



Indústria de **Laticínios**

Ano XVII - Julho 2012 - nº 97 - R\$ 18,00 - www.revistalaticinios.com.br - ISSN 1678-7250

SEGURANÇA ALIMENTAR
Qualidade dos Lâcteos e Tecnologias de Análises

Especial Expomaq 40 anos

Fepale

Fala do leite na América Latina

Editorial

Prezado Leitor,

É com satisfação que oferecemos aos nossos leitores e parceiros esta Edição Especial da Revista Indústria de Laticínios, que chega às suas mãos em dose dupla. Além do editorial convencional, trazemos outra capa – O Guia Expomaq 2012, uma prévia do maior evento brasileiro dirigido ao setor laticinista. Em função da importância da feira e dos 40 anos de sua existência, sempre levando conhecimento e novidades aos profissionais da área, nossa publicação adiantou-se e abriu espaço de destaque para o evento deste ano.

O Guia Expomaq 2012 traz uma prévia do que será apresentado na feira e no 29º Congresso Nacional de Laticínios. Além de uma mostra das novidades que as empresas levarão para o Expominas Juiz de Fora, para orientação do público divulgamos as principais referências do evento, como lista de expositores, Programação Científica de palestras e Minicursos do Congresso.

Na edição convencional, procuramos trazer as últimas novidades da cadeia produtiva do leite e, para isso, incluímos entrevista exclusiva com Bernardo Macaya Trejos, que assumiu, em junho, a presidência da Fepale (Federação Pan-americana do setor Leiteiro).

Destacamos também na matéria "O primeiro passo", a importância do tratamento e análises da matéria-prima leite para a qualidade e segurança alimentar de produtos lácteos. Para aqueles que não puderam conferir as novidades da Fispal Tecnologia, Feira Internacional de Embalagens e Processos para as Indústrias de Alimentos e Bebidas, reunimos alguns lançamentos e os principais destaques do evento.

Um dos pontos fortes desta edição está na qualidade e no conteúdo científico dos artigos técnicos de acadêmicos das principais universidades, centros de estudos e de empresas do setor laticinista, criteriosamente selecionados para nossos leitores. Temos certeza que o material disponibilizado na seção Fazer Melhor contribuirá para ampliar o conhecimento dos profissionais da área.

Confira ainda nesta edição as novidades de produtos para o mercado de consumo e ações de empresas que atendem a área de lácteos.

Boa leitura!

Luiz Souza
Diretor e Editor



Indústria de Laticínios

Ano XVII – nº 97 – julho/agosto 2012
www.revistalaticinios.com.br
ISSN 1678-7250

Diretor e Editor

Luiz José de Souza
luiz.souza@revistalaticinios.com.br

Redação

Juçara Pivaro
juçara.pivaro@revistalaticinios.com.br

Publicidade

Luiz Souza
Carolina Senna
carolina.senna@revistalaticinios.com.br
Daiane Domingues
daiane.domingues@revistalaticinios.com.br

Atendimento

Ana Carolina Senna de Souza
carolina.senna@revistalaticinios.com.br

Capa

Imagem de arquivo

Diagramação

Rafael Murad

Assinatura

Assinatura anual – R\$ 105,00 (6 edições)
Número avulso – R\$ 18,00

Comitê Editorial

Airton Vialta – DG/Ital
Ana Lidia C. Zanele Rodrigues – Allegis Consultoria
Antônio Fernandes de Carvalho – UFV
Ariene Gimenes Van Dender – Tecnolat/Ital
Darlila Aparecida Gallina – Tecnolat/Ital
Izildinha Moreno – Tecnolat/Ital
José Alberto Bastos Portugal – Embrapa/CNPGL
Mucio Furtado – DuPont/Danisco
Neila Richards – UFSM
Sebastião César Cardoso Brandão – UFV

Outra publicação:

Ingredientes
e Tecnologias



SETEMBRO EDITORA

Ed. Green Office Morumbi
Rua Domingues Lopes da Silva 890, Cj. 402
Portal do Morumbi

CEP 05641-030, São Paulo, SP, Brasil
Tels.: (11) 3739-4385 / 8141-3274 / 2307-5561 / 2307-5563 /
2307-5568 / 2307-5574

atendimento@revistalaticinios.com.br

As opiniões e conceitos emitidos em artigos assinados não representam necessariamente a posição da revista Indústria de Laticínios.

