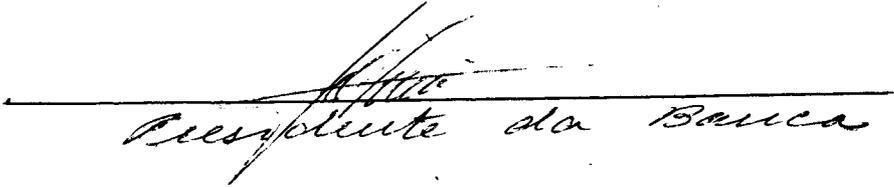


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Lúcio Alberto Forti Antunes e aprovada pela Comissão Julgadora em 22.07.85.  
Campinas, 22 de julho de 1985.

  
Presidente da Banca

CARACTERIZAÇÃO DA FLORA LÁTICA DE LEITE CRU

LÚCIO ALBERTO FORTI ANTUNES

Prof.Dr. José Sâtiro de Oliveira  
Orientador

12/85

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de "DOUTOR" em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS - SÃO PAULO

1985

À Olinda Maria, ao Luís Gustavo  
e àquele que está por chegar,  
com amor,

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

. Ao Prof. Dr. José Sático de Oliveira, pela orientação, amizade e apoio demonstrados durante a execução deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais e irmãos, pelo amor e incentivo sempre recebidos.

. À Fundação Universidade Estadual de Londrina, especialmente aos colegas do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, pela oportunidade concedida.

. À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

. À colega Eng<sup>a</sup> Sandra Garcia, pela valorosa troca de informações.

. À Maria José, Ana Lourdes, Ana Maria, Rosana, Mariângela, Paulo, Jair, Fernando e Juan, pela colaboração e amizade na convivência no laboratório.

. Ao meu pai, Prof. José Benedito Pinto Antunes, pela revisão ortográfica.

. À Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), pela colaboração nas cópias deste trabalho.

. A Secção de Leite e Derivados do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), pelas culturas fornecidas.

. À Companhia Leco de Produtos Alimentícios, pela facilidade na obtenção das amostras.

. A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

. A Deus, por tudo.

## ÍNDICE

RESUMO.....	ix
SUMMARY .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
Qualidade Microbiológica das Amostras .....	3
A Microflora do Leite .....	5
O Grupo Lático .....	7
Características microbiológicas e nutricionais .....	8
Isolamento dos Microrganismos do Grupo Lático .....	15
Uso de sorbatos como agentes inibidores .....	23
Ação efetiva dos sorbatos .....	24
Bactérias Láticas como Fermento Industrial .....	26
MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
Amostras .....	32
Microrganismos referência .....	32
Diluições .....	32
Leites utilizados .....	34
Contagem total .....	34
Contagem de coliformes totais .....	34
Contagem de enterococos .....	34
Contagem de microrganismos do grupo lático .....	35

Leitura das contagens .....	35
Isolamento de microrganismos lácticos .....	35
Isolamento de <i>Propionibacterium</i> e <i>Leuconostoc</i> .....	36
Purificação dos isolados lácticos .....	36
Estocagem e manutenção das culturas isoladas .....	37
Determinação de acidez .....	37
pH .....	37
Acidez titulável .....	37
Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas .....	38
Atividade acidificante .....	38
Tempo de geração.....	38
Atividade proteolítica .....	39
Seleção de isolados para uso como fermento .....	39
Curvas de acidificação .....	39
Resistência ao cloreto de sódio .....	40
Identificação dos isolados .....	40
 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	 44
Qualidade Microbiológica das Amostras .....	44
Desenvolvimento do Ágar APT-S .....	50
Isolamento e Identificação da microflora .....	58
Caracterização dos isolados .....	62
Comportamento em diferentes temperaturas .....	63
Atividades acidificantes .....	70
Tempo de geração .....	75
Atividades proteolíticas .....	77
Potencialidade de utilização como fermentos lácticos .....	80

CONCLUSÕES .....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
APÊNDICE .....	102

## ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1.	Resultados médios, em unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL), das contagens total, de coliformes e estreptococos fecais, das amostras de leites tipos B e Especial.....	45
QUADRO 2.	Faixas de variações, frequências e percentagens de distribuição das contagens microbianas total, de coliformes e de estreptococos fecais, em amostras de leite tipo B cru .....	47
QUADRO 3.	Faixas de variações, frequências e percentagens de distribuição das contagens microbianas total, de coliformes e de estreptococos fecais, em amostras de leite tipo Especial .....	48
QUADRO 4.	Resultados exemplificativos, em ufs/mL, das análises de contagem total e contagem em ágar APT de amostras de leites tipo B e Especial, em ufc/mL .....	52
QUADRO 5.	Resultados das contagens de culturas puras de microrganismos, ufc/mL, do grupo láctico nos meios de cultura APT e APT-S .....	55
QUADRO 6.	Resultados exemplificativos do comportamento da contagem total e contagem em ágar APT e ágar APT-S, em ufc/mL .....	57

QUADRO 7.	Frequência de isolamento e porcentagem relativa de bactérias lácticas isoladas de leite cru, com a utilização do ágar APT-S .....	58
QUADRO 8.	Distribuição dos microrganismos, segundo a capacidade de crescimento a 21°, 32° e 42°C, usando inóculo de 1,0% e 24 horas de incubação.....	65
QUADRO 9.	Resultados médios, por espécie isolada, do pH desenvolvido em leite estéril, após 24 hs de incubação com inoculação de 1,0% .....	69
QUADRO 10.	Dados do pH desenvolvido pelos microrganismos referência nas temperaturas de 21°, 32° e 42°C, com 1,0% de inóculo e 24 hs de incubação .....	71
QUADRO 11.	Médias das atividades acidificantes, por espécie isolada, com inoculação à razão de 1,0% e incubação a 30°C ou 42°C .....	73
QUADRO 12.	Resultados médios do tempo de geração, por espécie, durante 6hs de incubação a 30°C .....	76
QUADRO 13.	Atividades proteolíticas, em µg de tirosina/mL, de algumas culturas representativas de isolados segundo a temperatura de crescimento .....	79

QUADRO 14.	Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio sobre a atividade acidificante de bactérias lácticas .....	84
QUADRO 15.	Resultados das contagens microbianas total, de coliformes, de estreptococos fecais, em ágar APT e ágar APT-S, das amostras de leite cru, expressos em ufc/mL .....	103
QUADRO 16.	Resultados da atividade acidificante e tempo de geração das 182 culturas lácticas isoladas .....	106

## ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1.	Microrganismos utilizados como referência .....	33
FIGURA 1.	Chave para a identificação de cocos lácticos ....	42
FIGURA 2.	Chave para a identificação de bacilos lácticos ..	43
FIGURA 3.	Curvas de acidificação de algumas culturas com potencialidade de uso como fermento <u>l</u> á tico, 2% de inóculo .....	82

## RESUMO

Existe, no Brasil, uma carência de informações a respeito da flora lática do leite cru, tal como chega na plataforma de recepção da indústria. Assim, com o objetivo de caracterizar essa flora, foram isoladas, a partir de 50 amostras de leite cru, 300 culturas de bactérias láticas.

