S. thermophilus* foram evidentes apenas nos meios M17, enquanto *L. bulgaricus* cresceram apenas nos meios MRS no trabalho de Saccaro 2011 também foi encontrado esses resultados. As lâminas analisadas confirmaram a presença das bactérias lácticas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Essa confirmação é crucial para validar a integridade das amostras e demonstrar que as cepas de bactérias lácticas estariam presentes nas mesmas. Esse resultado respalda a

precisão e a confiabilidade dos procedimentos de análise microbiológica empregada no estudo, garantindo a base sólida para as conclusões subsequentes e para tomada de decisões relacionadas à pesquisa ou à produção de produtos lácteos fermentados.

Figura 25 - Confirmação das colônias *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* através da coloração de Gram.

Meio de cultura	Tratamento	Gram	Sup.	Tratamento	Gram
Biokar SAC	FC		LAC	FC	
	FT			FT	
Merck LAC	FC		LAC	FC	
	FT			FT	
Oxoid SAC	FC		LAC	FC	
	FT			FT	NC*
MRS	FT			FT	
	FC			FC	

Legenda: Sup.: Suplementação; FC: Fabricação controle; FT: Fabricação Teste; SAC: Sacarose; LAC: Lactose; NC: Não coletado.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

5.9 VARIAÇÕES DO PH E ADICEZ TITULÁVEL NOS IOGURTES PRODUZIDOS

As formulações foram analisadas durante o *shelf-life* nos dias 1, 7, 14, 30 e 50 após a produção dos iogurtes, os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Variação dos valores de pH e acidez titulável nos iogurtes durante os dias de shelf-life

Propriedades	Dias	FC	FT
pH	D1	4,28 ± 0,01 ^{aA*}	4,66 ± 0,01 ^{aB}
	D7	4,27 ± 0,02 ^{abA}	4,52 ± 0,02 ^{bB}
	D14	4,21 ± 0,03 ^{bcA}	4,46 ± 0,09 ^{cB}
	D30	4,20 ± 0,01 ^{cA}	4,41 ± 0,09 ^{dB}
	D50	4,15 ± 0,02 ^{cA}	4,38 ± 0,01 ^{dB}
Acidez titulável (g de ácido lático/100g)	D1	1,02 ± 0,03 ^{aA}	0,91 ± 0,02 ^{aA}
	D7	0,95 ± 0,04 ^{aA}	0,88 ± 0,02 ^{aA}
	D14	1,00 ± 0,06 ^{aA}	0,87 ± 0,01 ^{aA}
	D30	1,00 ± 0,04 ^{aA}	0,89 ± 0,01 ^{aA}
	D50	1,15 ± 0,02 ^{aA}	0,90 ± 0,02 ^{aA}

* Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma coluna e média seguidos de letra maiúscula da linha, não difere entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Legenda: FC: Formulação controle com fermento YOFLEX[®] MILD 1.0; FT: Formulação teste com fermento YOFLEX[®] ACIDIFIX.

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Os valores de pH apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Tukey entre os períodos D1, D7, D14 e D30 no caso do FT. Esses resultados apontam para uma tendência de redução do pH ao longo do *shelf-life* dos iogurtes, com maior estabilidade observada no D30 em comparação ao D50.

No que diz respeito a FC, observamos um comportamento semelhante, onde o valor de pH em D1 é igual ao D7, mas difere estatisticamente do D14, D30 e D50. O pH se mantém constante ao final do monitorando de *shelf-life*, tal fato pode ser explicado pelo processo de pós acidificação devido à atividade metabólica das bactérias lácticas devido ao resfriamento e estocagem do produto em temperatura 4 °C (FARIAS, et al., 2016).

Além disso, as análises estatísticas confirmaram que o pH da FC é estatisticamente inferior ao pH do FT ao longo do seu *shelf-life*. Valores de pH em torno de 4,5 são desejáveis pois inibem o crescimento de bactérias patogênicas (COSTA et al., 2013)

Para a Instrução Normativa do MAPA de nº 46 (BRASIL, 2007), a acidez de iogurtes deve estar entre 0,6 – 1,5 gramas de ácido lático em 100 g de alimento. Em relação ao teor de acidez ela se manteve estável em ambos os tratamentos durante toda a vida útil do iogurte.