Mantenha seus dados atualizados preenchendo os formulários no site www.revistalaticinios.com.br

A quantificação seletiva de fermentos lácticos e probióticos em produtos lácteos

Patrícia B. Zacarchenco¹, Fabiana K.H.S. Trento², Leila M. Spadoti³,
Darlila A. Gallina³, Adriana T. Silva e Alves³, Maria Izabel M. de Medeiros⁴

¹Doutora em Tecnologia de Alimentos (UNICAMP). Pesquisador Científico do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios (TECNOLAT) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Avenida Brasil, 2880, Jardim Chapadão, CEP: 13070-178, Campinas, SP, Brasil. E-mail: pblumer@ital.sp.gov.br

²Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (ESALQ/USP). Pesquisador Científico do TECNOLAT/ITAL

³Doutoras em Tecnologia de Alimentos (UNICAMP). Pesquisadoras Científicas do TECNOLAT/ITAL

⁴Doutora em Medicina Veterinária (UNESP). Pesquisador Científico do TECNOLAT/ITAL

Resumo

Para os produtos lácteos com probióticos a quantificação destes micro-organismos é essencial para verificar se estão presentes nas quantidades mínimas exigidas pela legislação e se podem conferir benefícios a saúde dos consumidores. Também a quantificação em separado dos micro-organismos que compõe os fermentos lácticos é importante para o controle de qualidade das indústrias. A escolha final do meio e do método deve considerar o tipo de alimento, as espécies ou linhagens a se enumerar e/ou isolar, bem como a natureza dos gêneros competidores. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse antes de serem aplicados para o controle de qualidade. Este artigo pretendeu apresentar revisão da literatura sobre fundamentos dos métodos para contagem de fermentos lácticos e probióticos e sobre a problemática da contagem seletiva ou diferencial. Também foram apresentadas algumas definições de trabalhos de pesquisa para fermentos comerciais e os meios de cultura e métodos para obter a contagem diferencial ou seletiva destes micro-organismos.

Palavras chave: contagem diferencial, contagem seletiva, fermento, bactérias lácticas, probiótico

Introdução

A contagem seletiva de fermentos lácticos e probióticos é um tema bastante relevante para o controle da qualidade de produtos lácteos. Os fermentos lácticos são fundamentais para a fabricação de diversos produtos lácteos. Dentre os fermentos utilizados na produção de leites fermentados, queijos, sorvetes, manteigas, leites desidratados, entre outros produtos lácteos, há aqueles empregados com finalidade tecnológica e os adicionados para incrementar os benefícios a saúde destes produtos, ou seja, os fermentos probióticos. Em ambas as situações é importante quantificá-los para o controle do processo e do produto final. Para os produtos lácteos com probióticos a quantificação destes micro-organismos é essencial para verificar se estão presentes nas quantidades mínimas exigidas pela legislação podendo, assim, conferir benefícios a saúde dos consumidores.

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) normatiza as quantidades mínimas de células viáveis de micro-organismos probióticos que um produto deve conter para poder acrescentar em seu rótulo a alegação de propriedade funcional (BRASIL, 2008). Estas regras abrangem a categoria de "Alimentos com Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde". Segundo estas normas, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo que é diferente para queijos e iogurtes, leites fermentados ou bebidas lácteas fermentadas. A viabilidade dos micro-organismos probióticos no produto final é um dos cri-

Abstract

The enumeration of probiotics is important to verify that if the counts of viable cells are sufficient to produce health effects. The differential enumeration of the lactic bacteria of the starter is also important to the dairy industry quality control procedures. The final choice of the medium and of the methodology depends on the type of food, the strains that will be quantified and the antagonist among different genera and species. These methodologies must be evaluated to each strain before be applied to control purposes. This review intended to present some of the methodologies to quantify starter cultures of acid lactic bacteria and probiotics and the problems of selective and/or differential enumeration. The results obtained in the differential or selective enumeration of commercial starters were also presented.

Key words: differential enumeration, selective enumeration, starter, lactic acid bacteria, probiotic

térios de qualidade mais importantes, e deve manter-se alta (no mínimo 10⁶UFC/g) até o fim de sua vida útil (LAHTINEN et al, 2011; TENÓRIO, 2012)

Em termos tecnológicos a quantificação em separado dos micro-organismos que compõe um fermento também é importante. Na fabricação de iogurtes, por exemplo, é importante que a quantidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que são os micro-organismos tradicionais deste produto, esteja equilibrada. Para verificar se a situação de equilíbrio das duas populações está mantida é necessário o uso de meios de cultura que permitam enumerá-los separadamente. Em laticínios que usam "soro fermento" o controle da quantidade dos grupos de bactérias lácticas presentes pode auxiliar no controle de qualidade do processo e na manutenção das características dos queijos.