Para a realização dos isolamentos foi utilizado o meio de cultura ágar APT-S, desenvolvido, neste trabalho, a partir do ágar APT, pela incorporação de 0,1% de sorbato de potássio, 0,5% de ágar e concomitante redução do pH para 6,0, pela adição de ácido lático. Comprovou-se que este meio teve um bom comportamento para contagem e isolamento dos microrganismos do grupo lático, apresentando uma eficiência seletiva nas condições utilizadas. Nenhuma inibição sobre culturas puras de bactérias láticas foi detectada.

Dentre os isolados, *S. lactis* apresentou uma expressiva predominância, correspondendo a 79,20% do total. As demais espécies isoladas compreenderam: *S. lactis* subsp *diacetylactis* (6,55%), *S. cremoris* (6,55%), *L. casei* (4,40%), *L. lactis* (2,20%) e *Leuconostoc cremoris* (1,10%). De todas as espécies isoladas, *S. lactis* foi encontrado em cem por cento das amostras, enquanto que as demais tiveram um índice de ocorrência inferior a 15%. Tais resultados, possivelmente estão relacionados com as condições ecológicas e de manuseio na fase de produção do leite no país.

Na caracterização das culturas isoladas foram determinados: comportamento frente a diferentes temperaturas, atividades acidificantes, tempo de geração e atividades proteolíticas. Foi constatado que várias culturas mostraram capacidade de crescer

igualmente nas temperaturas de 21°, 32° e 42°C. Entre os isolados, vários apresentaram atividade acidificante superior àquela normalmente descrita para os microrganismos mesófilos.

A metodologia empregada no presente trabalho mostrou-se adequada para o isolamento e seleção do microrganismos lácticos com potencialidade de serem empregados como fermentos industriais.

## SUMMARY

There is very little information about the lactic flora of the fresh raw milk by the time it arrives at the reception platform in the dairy industry in Brazil. For this reason, the present research work was undertaken to study 300 cultures of lactic acid bacteria isolated from 50 raw milk samples.

The isolation was performed on APT-S agar medium which was developed during this research by the adaptation of the APT agar through the incorporation of 0.1% of potassium sorbate, 0.5% of bacto agar and pH adjustment to 6.0 with lactic acid. The resulting culture medium proved to be quite suitable for the enumeration and isolation of typical lactic microorganisms. There was a good selectivity under the conditions adopted and no inhibition was detected when tested with known pure cultures of lactic acid bacteria.

Among the isolates, *S. lactis* shows a predominance of 79.20% of the total. The other species were: *S. lactis* subsp *diacetylactis* (6.55%), *S. cremoris* (6.55%), *L. casei* (4.40%), *L. lactis* (2.20%) and *Leuconostoc cremoris* (1.10%). *S. lactis* was also present in one hundred percent of the samples, while the others had occurrence values below 15%. These results indicate a possible influence of the production conditions mainly in aspects related to climate and way of handling the raw milk in this country.

The characterization of the isolated cultures included different incubation temperatures, acid production activity, generation time and proteolytic activity. Several isolates presented regular growth in all three temperatures tested: 21, 32 and 42°C.

Also, were detected cultures with higher acid production activity than the results indicated in the literature for similar microorganisms.

The isolation sequence utilized in the present research work indicated an adequate procedure for isolation and selection of lactic acid bacteria with good potencial for being used as starter cultures in the dairy industry.

## INTRODUÇÃO

A utilização das bactérias lácticas pelo homem data dos mais remotos tempos, sendo que, ainda hoje, constituem um dos grupos de microrganismos de maior importância dentro da microbiologia de alimentos. Assim, sua utilização é imprescindível em alguns processos tecnológicos envolvendo a conservação de alimentos, como leite e hortaliças. No caso do leite, especificamente, a ação das diferentes bactérias lácticas contribui de modo decisivo na elaboração de diversos derivados do leite, como os queijos e os leites fermentados.

Os microrganismos lácticos apresentam como habitat natural os vegetais. Porém, é com o leite que esses organismos estão mais intimamente relacionados, pois a sua presença em leite cru é devida a contaminações relacionadas com vários fatores, como por exemplo os próprios animais, o homem, os utensílios, etc. Dessa forma, reveste-se de fundamental importância o conhecimento das características dessa flora láctica, visto que podem fornecer subsídios importantes na elucidação da qualidade da matéria prima, bem como para processos tecnológicos de transformação do leite.

Em países de climas frio ou temperado, vários estudos têm sido feitos procurando caracterizar bactérias lácticas de leite cru. Porém, muito pouco se sabe sobre o comportamento dessa flora em países de clima tropical, e, especialmente, no Brasil. Por outro lado, os vários estudos apresentados na literatura, geralmente referem-se a grupos específicos de microrganismos lácticos, não se abordando a flora como um todo.

A par da sua importância, as bactérias lácticas, por serem organismos nutricionalmente muito exigentes, requerem meios

de cultura muito ricos, dificultando, assim, a utilização de meios seletivos que visam a incluir somente os microrganismos tipicamente láticos.

Em vista disso, objetivou-se, no presente trabalho, desenvolver um meio de cultura e uma metodologia que proporcionassem uma maior seletividade no isolamento dos microrganismos láticos, permitindo, assim, estudar e caracterizar a flora lática do leite cru nacional na forma em que ela naturalmente se apresenta, tanto em termos qualitativos como quantitativos.

Qualidade Microbiológica do Leite

A qualidade do leite está associada, de uma forma geral, com a carga microbiana presente no produto. Segundo HUHN et alii (56), no Brasil, o leite "in natura" apresenta baixa qualidade, sendo que esse fator está relacionado com a influência das estações do ano, às práticas de produção e manuseio a nível de fazenda, localização geográfica, temperatura prevalente do leite e a distância de transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do leite.

Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, qualidade do ar dos estábulos, estado de sanidade dos ordenhadores e dos animais e, principalmente, utensílios não perfeitamente higienizados, também contribuem de modo decisivo no estado microbiológico do leite (28,56,60).

COVARRUBIAS e HAVERBECK (28) observaram que, de uma forma geral, existe um baixo nível sanitário no momento da ordenha, já que encontraram resultados de contagens totais da ordem de  $10^4$  ufc/mL, o que fez com que, no momento da recepção industrial as contagens do leite estivessem por volta de  $10^7$  ufc/mL.

HUHN et alii (52) comprovaram que o emprego de ordenha mecânica nem sempre diminui a carga microbiana do leite cru. Esses autores observaram que, com ordenha manual, a carga total média de microrganismos, a nível de fazenda, foi de  $1,48 \cdot 10^5$  ufc/mL, e a nível de plataforma de  $1,55 \cdot 10^6$  ufc/mL. Já através de ordenha mecânica, a carga microbiana foi de  $3,80 \cdot 10^5$  ufc/mL a nível

de fazenda  $8,51.10^5$  ufc/mL a nível de plataforma de recepção. COSTA et alii (27) também observaram elevadas contagens em leites obtidos por ordenha mecânica, sendo que, nesse estudo, as contagens de coliformes sempre suplantaram àquelas de leite ordenhado manualmente, numa clara alusão a uma possível falta de cuidados higiênicos-sanitários com o equipamento de ordenha. Resultados semelhantes de contagens de leite cru foram obtidos por MUIR et alii (79) que verificaram, em leites destinados ao beneficiamento, uma variação na contagem total de mesófilos entre  $1,00.10^5$  e  $4,99.10^5$  ufc/mL, e para bastonetes Gram negativos, entre  $1,00.10^4$  e  $4,95.10^4$  ufc/mL.

Em trabalhos realizados na região de Campinas, São Paulo (73,113), foi observado que a população microbiana total de leite cru mostrou-se entre  $10^6$  e  $10^8$  ufc/mL. Jessouroum, citada por BARROS et alii (5), observou em leite cru industrial, na cidade de São Paulo, variações de  $1,4.10^4$  a  $3,0.10^8$  ufc/mL para contagem total e de  $1,5.10^3$  a  $1,1.10^6$  ufc/mL para as contagens de coliformes totais.

BARROS et alii (5), analisando leite cru destinado à pasteurização em São Paulo, S.P., obtiveram resultados entre  $2,0.10^6$  e  $6,9.10^7$  ufc/mL para contagens de microrganismos mesófilos totais e  $3,6.10^6$  e  $1,1.10^6$  ufc/mL para os coliformes totais.

KARIN e KACHANI (65) estudando a flora de leite cru, verificaram que a maioria das amostras analisadas mostrou contagens totais entre  $5,10.10^6$  e  $3,00.10^7$  ufc/mL e que predominavam bastonetes esporulados, micrococos e coliformes sobre a flora acidificante. Por outro lado, GAHLOT et alii (42) constataram que 62,35% da microflora de leite cru era constituída por microrganismos formadores de ácido e 8,27% por proteolíticos, e essa relação

permanecia no produto, mesmo após ser pasteurizado.

Com o leite cru apresentando contagens tão elevadas, fica fácil de se prever que a qualidade do produto pasteurizado oferecido ao consumidor seja igualmente prejudicada, e é o que realmente tem acontecido. OLIVEIRA (80), em 1973, observou que os níveis totais de microrganismos em leites pasteurizados comercializados na cidade de Campinas, S.P., estavam na faixa de  $10^3 - 10^6$  ufc/mL. Em trabalhos posteriores, MACHADO (73), OLIVEIRA e BORGES (81) e VILLAFANE (113) obtiveram resultados semelhantes, para a mesma região, sendo que os valores médios se elevaram para a faixa de  $10^4 - 10^6$  ufc/mL. GOLDONI et alii (46) conseguiram resultados de  $10^5 - 10^6$  ufc/mL para contagens totais e  $10^3 - 10^5$  ufc/mL para coliformes totais, em leite pasteurizado e comercializado na cidade de Botucatu, S.P.. Brum e Mussoli, citados por GOLDONI et alii (46), obtiveram, na região extremo sul do Brasil, resultados idênticos para contagem total, porém, os coliformes totais apresentaram resultados menores que 10 ufc/mL, em 79,9% das amostras analisadas. Já em São Paulo BARROS et alii (5) relatam que a contagem total do leite pasteurizado esteve entre 10 e  $10^4$  ufc/mL e os coliformes totais estiveram sempre abaixo de 10 ufc/mL.

Esses dados vêm corroborar com a afirmação de que é difícil melhorar significativamente a qualidade e a conservação do leite e seus derivados partindo-se de um leite que em estado cru apresenta carga microbiana muito elevada (28, 46).

#### A Microflora do Leite

O leite, por ser um alimento com alto teor de umidade e rico em nutrientes importantes, como: proteínas, carboidratos,

lipídeos, sais minerais, etc, é um excelente meio de cultura para muitos microrganismos. A quantidade e o tipo de carga microbiana passível de estar presente no leite depende de uma série de fatores, tais como: cuidados tomados na ordenha, limpeza e manuseio de utensílios, higienização do animal, do ordenhador e do estábulo, condições de saúde do animal e do ordenhador, condições de transporte, etc (41,62).

Embora o leite seja originalmente estéril, sua microflora consiste daqueles organismos que podem estar presentes no úbere, superfície externa dos animais, equipamentos, solos, etc (41,60,98). Pelas condições de manuseio e armazenamento a predominância da flora é de organismos Gram-positivos, embora bolores, leveduras e bactérias Gram-negativas possam ser vistas junto com as bactérias Gram-positivas (62). Segundo MACHADO (73), 70% dos microrganismos isolados de leite são cocos Gram-positivos, sendo o gênero *Streptococcus* altamente predominante em amostras de leite cru, e o gênero *Micrococcus* predominante em leite pasteurizado. Ambos os gêneros constituíram 50% dos cocos Gram-positivos isolados em cada tipo de leite.

As bactérias mais importantes que podem ser encontradas no leite pertencem às famílias: *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Bacillaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Achromobacteriaceae* e *Brucellaceae* (9,41,62), sendo que, segundo as condições de armazenamento, pode ocorrer prevalência de um ou mais tipo microbiano (41).