Quando se trata do FT a este nível de acidez, a sacarose é completamente metabolizada, e não é possível ocorrer uma acidificação adicional, uma vez que as cepas em questão não têm a capacidade de fermentar a lactose presente no meio (BOECK et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa proporcionam uma visão abrangente das características microbiológicas de iogurtes produzidos com cultivos de fermentação YOFLEX® MILD 1.0 e YOFLEX® ACIDIFIX® utilizando substratos de lactose e sacarose.

Em relação à contagem de bactérias lácticas, é importante destacar que amostras FC de iogurtes produzidos atenderam aos requisitos mínimos exigidos pelas normas regulatórias, independentemente do tipo de meio de cultura ou substrato utilizado. Entretanto, é fundamental ressaltar que foram observadas diferenças significativas nas contagens de BAL nas produções ou iogurtes FT entre os meios de cultura e os substratos.

No que diz respeito aos meios de cultura, os resultados indicam que os meios M17 das marcas Biokar e Merck apresentaram resultados semelhantes, sugerindo que ambos podem ser eficazes na contagem de bactérias lácticas. Por outro lado, o meio de cultura M17 Oxoid mostrou resultados inconsistentes, especialmente quando suplementado com lactose, levantando questionamentos sobre sua adequação para a detecção de microrganismos de acordo com as regulamentações vigentes.

A suplementação com lactose mostrou-se mais eficaz em estimular o crescimento de *S. thermophilus* em comparação com a sacarose quando avaliado FC, isso se deve à capacidade dessa bactéria de utilizar a lactose como fonte de energia, enquanto na produção FT o crescimento de *S. thermophilus* mostrou-se mais eficaz em suplementação com sacarose.

As análises de morfologia das colônias revelaram diferenças entre os tratamentos FT e FC. Essas diferenças destacam a versatilidade das bactérias lácticas e sua capacidade de se adaptar a diferentes ambientes de cultivos, porém, através da análise de confirmação de Gram, as colônias foram confirmadas como bactérias lácticas. A identificação molecular por meio de sequenciamento de DNA confirmou a presença de *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus* sp., validando a integridade das amostras e a confiabilidade dos procedimentos microbiológicos realizados.

Em relação ao pH e à acidez, observou-se uma variação dos valores de pH ao longo do tempo, com uma tendência à redução. No entanto, a acidez

permaneceu dentro dos limites estabelecidos pelas normas regulatórias, garantindo a qualidade dos iogurtes produzidos.

Esta pesquisa ressaltou a importância crítica da seleção adequada de meios de cultura e substratos na análise de bactérias lácticas em iogurtes. Além disso, demonstrou a complexidade das interações entre os microrganismos e os componentes do meio, o que pode influenciar tanto o crescimento quanto as características das colônias. Esses são fundamentais para a indústria de alimentos, auxiliando na produção de iogurtes de alta qualidade e assegurando a conformidade com as regulamentações.

REFERÊNCIAS

- ABDI-MOGHADAM, Zohreh et al. Functional yogurt, enriched and probiotic: a focus on human health. **Clinical Nutrition Espen**, v. 57, p. 575-586, out. 2023.
- ASWAI et al. Yoghurt: preparation, characteristics and recent advancements. **Caltech Journal of Bio-Protocols**, v. 1, n. 2, p. 32-44, 2012.
- BEHRENS, JORGE H et al. Consumer Purchase habits and views on food safety: a Brazilian study. **Food Control**, v. 21, n. 8, p. 963-969, 2010
- BOLOTIN U. B et al, Complete sequence and comparative analysis of the genome of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. **Natural Biotechnology**, v 29, p 1154-1558, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro **Instrução Normativa no 46, de 23 de outubro de 2007**. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Resolução n.5, de 13 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, p. 19-22, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro. **Instrução Normativa no 76, de 26 de novembro de 2018**. 2018.
- CENITI, CARLOTTA et al. Observations on passive microrheology for monitoring the fermentation process in yoghurt. **International Dairy Journal**, v 102, p. 104605, mar. 2020.
- COSTA, M. et al., "Leite fermentados: potencial alimento funcional. *Enciclopedia Biosfera*, v. 9 n. 16, 2013.
- CUI, Y. et al. The effects of heat treatment and fermentation processes on the formation of furfurals in milk-based dairy products using a QuEChERS technique followed by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Food Chemistry**, 313, p. 1-7, 2020.
- CUI, Y. et al. New Knowledge about various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1701, 2016.
- CHR HANSEN. **YOFLEX® ACIDIFIX™**. 2023. Disponível em: <https://www.chr-hansen.com/pt/food-cultures-and-enzymes/fresh-dairy/cards/product-cards/yoflex-acidifix>. Acesso em: 02 Dez. 2023.
- DIFCO & BBL. **Difco & BBL Culture Media Manual**. [Online]. Disponível em: [URL: bd.com/resource.aspx?IDX=9572]. Acesso em: 12 de agosto de 2023.
- FARIAS, P. K. S. et al. Contagem de bactérias lácticas em iogurtes comerciais. **Cadernos de Ciência. Agrária**. 8(3), p. 38-44, 2016.