No texto a seguir foram revisonadas informações constantes de artigos científicos, de teses, de livros sobre métodos microbiológicos, de normas internacionais e da legislação brasileira sobre fundamentos dos métodos para contagem de fermentos lácticos e probióticos e sobre a problemática da contagem seletiva ou diferencial.

Fundamentos sobre quantificação de bactérias lácticas Tradicionalmente, a enumeração de micro-organismos em alimentos tem sido realizada por contagem em placas. Nesse método, a amostra é homogeneizada em tampão,

meio nutriente ou solução salina e as diluições apropriadas são plaqueadas em meio base ou seletivo suplementado com ágar. Os dois métodos padrão para o preparo das placas são o plaqueamento em superfície (spread plate) e em profundidade (pour plate). As contagens de micro-organismos são determinadas após a incubação em condições adequadas, por enumeração de colônias, e o resultado é expresso como unidades formadoras de colônias (TENÓRIO, 2012; ASHRAF, SHAH, 2011).

No "Standard Methods for the examination of dairy products" os autores Frank, Yousef (2004) informaram que a enumeração de bactérias lácticas em produtos lácteos é útil na avaliação da qualidade do produto incluindo o controle das causas de defeitos de acidez e avaliação dos fermentos lácticos. Este grupo de micro-organismos é bastante variado em suas características com diferentes exigências para seu desenvolvimento e diferentes sensibilidades a agentes seletivos. Não há nenhum meio de crescimento que possa ser aplicado a todas as amostras. Em casos onde populações significativas de bactérias não lácticas estão presentes os meios com grande seletividade podem ser necessários havendo o risco de inibição de algumas bactérias lácticas. As bactérias lácticas encontradas em produtos lácteos são um grupo heterogêneo que contém, principalmente, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e espécies homo e heterofermentativas de *Lactobacillus*.

Frank, Yousef (2004) descreveram metodologias para contagem de bactérias lácticas totais e enterococos em vários produtos lácteos. O ensaio descrito para bactérias lácticas totais é aplicável a produtos como leite fluido, queijo cottage, queijos em geral, leites fermentados, produtos não fermentados adicionados de fermentos e fermentos lácticos. O ágar LS (*Lactobacillus selection*) e o caldo MRS (*Man Rogosa Sharp*) adicionado de ágar são indicados quando é preciso seletividade para lactobacilos. Quando a seletividade não é necessária ou quando células injuriadas podem estar presentes o ágar Elliker incubado a 32 ou 37°C por 48 horas, em função do micro-organismos serem mesofílicos ou termofílicos, é recomendado. Como este meio é pouco seletivo, micro-organismos não lácticos podem produzir colônias. A composição do meio pode ser alterada para melhorar a detecção de micro-organismos produtores de ácido. Isto é obtido pela adição de solução alcoólica de bromocresol ao meio antes da esterilização. As colônias que produzirem halo amarelo são produtoras de ácido. Para tornar o ágar Elliker mais seletivo pode-se fazer a adição de 0,02% de azida sódica antes da esterilização. As bactérias lácticas são resistentes a azida sódica que inibe *Enterobacteriaceae* e micro-organismos aeróbicos. Caso corantes e azida sódica precisem ser usados o analista deve lembrar que algumas espécies de bactérias lácticas são inibidas por estas substâncias. Os autores alertaram ainda que lactobacilos que sobrevivem a pasteurização podem estar injuriados. Conseqüentemente, os lactobacilos de queijos recém produzidos devem ser numerados utilizando-se um meio relativamente não seletivo seguido da caracterização

das colônias. Como o MRS e o ágar Elliker não são altamente seletivos as colônias devem ser testadas individualmente para catalase, reação de Gram e morfologia celular.

Silva et al (2010) é uma importante referência em métodos microbiológicos para alimentos trazendo, contudo, poucas recomendações para enumeração de bactérias lácticas e nenhuma sobre probióticos. Estes autores recomendaram, além de caldo MRS na enumeração de bactérias lácticas pelo número mais provável, o caldo Rogosa SL.

Duncan et al (2004) também no "Standard Methods for the examination of dairy products", sobre enumeração de micro-organismos característicos em iogurte e outros produtos lácteos fermentados indicaram o uso de M-17 incubado em aerobiose a 37°C por 48 horas para enumeração de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e MRS acidificado para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que devem ser incubados anaerobicamente a 37°C por 72 horas. Após a incubação nos tempos adequados também recomendaram que seja feita confirmação das colônias com testes de catalase, Gram e morfologia celular. Para a enumeração de *Lactobacillus* resistentes a sais biliares (principalmente *Lactobacillus acidophilus*) deve-se usar 0,15% de oxgall e reportar os dados como contagem de *Lactobacillus* resistentes a bile por grama ou ml.