Pertencentes àquelas famílias de ocorrência no leite, os gêneros de microrganismos mais comumente citados como componentes da microflora do leite cru, quer sejam patogênicos ou não, são:

*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Nocardia*, *Brucella* e os coliformes (9,16,41,60,62,73).

### O Grupo Lático

Dentro da escala evolutiva dos microrganismos, as bactérias lácticas se encaixam na linha dos actinomicetos, os quais são divididos em três grupos principais. O primeiro grupo compreende as bactérias lácticas e os micrococcos, com os seguintes gêneros representantes: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Sarcina* (16,110). Esse grupo é caracterizado por células regulares esféricas ou em bastões, reprodução por fissão binária (110) e é de maior importância prático-industrial. O segundo grupo, caracterizado por organismos unicelulares, cujas células apresentam tendência a formas variáveis, são irregulares ou miceliais, com reprodução por fragmentação do micélio, é composto pelas bactérias corineformes (*Corynebacterium*, *Arthrobacter* e *Propionibacterium*) e pelos proactinomicetos (*Bifidobacterium*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Geodermatophilus*) (16,110), das quais os gêneros *Propionibacterium* e *Bifidobacterium* são aqueles utilizados na produção de alguns produtos fermentados de leite. O terceiro grupo, composto por organismos desprovidos de atividade láctica, apresenta os gêneros: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinophanes*, *Streptosporangium* e *Thermoactinomyces* (110), com diferentes atividades metabólicas.

O conceito de grupo láctico apresentando as bactérias lácticas como uma entidade, surgiu das características de fermentação e coagulação do leite por parte desses microrganismos, e foi desenvolvido no início do século (59). Desde então, uma série de relações com outros microrganismos foi desenvolvida, e vários grupos foram criados, em que tomaram parte microrganismos muito diferentes, como: micrococcos proteolíticos, coli-aerogenes, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, etc (59). Hoje, o grupo láctico, mesmo reduzido em muito em relação àquele inicial, compreende uma gama muito grande de microrganismos altamente distribuídos pela natureza, podendo ter como habitat: vegetais, leite, mucosas intestinais de mamíferos e solo, além de água por contaminação via animais e plantas (16,35,83,98). A própria presença desses microrganismos no leite se deve a contaminação durante a ordenha e manuseio do produto (83). Os microrganismos lácticos também podem ser encontrados em forragens enciladas, vegetais em fermentação (83) e em produtos cárneos, principalmente os embalados à vácuo (59).

Os microrganismos do grupo coli-aerógenes que antigamente eram agrupados como láctico, atualmente são considerados como microrganismos "pseudo-lácticos" (59).

### Características microbiológicas e nutricionais

As bactérias lácticas, reunidas dentro do conceito atual de grupo láctico, são organismos em forma de cocos ou bastonetes, essencialmente Gram-positivos; anaeróbios facultativos, que podem crescer na superfície de meios sólidos; imóveis; não esporulados nem redutores de nitrito, que pela inabilidade de sintetizarem heme-proteínas são catalase-negativos, geram ATP (tri-fostato

de adenosina) através da fermentação de carboidratos, onde o ácido lático aparece como principal - e às vezes único - produto final (9,15,35,83,109,110). Exigem complexos fatores de crescimento, requerendo, invariavelmente, vitaminas do complexo B e um número considerável de aminoácidos, tendo, dessa forma, de serem cultivados em meios sintéticos que contenham peptona, extrato de levedura ou outras substâncias de digestão de materiais animais ou vegetais, aliadas a carboidratos fermentescíveis (110), purinas e pirimidinas (15).

Quando cultivadas em meios de cultura muito ricos, as bactérias lácticas formam colônias relativamente pequenas (devido ao baixo rendimento energético de seu metabolismo fermentativo), nunca pigmentadas, com uma aparência esbranquiçada, em consequência da ausência de citocromos (16,110). Algumas espécies podem produzir colônias largas quando crescidas em meios contendo sacarose, como resultado da síntese intensa de polissacarídeos, especialmente dextranas e levanas (110).

As bactérias lácticas são microrganismos que obtêm energia através de metabolismo fermentativo, podendo utilizar diversos carboidratos, os quais, se não forem monossacarídeos, precisam ser previamente hidrolisados a glicose (83). Com base na utilização desses carboidratos, as bactérias lácticas podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas (9, 15,16,59,83,110).

As bactérias homofermentativas degradam os carboidratos fermentescíveis através da via metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas, gerando unicamente ácido lático, apresentando um saldo energético de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose fermentada (15,83,110). As bactérias heterofermentativas, por outro lado, por utilizarem a via das hexoses monofosfato ou via das pentou

ses, formam quantidades equimoleculares de ácido lático, etanol e  $\text{CO}_2$ , podendo ainda aparecer em quantidades menores: ácido acético, ácido fórmico e glicerol, oriundos de vias metabólicas alternativas (15,110). Apresentam um saldo positivo de somente uma molécula de ATP por molécula de glicose fermentada (15). Os estreptococos e a maioria dos lactobacilos são homofermentativos, enquanto alguns lactobacilos e os leuconostoc são heterofermentativos (9,23,110).

O ácido lático resultante do metabolismo das bactérias lácticas pode ser de diferentes tipos: D(-), L(+), DL ou uma mistura deles (24,70,100).

Algumas linhagens das bactérias lácticas podem desenvolver-se utilizando  $\text{O}_2$ , através da mediação do sistema flavoproteínas-oxidase, produzindo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15,83). Nenhuma molécula de ATP é produzida (15).

Segundo LAWRENCE et alii (70), o metabolismo das bactérias lácticas somente passou a ser compreendido realmente, do ponto de vista bioquímico, após a proposição do sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferase (PEP-PTS). Através desse sistema, a lactose, e talvez glicose e galactose, ao serem transportadas através da membrana celular são fosforiladas pelo sistema PTS às expensas de PEP, sendo, então, metabolizadas no citoplasma celular (9,24,70,110). Enquanto a glicose-6-fosfato inicia diretamente as vias metabólicas dentro da célula, a lactose-fosfato é hidrolizada a glicose e galactose-6-fosfato (24,70). A galactose pode ser metabolizada como galactose-6-fosfato pela via da tagatose-6-fosfato até gliceraldeído-3-fosfato ou dihidroxiacetona-fosfato (24,70), ou então, após ser fosforilada pelo sistema PEP-PTS, ser convertida a glicerol-1-fosfato e metabolizada pela via glicolítica (70).