FELIZ, G. E., et al.; Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 44-61 2007.

Fermentação do iogurte: protocooperação das bactérias lácticas”. **MilkPoint**, <https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/fermentacao-do-iogurte-protocooperacao-das-bacterias-laticas-232132/>. Acessado 12 de Agosto de 2023.

FERREIRA NETO, R., & VIEIRA A. A. S. Veracidade da rotulagem quanto a presença de amido baseado em um teste laboratorial em iogurtes nacionais comercializados no sul de Santa Catarina. **Revista do Instituto Adolf Lutz**. São Paulo, 2021.

DEETH, C. L. I. F.; TAMIME, A. Y. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspect. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 1, p. 78, 1981.

DOS SANTOS EMILIANO, J. V. et al. Avaliação físico-química e microbiológica de iogurtes comercializados em Rio Pomba-MG e comparação com os parâmetros da legislação. **Revista Vértices**, v. 19, n. 1, p. 191- 200, 2017.

DYNAMIC Growth in the Yoghurt Market: Trends to Follow”. **Lactalis Ingredients**, <https://www.lactalisingredients.com/new/blog/dynamic-growth-in-the-yoghurt-market-trends-to-follow/>. Acessado 25 de agosto de 2023.

GASSER, C, et al. Co-utilization of saccharides in mixtures: moving toward a new understanding of carbon metabolism in *Streptococcus thermophilus*. **Food Microbiology**, v. 107, p. 104080, 2022.

GOMES, E. R. et al. Effect of sugar reduction and addition of corn fibre and polydextrose on pore size and syneresis of yoghurt. **International Dairy Journal**, 129, n. 129, p. 105298, 2022.

GOMES, Elisângela Ramieres et al. Influência do teor de sólidos lácteos na microestrutura de leites fermentados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 76, n. 4, p. 224-232, 2021.

GRANATO, D. Leites Fermentados: algumas considerações. **Leite & Derivados**, v. 16, n. 100, p.16-33, 2007.

HOLS P. F. et al. New Knowledge in molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Rev**, v. 29, p. 435-463, 2005.

HAMID M. Z. et al. Production of functional yogurt: Effect of natural antioxidant from guava (*Psidium guajava*) leaf extract. **Journal of Agricultural an Environmental Sciences**. V. 8, p. 102-116, 2009.

HAN, Mei et al. Use of *Streptococcus thermophilus* for the in-situ production of γ -aminobutyric acid-enriched fermented milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 98-105, 2020.

HOLS, P. et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.435-463, 2005.

LEUCAS, H. L. B. Efeitos benéficos de microorganismos envolvidos na produção de leite fermentado. 2012. 51p. **Monografia** (Pós-Graduação em Microbiologia aplicada às Ciências ambientais e industriais) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

LOBATO, V. **Tecnologia de fabricação de derivados do leite na propriedade rural**. Lavras/MG: UFLA, 2000. 37 p. (Boletim Técnico),2000.

ISKANDAR C. C. F. et al, Review of lactose and galactose metabolism in lactic acid bacteria dedicated to specialized genomic annotation. **Tendencies Food Science Technology**, v. 88, p 121-132, 2019.

KIM M. et al. Buffering capacity of dairy powders and its effect on yogurt quality. **The Korean Journal Of Blood Transfusion**, V. 29, n3, p. 273-81, 2018

LUCEY, J. A et al. Impact pf heat treatment of milk on acid gelation. **International Dairy Journal**, 125, 105222. 2022

LERVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. McGraw Hill Brasil, 2016.