Para enterococos Frank, Yousef (2004) destacaram que ágar KF estreptococos tem sido aceito pela maioria das indústrias e agências regulatórias para a estimativa quantitativa destes micro-organismos em alimentos não lácteos. Condições mais seletivas são necessárias em produtos lácteos para reduzir o crescimento de outros estreptococos e lactobacilos. Por exemplo, ágar m-enterococos é sugerido para produtos obtidos através de processos de filtração por membranas. Contudo, este meio pode não ser inibitório para o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus bovis*. O método citado por Frank, Yousef (2004) pode ser aplicado para produtos lácteos e amostras ambientais. Este método emprega ágar citrato azida com sobrecamada e incubação a 37°C por 48 a 72 horas. As colônias de enterococos ficam coloridas de azul devido a presença de tetrazolium azul no meio.

Há mais de 20 espécies do gênero *Enterococcus*. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são encontrados em produtos lácteos. Estas espécies são reconhecidas por serem, principalmente, de origem fecal e são os micro-organismos alvos do teste. A contagem de *Enterococcus* é um indicador mais confiável que a contagem de coliformes na qualidade sanitária de manteiga, pois os enterococos sobrevivem melhor que os coliformes no microambiente desfavorável que é a manteiga salgada. Além disto, a contagem de enterococos pode ser um indicador mais confiável da qualidade sanitária de iogurtes que os coliformes, pois estes são mais facilmente inativados em pHs mais baixos que os enterococos.

A problemática da contagem seletiva ou diferencial

As bactérias probióticas mais estudadas e utilizadas em produtos lácteos são espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, e *B. lactis*, entre outros, são exemplos das espécies mais comumente usadas (SANDERS, 1999). A estes exemplos pode-se acrescentar linhagens de *Lactobacillus casei* e *Propionibacterium*.

Há necessidade de métodos simples e confiáveis para enumeração de rotina dos probióticos, como o *Bifidobacterium* sp. e o *L. acidophilus*, e dos micro-organismos dos fermentos tradicionais. Estas quantificações são importantes para determinar as contagens iniciais de bactérias probióticas após a fabricação do produto, para verificar a viabilidade destas células durante a estocagem refrigerada e, também, no produto na cadeia de distribuição. O monitoramento das quantidades e da sobrevivência de linhagens de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* em iogurtes probióticos foi, de acordo com Lourens-Hattingh, Viljoen (2001), negligenciada no passado pela falta de meios seletivos viáveis para a enumeração. A escolha final do meio e do método deve considerar o tipo de alimento, as espécies ou linhagens a se enumerar e/ou isolar, bem como a natureza dos gêneros competidores. Assim, não se deve esperar que os meios seletivos ou diferenciais funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse na situação (SHAH, 2000; ROY, 2001, e LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001).

Diversos meios para enumeração de micro-organismos probióticos têm sido propostos, porém a maioria é baseada em culturas puras desses micro-organismos. A enumeração de uma única cepa usando um meio seletivo é facilmente realizada. Entretanto, os probióticos são frequentemente incorporados em alimentos em combinação com outras bactérias lácticas, o que cria um desafio na enumeração específica dos micro-organismos por métodos tradicionais (TENÓRIO, 2012; LAHTINEN et al, 2011; ASHRAF, SHAH, 2011).

Os meios de cultura para enumeração de bactérias lácticas foram divididos em três grupos: (a) meios gerais que permitem contagem total de colônias sem diferenciá-las em gênero ou espécie, como por exemplo o ágar MRS; (b) meios formulados para contar seletivamente um gênero, como por exemplo o ágar Neomicina-Ácido Nalidixico-Cloreto de Lítio (NNLP) para isolamento de *Bif. bifidum* ou o ágar M-17, para *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*; (c) meios diferenciais que permitem a enumeração de quatro tipos de bactérias através de características visuais distintas (cor e forma da colônia), como por exemplo o ágar Triptona-Proteose-Peptona-Yeast Extract com corante azul da Prússia (TPPY agar) (LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001).