Os microrganismos lácticos são, sabidamente, fastidiosos (24,100). Assim, além da presença de carboidratos fermentescíveis, requerem outros fatores de crescimento, normalmente compostos nitrogenados livres e vitaminas (24,103). Durante o seu desenvolvimento em leite, os microrganismos lácticos são beneficiados, também, pelos aminoácidos livres presentes no leite (24,103). No entanto, somente 8 a 16% das células que estão presentes em leites coagulados conseguem se desenvolver todo o tempo, utilizando esses aminoácidos como fonte nitrogenada (68). Por isso, os microrganismos necessitam de promover proteólise para que existam peptídeos suficientes para o crescimento de altas densidades celulares, em estágio máximo de atividade, podendo, inclusive, levar o leite à coagulação (24,70,68,105).

As bactérias lácticas realizam proteólise por ação de proteinases extracelulares e intracelulares ligadas à parede celular bacteriana (9,24,68,70,78). Os peptídeos após serem transportados através da parede celular podem ser hidrolizados por diversas peptidases contidas no envoltório celular e no interior da célula (68).

Os estreptococos lácticos podem apresentar diferentes comportamentos como culturas em leite, uma vez que a capacidade de obtenção de compostos nitrogenados essenciais para o seu crescimento é diferente (68,105). Por isso, têm-se culturas diferenciadas em rápidas ("fast") e lentas ("slow"), em função do seu desenvolvimento. Denominam-se de rápidas as culturas que crescem normalmente em leite, coagulando-o após 18 horas de incubação a 21°C, e de lentas as que, a 21°C, somente coagulam o leite após 48 horas de incubação (23,24,70). As linhagens lentas somente apresentam essa característica por não possuírem, ou terem perdido, o sistema de proteinases, sendo, então, denominadas de  $\text{Prt}^-$  ;

enquanto que as que mantêm o sistema proteolítico são Prt<sup>+</sup> (78) . No entanto, se se fornecerem os resíduos peptídicos necessários às células Prt<sup>-</sup>, elas se comportam de modo semelhante às Prt<sup>+</sup> (23,78, 99).

Os mutantes Prt<sup>-</sup> podem aparecer de modo espontâneo (78), podendo chegar, dentro de uma mesma linhagem, a predominar em toda cultura (94). Atualmente os mutantes Prt<sup>-</sup> têm recebido atenção especial no campo laticinista internacional, chegando mesmo a serem indicados como culturas preferenciais na fabricação de queijos, devido a três características vantajosas que apresentam: redução do potencial de amargor, o qual está associado com algumas linhagens Prt<sup>+</sup>; maior resistência a bacteriófagos e maior rendimento do produto (24,54,70,78). Segundo HUGGINS (54), esses potenciais benéficos podem ser aumentados pelo emprego de grandes quantidades de inóculos (2 a 8 vezes o normal), somente que isto se torna um fator economicamente indesejável. No entanto, o potencial para a utilização de misturas apropriadas de Prt<sup>-</sup> e Prt<sup>+</sup> pode ser mais desejável e oferecer algumas vantagens adicionais, como melhor controle do desenvolvimento de sabor e aroma e aumento de rendimento. Algumas culturas consideradas muito boas em termos de rendimento compõe-se de até 50% de células Prt<sup>-</sup>.

Mais de 50 espécies de microrganismos compõe o grupo de bactérias lácticas, das quais 36 pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, 6 ao gênero *Leuconostoc* e 8 ao *Pediococcus*, agrupadas em 2 famílias, onde o gênero *Lactobacillus* pertence a família *Lactobacillaceae*, e os outros três à família *Streptococcaceae* (9,16,110).

- *Streptococcus*: por ser um gênero que reúne organismos bem diferentes, tem-se procurado subdividi-lo em vários grupos. Segun-

do OTTOGALLI et alii (85), os grupos estabelecidos pelos critérios fisiológicos de Sherman (viridans, piogenes, láctico e enterococos) estão ultrapassados, sendo, agora, agrupados em: orais, fecais, piogênicos e lácticos. Desses, o grupo láctico representa maior importância industrial, sendo composto por: *Streptococcus lactis*, *S. lactis* subsp *diacetylactis*, *S. cremoris* e *S. thermophilus* (26).

Embora as células de *S. lactis* sejam as mais comuns de serem encontradas, predominando amplamente em todos os isolados a partir de qualquer substrato (26,70,73,98), a indústria laticínica de transformação tem-se interessado nos últimos anos pelo *S. cremoris*, uma vez que esse microrganismo não produz defeitos de amargor e de sabor de fruta em queijos, fato que algumas linhagens de *S. lactis* podem fazer, e, também, por serem mais resistentes aos bacteriófagos que os integrantes das demais espécies (24,70,94). No entanto, *S. cremoris* aparece sempre em número muito menor que *S. lactis* em isolados de leite cru, permanecendo, mesmo, seu habitat natural e as relações ecológicas com outros streptococos ainda muito pouco conhecidas (70,98). Sabe-se, porém, que em culturas mistas ocorre uma predominância do *S. cremoris* sobre *S. lactis* e *S. diacetylactis*, provavelmente pelo fato de serem mais resistentes ao ataque por parte dos bacteriófagos (70).

*S. lactis* e *S. lactis* subsp *diacetylactis* possuem células esféricas, pequenas, que aparecem isoladas, aos pares ou em pequenas cadeias. São mesófilos típicos que crescem a 10°C mas não a 45°C, e pertencem ao grupo sorológico N de Lancefield (16, 41). Diferenciam-se pelo fato de *S. lactis* subsp *diacetylactis* fermentar citrato gerando diacetil, acetoína e CO<sub>2</sub> (15,16,100). Já *S. cremoris* pode formar cadeias mais longas, quando crescidas em leite; também é mesófilo, entretanto não se desenvolve a 40°C

(16,100). Diferencia-se das outras espécies pelo fato de não produzir amônia a partir de arginina, não crescer a pH 9,2 e nem em meio contendo 4% de cloreto de sódio (15,16,83). O *S. thermophilus* por sua vez, apresenta como temperatura ótima de crescimento a faixa de 40°-45°C, podendo crescer até 50°C, porém nunca a 53°C; é inibido por uma concentração de 2,0% de NaCl e não forma amônia de arginina, nem ácido de maltose (16,100).

Os estreptococos lácticos são amplamente utilizados pela indústria laticinista como fermentos lácticos para os mais diversos tipos de queijos, onde são responsáveis por características de acidificação e/ou textura da massa, e na produção de diferentes tipos de leites fermentados (24,29,48,54,70,100,111).