LUVISSUTO, R. M; VEIGA-SANTOS, P; GIMENEZ, C. S. **Fermentação divertida: Introdução à Ciência através de Culinária Investigativa**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2014. 9-12 p.

MADIGAN et al. **Brock Biology of microorganisms**. Ed, 12. 2009.

MARCO M. L. D. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion In Biotechnology**. V. 44 p. 94-102. 2017

MARKAKIOU, S. et al. Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 61, p. 142-152, 2020.

MESTRADO PASTINK, B. et al. Genome-scale model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for metabolic comparison of lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiologic**, v 75, p. 3627-3633, 2009

MIR, M. B et al. Optimization of process variables for the preparation of almond gum incorporated set-yogurt using Box-Behnken response surface model | Elsevier Enhanced Reader. **Applied Food Research**, v. 1, p. 100016, 2021.

NOGUEIRA, Alexandre Verzani. **Microbiologia**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

NUTRITION BUSINESS JOURNAL. **Functional foods report**. Penton Media, 2002.

OLIVEIRA L. G. et al. Seasonal microbial conditions of locally made yogurt (Shalom) marketed in some regions of Cameroon. **Journal Food Science**, 2017.

OLIVEIRA T. Z. et al. Effects of glutathione on resistance to acid stress and on the symbiosis between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. **International Dairy Journal**, v. 61, p 22-28, 2016.

PACHECO, Flaviana Coelho; PACHECO, Ana Flávia Coelho; VIEIRA, Érica Nascif Rufino; LEITE JÚNIOR, Bruno Ricardo de Castro. **Protocolo de cooperação das bactérias lácticas durante a fermentação do iogurte**. 2022. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/fermentacao-do-iogurte-protocolo-cooperacao-das-bacterias-laticas-232132/>. Acesso em: 30 Nov. 2023.

RAU, M. H. et al. Constraint-based modeling in microbial food biotechnology. **Biochemical Society Transactions**. V. 46, p. 249-260, 2018.

ROBERT, Noely Forlin. Fabricação de iogurtes. **Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro – REDETEC, 2008**. Versão atualizada Setembro/2021.

SIEUWERTS, S. et al. Microbial Interactions in the Yoghurt Consortium: Current Status and Product Implications. **SOJ Microbiology & Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 1-5, 2016.

SIEUWERTS, S. et al. Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, p 7775-7784, 2010.

SILVA, N. N. et al. Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, 22, e 2018185. 2019.

SILVA, F. L et al. Monitoring the particle size distribution of whole and skimmed milk during acidic or enzymatic coagulation process. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e7011124438, 2022.

SOUZA, T. L. T. L., et al. “Contagem de bactérias lácticas em iogurtes e bebidas lácteas na região metropolitana de Recife-PE”. **Research, Society and Development**, vol. nº 15, 2022.

SOUZA, P. G. et al. Avaliação da quantidade físico-química de bebidas lácteas sabor araçá-boi (*Eugenia stipitata*). **Brazilian Journal of Science**, 1 (2), 59-64. 2022.

SALMINEN, S. et al. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, *London: CRC Press*, ed 3, 2004.

SACCARO M. D. et al. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, ed 5(23), 2011.

TAMINE, A. Y et al. Yoghurt: Science and Technology. **Woodhead Publishing Ltd.**, 791 p. 2007.

TARRAH U. L. et al. Differences in carbohydrate utilization and antibiotic resistance between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products in Italy. **Curri Microbiology**, v 75, p 1334-1344, 2018.

TAIT K. et al. Characterization of bacteria from the cultures of a Chlorella strain isolated from textile wastewater and their growth enhancing effects on the axenic cultures of Chlorella vulgaris in low nutrient media. **Algal Research**, v. 44, p. 101666, 2019.

TORTORA, G. J.; et al. **Microbiologia**. Ed. 8, 2005.

VÉKEZM M. A et al. Cheese milk low homogenization enhanced early lipolysis and volatiles compounds production in hard cooked cheeses. **Food Research International**, v. 96, p. 215-225, 2017.