Vários meios foram sugeridos na literatura para enumeração de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*. Entre eles está o ágar ST (*Streptococcus thermophilus*) utilizado por Dave, Shah (1997). O ágar Lee empregado, inicialmente, na enumeração de bactérias do fermento de iogurtes (*Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) foi sugerido por Lee et al. (1974). Vinderola et al. (2000) empregaram o ágar leite desnatado (skim milk agar SMA) para enumerar *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus*. Medina, Jordano (1994), Rybka, Kailasapathy (1997) e Davidson et al. (2000) utilizaram ágar M17 para enumeração de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* em produtos lácteos fermentados contendo *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e probióticos. Mas, Karagül-Yücer et al. (2001) empregando o mesmo ágar M17 na enumeração de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* em iogurtes carbonatados contendo *L. acidophilus* e *Bif. longum* reportaram crescimento de *L. acidophilus* no meio para contagem de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Por sua vez, há vários meios sugeridos para a enumeração diferencial de *Bifidobacterium* na literatura, como os propostos por Samona, Robinson (1991), Lapierre et al. (1992); Rada, Koc (2000); Vinderola, Reinhemeir (2002); Dave, Shah (1996); Payne et al. (1999); Ghoddsi, Robinson (1996); Shah (2000); Charteris et al. (1997); Lankaputhra et al (1996), entre outros pesquisadores. Shah (1997) relatou o crescimento de *Str. thermophilus* no ágar LP-MRS nas concentrações de inibidores sugeridos por Lapierre et al. (1992), situação também verificada pelos autores deste trabalho.

Alguns dos meios de cultura para enumeração seletiva de bifidobactérias na presença de bactérias lácticas são formulados usando muitos ingredientes. Alguns dos agentes inibitórios destes meios precisam ser esterilizados por filtração, o que os torna meios de difícil preparo, envolvendo muito tempo do analista na sua elaboração. Meios que se encaixam nestas características são: NPLN-MRS (cloreto de lítio, ácido nalidixico, sulfato de neomicina e sulfato de paranimicina),>NNL-MRS (ácido nalidixico, neomicina, cloreto de lítio) e OG-MRS (oxgall e gentamicina). Há, por outro lado, meios como o ágar LP-MRS (cloreto de lítio e propionato de sódio) que podem ser formulados mais facilmente, visto que seus ingredientes não precisam ser esterilizados por filtração, em separado dos demais ingredientes.

Vinderola, Reinhemeir (2002); Dave, Shah (1996); Ghoddsi, Robinson (1996) e Lankaputhra et al. (1996) são alguns dos pesquisadores que sugeriram ou estudaram meios diferenciais e/ou seletivos para quantificação de *L. acidophilus*. Vinderola et al. (2000) estudaram os seguintes meios de cultura para enumeração de *L. acidophilus*: ágar SM (skim milk); ágar MRS tradicional, ágar MRS modificado com galactose, com trealose, ágar MRS adicionado de sais inibitórios e antibióticos (NPNL-MRS,>NNL-MRS, NKB-MRS, Bile,MRS, OG-MRS); ágar M17 tradicional e modificado com galactose.

Dave, Shah (1996) estudaram o ágar MRS-salicina e MRS-sorbitol para enumeração seletiva de *L. acidophilus*. Ghoddsi, Robinson (1996) avaliaram o ágar TPPY- PB (triptose proteose peptona prussian blue) para contagem diferencial de *L. acidophilus* em conjunto com *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Lankaputhra et al. (1996) avaliaram meios para enumeração seletiva de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp e indicaram o ágar Maltose-MRS para quantificação de *L. acidophilus* e o ágar NNLP-MRS para quantificação de *Bifidobacterium* sp.

A seguir são apresentadas quatro soluções estabelecidas em pesquisa para fermentos comerciais e alguns tipos de bactérias lácticas e probióticas quanto aos meios de cultura e métodos para obter a contagem diferencial ou seletiva destes micro-organismos. Os estudos a seguir foram selecionados por terem realizado as avaliações e seleções de meios de cultura em produtos (leites fermentados, queijos) com microbiotas mistas (fermentos lácticos e probióticos) e não apenas em sistemas modelo (meios de cultura e culturas puras).

Apresentando soluções: estudos de casos

Fachin et al (2008) aplicaram o ágar RCPB (Reinforced Clostridial Prussian Blue) e o ágar MRS-LP para enumerar seletivamente *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (fornecido por Danisco), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Bifidobacterium animalis* (fornecido por Christian Hansen). Este estudo avaliou a suplementação do meio RCPB pH5 com extrato de fígado desidratado e com os sais KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, visando melhorar a diferenciação de *Bifidobacterium* em iogurte durante a estocagem refrigerada e também avaliou a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurte usando o meio MRS-LP. A suplementação do ágar RCPB foi estudada com o intuito de melhorar seu desempenho. Quando se utiliza este meio para controle do número de células viáveis de *Bifidobacterium*, durante a estocagem refrigerada do iogurte, a contagem se torna difícil, pois as colônias apresentam diâmetro muito pequeno precisando do auxílio de um estereoscópio para sua contagem.