- *Leuconostoc*: os microrganismos arrançados dentro desse grupo possuem células esféricas pareadas ou em cadeias, podendo ser considerados como estreptococos heterofermentativos, devido ao seu metabolismo. Possuem pouca atividade em leite, sendo que a espécie de maior importância industrial utilizada como agente aromatizante, *Leuconostoc cremoris*, é a única que pode coagular o leite. Quanto à temperatura de desenvolvimento são mesófilos típicos (16).
- *Pediococcus*: este gênero apresenta como importante característica o fato de, pela divisão celular ortogonal, apresentar arranjos celulares na forma de tétrades. Geralmente está associado a vegetais e a defeitos em bebidas alcoólicas, raramente aparecendo em leites e derivados (9,16).
- *Lactobacillus*: em contraste com os estreptococos, este gênero contém uma maior heterogeneidade entre suas espécies componentes. A maioria delas é homofermentativa, embora algumas sejam heterofermentativas(15). O gênero *Lactobacillus* é dividido em 3 subgrupos

principais: *Streptobacterium*, *Thermobacterium* e *Betabacterium* (9,16), cujos nomes, embora não reconhecidos oficialmente como gêneros servem, de modo prático, à subdivisão do gênero (15). Os dois primeiros subgrupos reúnem espécies homofermentativas, enquanto que no último estão agrupadas as heterofermentativas (16,59,110).

Os microrganismos pertencentes ao subgrupo *Streptobacterium* são capazes de crescer a 15°C, porém não a 45°C, apresentando faixa ótima de desenvolvimento entre 28°C e 32°C. As espécies mais importantes são *L. casei* e *L. plantarum*, usados, respectivamente, em queijos de massa semi-cozida, e, forragens e vegetais em fermentação (16,67,83).

O subgrupo *Thermobacterium*, onde estão os organismos que crescem a 45°C, mas não a 15°C, com temperatura ótima entre 37°C e 45°C, reúne as espécies industrialmente mais importantes, como: *L. helveticus*, *L. yogurti*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* e *L. leichmanii*, que são utilizadas no preparo de leites fermentados e queijos de massa cozida (16,67,83).

Os microrganismos do subgênero *Betabacterium* possuem temperatura ótima de desenvolvimento ao redor de 30°C, e as espécies de maior importância são *L. fermentum*, *L. viridescens* e *L. brevis* (16,67,83).

### Isolamento dos Microrganismos do Grupo Láctico

A necessidade de se ter culturas puras de boas linhagens de bactérias lácticas, especialmente que sejam passíveis de utilização industrial, tem sido muito preconizada nos últimos tem

pos (24,46,98). Na verdade, o interesse pelo isolamento de bactérias lácticas vem desde a identificação, por Lister, em 1873, do *Betabacterium lactis*, hoje *Streptococcus lactis*, a partir de leite acidificado (25). Segundo SANDINE et alii (98), Storch, Conn e Weigmann, na Dinamarca, EUA e Alemanha, respectivamente, chegaram, independentemente, à conclusão de que o azedamento do leite ou a cura do creme era totalmente dependente da presença de bactérias nesses produtos. Nessa época, a técnica de isolamento consistia somente em diluir o leite acidificado, inoculá-lo em leite fervido e incubá-lo até nova acidificação (coagulação)(25).

Segundo SANDINE et alii (98) e COLLINS (25), após um período de poucos trabalhos na área, Orla-Jensen, em 1919, publicou um importante trabalho onde, através da técnica de diluição, demonstrou serem dois organismos responsáveis pela acidificação e coagulação do leite: o *S. lactis* e o *S. cremoris*, o qual, segundo o pesquisador, era responsável não só pela acidificação mas também pelo desenvolvimento do aroma que aparecia em algumas culturas, diferindo fisiologicamente do *S. lactis* por possuir temperatura ótima de desenvolvimento abaixo de 30°C, não apresentar desenvolvimento a 40°C, não possuir habilidade de formar ácido carbônico e não fermentar maltose, além de, geralmente, formar cadeias mais longas que o *S. lactis* (98).

Na revisão efetuada por GARCIA (43) está relatado que os procedimentos desenvolvidos para o isolamento de bactérias lácticas são muito parecidos; iniciando-se, normalmente, por um enriquecimento em caldo, leite ou leite suplementado por fatores de crescimento, indicadores, etc, sendo possível fazer alterações na faixa de pH para beneficiar determinados grupos (ex. *Lactobacillus*), tratamento térmico (para *S. thermophilus*), plaqueamento e incubação em temperaturas que variam para os diversos grupos.

Embora se saiba que quanto mais próximas do seu ótimo forem as condições ambientais, maior será a possibilidade de se isolarem os grupos beneficiados por essas condições, existem várias indicações diferentes entre os pesquisadores da área. Assim, a atmosfera de incubação é uma delas. INGRAM (59) relata que o que favorece o isolamento ou até a predominância das bactérias lácticas são as circunstâncias nas quais esses organismos ocorrem, as quais se tornam um fator ecológico decisivo. Para o autor, tensões graduadas de CO<sub>2</sub> fazem com que apareça a seguinte ordem: mistura de microrganismos → estreptococos → lactobacilos. Para outros pesquisadores (19,66), altas tensões de CO<sub>2</sub> não beneficiam o desenvolvimento de todos os segmentos do grupo, como os estreptococos, enquanto que atmosferas contendo 10% de CO<sub>2</sub> e 90% de H<sub>2</sub> propiciam bons resultados no isolamento de lactobacilos (14). OTTOGALLI & GALLI (84) relatam que a utilização de uma sobrecamada de ágar para limitar a difusão de O<sub>2</sub>, associada ao emprego de anaerobiose, mostra bons resultados no isolamento de *S.thermophilus*.

Um fator decisivo no isolamento de bactérias lácticas é a escolha e utilização do meio de cultura a serem empregados. Existe um número muito grande de meios de cultura que permitem o desenvolvimento de tais organismos (19,20,31,33,37,39,45,64,74,75,77,92,106). No entanto, por serem muito ricos em nutrientes e conterem vários fatores de crescimento, esses meios possibilitam o desenvolvimento de outros microrganismos não pertencentes ao grupo láctico (20,74).

O meio de cultura desenvolvido por ELLIKER et alii (37) tem sido apregoado como o mais seletivo dos meios para contagem e isolamento de microrganismos lácticos (82), provenientes de várias fontes. Entretanto, num ensaio com tipos diferentes de leites (cru e pasteurizado), CHAZAUD (20) verificou que somente

50% da microflora que crescia nesse meio era pertencente ao grupo das bactérias láticas.