VIEIRA, D. A. P.; et al. Microbiota of eggs revealed by 16S rRNA-based sequencing: from raw materials produced by different suppliers to chilled pasteurized liquid products. **Food Control**, v. 96, p. 194-204, 2019

ANEXOS

Anexo A: Tabela A1 – A5

Tabela A1 - Análise de *S. thermophilus* meio de cultura M17 das marcas Oxoid e Biokar no D1

Formulações	M17 (UFC/g)		M17 (UFC/g)	
	OX-LAC	OX-SAC	BK-LAC	BK-SAC
FCA*	$1,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
FCB	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
FCC	$1,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$
FCD	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
FTA**	$1,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
FTB	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
FTC	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
FTD	$4,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: FC: Formulações controle utilizando fermento de referência YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulações teste utilizando fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; OX-LAC: Oxoid suplementado com lactose; OX-SAC: Oxoid suplementado com sacarose; BK-LAC: Biokar suplementado com lactose; BK-SAC: Biokar suplementado com sacarose

Tabela A2 - Análise de *L. bulgaricus* utilizando meio de cultura MRS nas formulações controle e teste com um dia de fabricação (D1)

Formulações	MRS (UFC/g)
FCA*	$4,7 \times 10^4$ UFC/g
FCB	$6,4 \times 10^4$ UFC/g
FCC	$5,8 \times 10^4$ UFC/g
FCD	$5,1 \times 10^4$ UFC/g
FTA**	$1,1 \times 10^3$ UFC/g
FTB	$1,0 \times 10^3$ UFC/g
FTC	$1,1 \times 10^3$ UFC/g
FTD	$1,3 \times 10^3$ UFC/g

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: FC: Formulações controle utilizando fermento de referência YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulações teste utilizando fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; MRS: Meio de cultura para *L. bulgaricus*

Tabela A3 - Análise de *L. bulgaricus* utilizando meio de cultura MRS nas formulações controle e teste com cinquenta dias de fabricação (D50)

Formulações	MRS (UFC/g)
FCA*	$1,4 \times 10^3$
FCB	$2,0 \times 10^3$
FCC	$1,0 \times 10^2$
FDC	$3,3 \times 10^3$
FTA**	$1,9 \times 10^3$
FTB	$4,3 \times 10^2$
FTC	$6,7 \times 10^2$
FTD	$1,0 \times 10^3$

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: FC: Formulações controle utilizando fermento de referência YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulações teste utilizando fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; MRS: Meio de cultura para *L. bulgaricus*

Tabela A4 - Análise de *S. thermophilus* meio de cultura M17 das marcas Oxoid, Biokar e Merck D50 nas formulações

Formu- lações	M17 (UFC/g)		M17 (UFC/g)		M17 (UFC/g)	
	OX-LAC	OX-SAC	BK-LAC	BK-SAC	MK-LAC	MK-SAC
FCA*	$1,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
FCB	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
FCC	$1,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
FCD	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
FTA**	$4,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$
FTB	$2,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
FTC	$2,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$
FTD	$4,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$

Fonte: Elaborada pela autora (2023)

Legenda: FC: Formulações controle utilizando fermento de referência YOFLEX® MILD 1.0; FT: Formulações teste utilizando fermento YOFLEX® ACIDIFIX®; OX-LAC: Oxoid suplementado com lactose; OX-SAC: Oxoid suplementado com sacarose; BK-LAC: Biokar suplementado com lactose; BK-SAC: Biokar suplementado com sacarose; MK-LAC: Merck suplementado com lactose; MK-SAC: Merck suplementado com sacarose

Tabela A5 - Análise de *S. thermophilus* meio de cultura M17 das marcas Oxoid com diferentes concentrações de lactose e Biokar e Merck sem suplementação

Concentração de sacarose (%m/v)	Oxoid (UFC/g)					Biokar (UFC/g)	Merck
	0,0 %	0,5 %	1,0 %	0,5 %-A*	0,5 %+0,5 %-A*	0,0 %	0,0 %
	FCA*	0	$1,6 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
FCB	0	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
FCC	0	$1,6 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
FCD	0	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$
FTA**	0	$6,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
FTB	0	$4,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
FT0C	0	$4,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
FTD	0	$4,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$

Elaborada pela autora (2023).

Legenda: FC/FT-OX-LAC-0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 0,5% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-1,0%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid com suplementação de 1,0% (m/v) de lactose; FC/FT-OX-LAC-A-0,5%+0,5%: Formulação controle / formulação teste M17 Oxoid suplementação antes e após o aquecimento; OX-LAC-A-0,5%: Suplementação antes do aquecimento