Fachin et al (2008) verificaram que o meio MRS-LP apresentou a mesma recuperação de células que o meio RCPB pH5, usado como padrão, após 30 dias de estocagem refrigerada do iogurte, sendo considerado uma boa opção para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurtes durante a estocagem refrigerada. O meio RCPB pH5 fortificado também apresentou a mesma recuperação de células de *Bifidobacterium* que o meio padrão RCPB pH5; entretanto, a adição de extrato de fígado desidratado aumentou consideravelmente o diâmetro das colônias de *Bifidobacterium*, tornando a diferenciação destas bastante fácil e confiável quando comparadas à sua diferenciação no meio RCPB pH5 sem a fortificação. A adição dos sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) não exerceu influência no desempenho do meio RCPB pH5. Os autores realizaram suas avaliações incubando as placas em anaerobiose a 37°C por 72 horas.

Zacarchenco, Massaguer-Roig (2004a) ao estudarem a enumeração de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* na presença de *L. acidophilus* e *Bif. longum* em ágar ST a 37°C por 48h em aerobiose e em ágar Lee a 37°C por 48h em microaerofilia verificaram que as metodologias não eram não seletivas para *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*. O ágar ST permitiu o crescimento do *L. acidophilus* e o ágar Lee permitiu o crescimento de *L. acidophilus* e *Bif. longum*. Buscando tornar as metodologias seletivas os autores estudaram a incubação a 30, 35, 37 e 45°C do ágar ST e ágar Lee, sendo o primeiro apenas em aerobiose e, o segundo, em aerobiose e microaerofilia. A 30 e 45°C, o *L. acidophilus* foi inibido no ágar ST e *L. acidophilus* e *Bif. longum* no ágar Lee. A recuperação de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* foi eficiente em todas as condições. Os ensaios foram realizados com suspensões isoladas e mistas dos micro-organismos. Foram realizados experimentos com leite fermentado adicionado dos probióticos liofilizados. A capacidade de cada meio de inibir os micro-organismos também foi verificada. Em outro trabalho Zacarchenco, Massaguer-Roig (2004b) avaliaram os meios modificados T-MRS (trealose MRS) e M-MRS (maltose MRS) e os meios seletivos Bile-MRS (ágar MRS adicionado de bile) e LP-MRS na quantificação de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na presença de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*. Suspensões microbianas isoladas e mistas foram utilizadas e incubadas a 37°C/ 72h em aerobiose em T, M e Bile-MRS. Todos os ensaios com LP-MRS foram realizados em anaerobiose. O ágar LP-MRS foi avaliado pela adição de quatro combinações de concentrações de cloreto de lítio e propionato de sódio (0,2; 0,4; 0,5 e 0,6% de LiCl e, respectivamente, 0,3; 0,6; 0,75 e 0,9% de propionato de sódio). A capacidade de cada meio inibir os micro-organismos também foi verificada. O ágar M-MRS possibilitou o crescimento de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*. A quantificação diferencial de *L. acidophilus* foi possível utilizando-se T e Bile-MRS, sendo este último mais prático e econômico. A quantificação diferencial de *Bif. longum* foi possível através do LP-MRS com 0,6g/l de LiCl e 0,9g/l de propionato de sódio. Os fermentos destes dois estudos foram fornecidos pela Danisco.

Trento et al (2009) utilizaram as seguintes culturas comerciais liofilizadas: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CSL JOINTEC X3); *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve* (CSL BIFI); *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (XP IDC 02); *Lactobacillus acidophilus* (LACID) que foram fornecidas pela empresa Kerry do Brasil. Neste trabalho as autoras utilizaram meios seletivos com o objetivo de favorecer o crescimento da bactéria de interesse, impedindo o crescimento das outras em amostras de iogurte e leites fermentados. Para enumeração de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* foi utilizado o meio ágar M17 e para

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* foi utilizado o meio MRS ágar glicose acidificado, ambas as metodologias contidas no "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (FRANK, YOUSEF, 2004). Para *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado ágar MRS adicionado de Clindamicina (0,1 mg/L) (CHR. HANSEN, 2007) e para a enumeração de *Bifidobacterium* spp foi utilizado o meio MRS suplementado com Cloreto de lítio (0,1%), Cisteína HCl (0,05%) e Dicloxacilina (0,5 mg/L) conforme descrito em Antunes et al. (2007). Após a inoculação, as placas de Petri foram incubadas em anaerobiose para o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve* a 37°C por 72 horas. Para o *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, a incubação das placas foi feita sob aerobiose, a 37°C durante 48 horas.