Para o isolamento de *Streptococcus*, HARRIGAN & McCANCE (50) citam o meio ágar-lactato-vermelho neutro (Neutral Red Chalk Agar), cuja seletividade e eficiência podem ser aumentadas pela adição de 50 ppm de acetato de tálio, composto que inibe o crescimento de coliformes.

A eficiência do acetato de tálio também foi confirmada por CHAMBA et alii (19) quando compararam vários meios para contagem da microflora acidificante de leite cru. Segundo esses autores, a adição de 0,1% de acetato de tálio e 0,025 g/L indicador púrpura de bromocresol ao ágar Elliker mostrou melhores resultados que ágar padrão e ágar Elliker somente adicionado do indicador.

Buscando alcançar uma alta eficiência para os microrganismos do grupo láctico, DAVIDSON & CRONIN (31) desenvolveram o meio NAP, cuja seletividade é alcançada pela incorporação de nitrito, actidiona e polimixina. Neste meio, a actidiona é usada com a finalidade de inibir o desenvolvimento de leveduras, enquanto que a função da polimixina é impedir o crescimento de bactérias Gram-negativas e o nitrito é usado pelo fato das bactérias láticas, em geral, serem mais resistentes a esse inibidor que a maioria das outras bactérias. Esse meio, segundo seus autores, mostrou-se adequado para contagens dos principais gêneros do grupo láctico.

DEAK (33) propôs, para contagem e isolamento de bactérias láticas, o Lacto Agar, no qual, além de triptona, extrato de levedura, glicose e carbonato de cálcio, acrescentava-se sorbato de potássio (0,7 g/L) para inibir os microrganismos catalase-positiva e verde de bromocresol como indicador da produção ácido.

EVANS & NIVEN (39) desenvolveram um meio para microrganismos que requerem altos teores de tiamina, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Ao meio que continha "tween 80" (monooleato de sorbitana) para reduzir a lag-fase ou fase adaptativa dos microrganismos, foi dado o nome de APT ("All purpose medium with tween"), o qual foi usado, inicialmente, para lactobacilos heterofermentativos. Atualmente, no entanto, esse meio também tem sido usado para contagem e isolamento de outros microrganismos do grupo láctico (45,66,74,106), chegando a ser apontado, inclusive, como superior aos ágaros Elliker, NAP, Lee, MRS e Rogosa SL na recuperação de culturas puras de bactérias lácticas (45).

Alguns pesquisadores chamam a atenção para o desenvolvimento de meios de cultura em que se possa realizar um isolamento já diferenciado entre as espécies de estreptococos lácticos (82, 91,92). Através de uma série de publicações, REDDY et alii (91,92), baseados na capacidade do *S. lactis* e do *S. diacetylatis* em produzirem amônia a partir de arginina - fato que não ocorre com *S. cremoris* - e na diferença da utilização de citrato, desenvolveram um meio contendo citrato de cálcio e arginina, como substratos específicos, dois compostos tamponantes ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), lactose como único açúcar fermentescível e púrpura de bromocresol como indicador. Segundo os autores, o meio permite uma enumeração diferencial quantitativa confiável.

É sabido que os estreptococos lácticos, para um crescimento satisfatório, requerem meios tamponados, uma vez que a concentração iônica passa a ser um fator limitante no crescimento celular (55,70). Esse tamponamento, via de regra, é feito por fosfatos inorgânicos que, no entanto, por sua ação seqüestrante, especialmente sobre o cálcio, não pode ser utilizado em ensaios com bacteriófagos, já que é fundamental a presença de cálcio para

ocorrer a adsorção dos fagos à parede celular microbiana (43,112). Segundo TERZAGHI & SANDINE (112), por esse fato e também porque o *S. cremoris* não cresce de maneira muito boa na maioria dos meios de cultura, é que Lowrie e Pearce desenvolveram um meio denominado M<sub>16</sub>, o qual não possuía fosfato e era acrescido de fitona (extrato proteico vegetal), ficando a atividade tamponante por conta da peptona e do acetato, que, no entanto, se mostraram pouco eficazes. A utilização de um fosfato orgânico (betaglicerofosfato dissódico) em um meio de formulação complexa denominado M<sub>17</sub>, melhorou consideravelmente o espectro de ação para os estreptococos lácticos e seus fagos (70,112).

O crescente interesse no estudo de linhagens rápidas e lentas de bactérias lácticas levou LIMSOWTIN & TERZAGHI (71) a desenvolverem um meio que permitisse a diferenciação desses dois tipos de culturas. Assim, utilizando o betaglicerofosfato dissódico, leite em pó e ágar Davis, foi possível diferenciar culturas rápidas de variantes lentas, pelo tamanho desenvolvido pelas colônias, e reisolá-las. Mais recentemente, HUGGINS & SANDINE (55) procurando melhorar a diferenciação entre culturas rápidas e lentas, fizeram uma modificação no meio de LIMSOWTIN & TERZAGHI (71) introduzindo 0,1% de litmus, possibilitando uma medida qualitativa da produção de ácido. A adição de catalase ou peróxido de hidrogênio a esse meio denominado FSDA reduziu a autoinibição entre as linhagens. No entanto, a despeito de todas as vantagens do betaglicerofosfato, esse tampão não mostra os mesmos efeitos vantajosos para o *S. thermophilus* e lactobacilos, por inibir algumas de suas linhagens (55).

De acordo com SANDINE et alii (98), Orla-Jensen foi, também, o responsável pelos primeiros isolamentos e estudos dos microrganismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

Para o isolamento de organismos do gênero *Lactobacillus* existe um número muito grande de meios de cultura já descritos, os quais apresentam uma grande variação de substâncias destinadas a aumentar sua seletividade. Muitos dos meios propostos para esse fim, como ágar suco de tomate, ágar suco de laranja e meio V-8 (106) baseiam sua formulação em extratos vegetais acrescidos de fatores de crescimento e redução do pH para faixas abaixo de 5,8-6,0. No entanto, ROGOSA et alii (96) propuseram um meio contendo 2,5% de acetato de sódio, além de ácido acético, o que resultou num meio com boa seletividade. HARRIGAN & McCANCE (50), inclusive, indicam-no para contagem e isolamento de lactobacilos a partir de fontes que possuam uma miscelânea de organismos.