Vinderola, Reinheimer (2000) verificaram a efetividade dos meios de cultura LP-MRS e Bile-MRS para enumerar *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* e bifidobactérias de fermentos comerciais (não informado a marca). Também aplicaram estes meios para quantificar estes probióticos e bactérias lácticas do fermento de leites fermentados e queijos comerciais. Os ágaros Bile-MRS e LP-MRS foram confirmados como inibidores das bactérias lácticas dos fermentos. Como a aerobiose é um fator que inibe o crescimento de bifidobactérias, o ágar Bile-MRS é útil na contagem seletiva de *L. acidophilus* ou *L. casei*. Para bifidobactérias a contagem seletiva pode ser realizada no ágar LP-MRS mesmo se há *L. casei* porque uma enumeração diferencial entre ambos os micro-organismos é possível.

Normatização

No Brasil, a Instrução Normativa DAS/MAPA no 62/2003 não contempla método para contagem total ou seletiva de bactéria lácticas (BRASIL, 2003). No entanto, as normas recentes da International Dairy Federation IDF 149: 2010 (ISO 27205:2010) e IDF 180: 2006 (ISO 17792: 2006) trazem recomendações sobre metodologias para quantificação de bactérias lácticas e probióticas em fermentos e em produtos lácteos.

Na norma IDF 149: 2010 (ISO 27205:2010) para enumeração de *Lactobacillus acidophilus* é recomendado o ágar MRS adicionado de clindamicina e ciprofloxacina. Para *Bifidobacterium* spp é indicado o ágar TOS (transoligosacarídeo propionato) modificado pela adição de mupirocina. Para *Str. thermophilus* e lactococos a IDF 149 determinou o uso de Ágar M17 (pH 7,2 para lactococos e pH 6,8 para *Str. thermophilus*). Há, ainda nesta norma, recomendação de metodologias de enumeração de outros grupos de bactérias lácticas, probióticas, patogênicas e deteriorantes de produtos lácteos.

As normas da International Dairy Federation são bastante importantes para a indústria de laticínios de todo o mundo, sendo suas diretrizes utilizadas na elaboração de normas no Brasil. Espera-se que em futuro próximo a legislação brasileira também normatize as metodologias para controle de qualidade de fermentos lácticos e probióticos em produtos lácteos.

Considerações finais:

A viabilidade dos micro-organismos probióticos no produto final é um dos critérios de qualidade mais importantes, e deve manter-se alta (no mínimo 10⁶UFC/g) até o fim de sua vida útil. Além disto, há várias razões tecnológicas para a quantificação de bactérias lácticas nos produtos lácteos fermentados. Para realizar estes controles é preciso uma escolha segura e confiável dos meios de cultura utilizados para a contagem seletiva dos micro-organismos probióticos e do fermento láctico. Para esta escolha é necessário avaliar diferentes meios de cultura e condições de incubação, tanto para o produto em estudo como para as culturas puras, pois a presença de diferentes micro-organismos pode interferir nos resultados.

A escolha da metodologia para a contagem seletiva de cepas probióticas em combinação com fermentos lácticos depende de micro-organismos presentes e da matriz em questão. Como consequência a escolha do meio deve considerar cada caso, sabendo que um único meio não é adequado para uma diversidade de aplicações.

Com respeito a normatização de metodologias para enumeração de micro-organismos probióticos e do fermento láctico a legislação brasileira ainda não regulamentou a questão. Contudo, a International Dairy Federation tem recomendações sobre metodologias para quantificação de bactérias lácticas e probióticas em fermentos e em produtos lácteos úteis para o controle de qualidade das indústrias que fabricam produtos com estes micro-organismos.

Bibliografia

1. ANTUNES, A. E. C. et al. Enumeração seletiva e viabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em um novo produto lácteo fermentado. *Braz. J. Microbiol.*, vol. 38, n. 1, pp. 173-177, 2007.
2. ASHRAF, R.; SHAH, NP. Selective media for enumeration of lactic acid and probiotic organisms in dairy foods. In: Shah, NP; Cruz, AG; Faria, JAF (Eds.). *Probiotic and Prebiotic foods: Technology, stability and Benefits to Human Health*. 1a Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 535 p.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. D.O.U. 18/09/2003
4. CHARTERIS, W.P. et al. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*. v. 35, n. 1, p. 1-27, 1997.
5. CHR-HANSEN. Enumeration of *Lb. acidophilus* in fermented milk products – guidelines. technical bulletin p. 10, p. 1-3, 2007.
6. DAVE, R.J.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*. v. 7, s/ n. 11, p. 707- 715. 1997.
7. DAVE, R.J.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* sub-specie *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Journal of Dairy Science*. v. 79, n. 9,

p.1529-1536, 1996.

8.DAVIDSON, R.H. et al. Probiotic cultures survival and implications fermented frozen yoghurt characteristics. *Journal Dairy Science*. v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.

9.DUNCAN, SE; YAUN, BR; SUMNER, SS. Microbiological Methods for Dairy Products (Capítulo 9). In: Michael, H.; Frank, J.F. Standard Methods for the examination of Dairy Products. 17a edição. American Public Health Association. Washington, EUA. 2004

10.FACHIN, L. et al. Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB 12 in yoghurt after refrigerated storage. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 39, p. 357-361. 2008

11.FRANK, JF; YOUSEF, AE. Tests for groups of microorganisms (Capítulo 8). In: Michael, H.; Frank, J.F. Standard Methods for the examination of Dairy Products. 17a edição. American Public Health Association. Washington, EUA. 2004

12.GHODDUSI, H.B.; ROBINSON, R.K. Enumeration of starter cultures in fermented dairy products. *Journal of Dairy Research*. v. 63, n. 1, p. 151-158, 1996.

13.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF 149:2010 (ISO 27205:2010). Fermented milk products – Bacterial starter cultures – Standard of identity. 1a edição. Fev, 2010.

14.INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF 180: 2006 (ISO 17792: 2006). Milk, milk products and mesophilic starter cultures – Enumeration of citrate-fermenting lactic acid bacteria – colony count technique at 25oC. 1a edição. Ago, 2006.

15.KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J.C.; WHITE, C.H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. *Journal Dairy Science*. v. 84, n.3, p. 543 – 550, 2001.

16.LAHTINEN, S.J. et al. Enumeration and viability assessment of probiotic bacteria. In: Shah, NP; Cruz, AG; Faria, JAF (Eds). Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health. 1a Ed. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2011, 545 p.

17.LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. *Food-Australia*. v. 48, n. 3, p. 113-118, 1996

18.LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium-chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. v. 75, n. 5, p.1192 - 1196, 1992.

19.LEE, S.V. et al. An agar medium for differential enumeration of yoghurt starter bacteria. *Journal of Milk and Food Technology*. v. 37, n. 5, p. 272 – 276, 1974.

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

21.MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *Journal Food Protection*. v. 56, n. 8, p. 731-733, 1994.

22.PAYNE, J.F.; MORRIS, A.E.J.; BEERS, P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp in milk. *Journal of Applied Microbiology*. v. 86, n. 2, p. 853-858, 1999.

23.RADA, V., KOC, J. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products.

Milchwissenschaft. v. 55, n. 2, p. 65-67. 2000.

24.ROY, D. Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. v. 69, s/ n. 167 – 182, 2001

25.RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. *Milchwissenschaft*. v. 52, n. 7, p. 390 – 394, 1997.

26.SAMONA, A., ROBINSON, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*. v. 44, n.3, p. 64-66. 1991.

27.SANDERS, M.E. Probiotics. *Food Technol.*, Chicago, v.53, n.11, p.67-77, 1999.

28.SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. v. 83, n. 4, p. 894 – 907, 2000

29.SHAH, N.P. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milks products: a review. *Milchwissenschaft*. v. 52, n. 2, p. 72-76, 1997

30.SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo, SP: Varela, 2010.

31.TENÓRIO, CGMSC. Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* LA5 e aplicação em queijo prato. Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. Campinas. 2012.

32.TRENTO, F.K.H.S. et al. Contagem de bactérias lácticas e probióticas em diferentes formulações de leites fermentados contendo ou não probióticos, após o processamento e durante a estocagem. In: Anais do 26º Congresso Nacional de Laticínios 2009

33.VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal Dairy Science*. v. 85, n. 4, p. 721-729, 2002.

34.Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*. v. 10, p. 271-275. 2000

35.VINDEROLA, C.G; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*. v. 33, p. 97-102, 2000

36.VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999

37.ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* in the presence of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. *Milchwissenschaft*. v. 59, n. 7/8, p. 370-372. 2004a

38.ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft*. v. 59. n. 5/6. p. 258-261 2004b