JENSEN & EDMONSON (63) relatam que conseguiram, a partir de leite cru, obter cepas com boas características para uso industrial, utilizando os meios de Rogosa, V-8 e Briggs.

O isolamento dos microrganismos dos subgêneros *Streptobacterium* e *Betabacterium* é altamente favorecido pela utilização do meio de Rogosa, segundo as modificações de Mabbit e Zielinska, ou seja, a introdução de leite desnatado como fonte nitrogenada (35, 50). Já para o isolamento dos organismos do subgênero *Thermobacterium*, DEMETER (35) relata que a utilização de ágar acetato de tálio mostra resultados bem confiáveis.

Para o isolamento de lactobacilos em geral, também se aconselha a utilização do ágar Eugon (106), composto de tripton e fitona como substratos nitrogenados básicos, além de glicose, L-cistina e sais de sódio.

O meio de cultura de EVANS & NIVEN (39), APT, embora seja indicado para lactobacilos, permite o desenvolvimento de outros microrganismos (45,66).

Alterando a tradição da utilização de extratos proteícos vegetais nos meios de cultura para lactobacilos, DE MAN et alii (34) propuseram um meio denominado MRS, à base de extratos de carne e levedura e proteose-peptona, como substratos nitrogenados. Esse meio tem sido, até hoje, amplamente aceito como um dos melhores meios de cultivo para os integrantes do gênero *Lactobacillus*, por permitir o desenvolvimento de quase todas as linhagens do gênero. No entanto, sua seletividade é pequena, possibilitando o crescimento de outros microrganismos, como estreptococos, leveduras, etc (35).

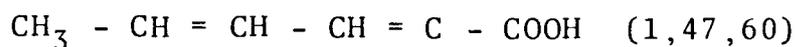
O isolamento dos microrganismos do gênero *Leuconostoc*, de modo geral, está associado a meios de cultura contendo elevadas quantidades de carboidratos. A utilização do ágar acetato de Rogosa, como modificado por Mabbit e Zielinska, contendo 2,5% de glicose, com incubação a 30°C, segundo DEMEFER (35) e HARRIGAN & McCANCE (50), permite o desenvolvimento de leuconostoc. Porém, micrococos, pediococos e lactobacilos também podem se desenvolver (35,50). MAYEUX & COLMER (75) indicaram o uso de ágar contendo 10% de sacarose e 0,05% de azida sódica como agente inibidor. Como indicação posterior, HARRIGAN & McCANCE (50) sugerem a utilização do meio de Mayeux, Sandine e Elliker, contendo 75 ppm de azida sódica e incubação a 25°C por 3 dias. Mc DONOUGH et alii (77), baseados na resistência desses organismos ao hidrocloreto de tetraciclina, sugerem a adição de 0,15 ug/ml desse composto ao meio de suco de tomate para o isolamento. Os autores também indicam que 30°C/48 horas é o binômio ideal para o isolamento dos microrganismos do gênero *Leuconostoc*.

## Uso de sorbatos como agentes inibidores

A inibição do desenvolvimento de microrganismos é uma constante para os microbiologistas que visam a trabalhar com grupos específicos de microrganismos, formulando ou adaptando meios de cultura seletivos para os referidos grupos microbianos. Dos vários métodos passíveis de aplicação para exercer ação inibitória ou mesmo seletiva contra microrganismos, o emprego do ácido s $\acute{o}$ rbico e seus sais, genericamente denominados de sorbatos, mostra-se interessante pelo seu espectro de ação contra várias bactérias, mofos e leveduras (1,35).

Embora tenha sido descoberto em 1859 por A. W. HOFMAN (104), somente após 1945, quando Gooding patenteou-o como agente antimicrobiano, por sua ação inibitória contra o crescimento de fungos é que o ácido s $\acute{o}$ rbico passou a ter seu estudo estendido (57, 86,115).

O ácido s $\acute{o}$ rbico é o isômero trans-trans do ácido hexa-2,4-dien $\acute{o}$ ico, tendo a seguinte configuração química:



Devido à boa solubilidade dos sais alcalinos de ácido s $\acute{o}$ rbico, esses compostos apresentam maiores vantagens de utilização que o próprio ácido s $\acute{o}$ rbico. E o sorbato de potássio é o seu sal mais amplamente empregado em preparações de alimentos, podendo ser facilmente preparado em soluções maiores até que 50%, em água fria (47), mostrando, assim, características que permitem a esses compostos serem adicionados a meios de cultura, visando a elevar sua seletividade.

## Ação efetiva dos sorbatos

Para que uma substância possa ter ação microbiana é necessário que ela tenha contato direto com o microrganismo, além de estar numa concentração inibitória (44). O seu efeito é função de uma série de fatores físico-químicos e bioquímicos (44).

A ação dos sorbatos contra bolores, leveduras e bactérias é inteiramente dependente do pH do substrato, tanto que à medida em que se abaixam os valores de pH, a quantidade de ácido não-dissociado livre aumenta, sendo que está é a forma ativa de inibição (38,72). Mesmo os sais, quando em pH ácido, se dissociam dando radicais ácidos que atuam ativamente na inibição microbiana (104).

Segundo EKLUND (36), os possíveis alvos visados na ação microbiana são: membrana celular, material genético e enzimas. Para os sorbatos, o mecanismo exato de ação não conta com a aceitação unânime dos pesquisadores (1). Porém, o próprio EKLUND (36) relata que os ácidos orgânicos, e o sôrbico em especial, são mais efetivos que seus sais na ação inibitória, pois atravessam a membrana celular como moléculas não-dissociadas, dissociando-se dentro da célula ou da vesícula da membrana, rompendo o equilíbrio entre os dois lados da célula, o qual guia o transporte.

Dentro do espectro de ação antimicrobiana dos sorbatos, o fato mais importante, que o leva a ser empregado como agente microbiano seletivo, é a relativa ineficácia desses compostos contra os microrganismos catalase-negativa, como as bactérias lácticas (38), tendo, assim, sido utilizado como agente seletivo contra vários outros microrganismos que não os lácticos (6,12,95,104, 115).

Visando sempre a sua ação seletiva, vários pesquisadores tentaram a introdução dos sorbatos em formulações de meios de cultura. Assim, BELL et alii (6) verificaram que bactérias, bolos e leveduras não eram inibidos na presença de 0,1% de ácido sorbico e pH 7,0. Em contrapartida, na mesma concentração do inibidor e pH 4,5, os bolores e as leveduras tiveram seu desenvolvimento inibido, enquanto que as bactérias somente o foram a pH 3,5 (6). Já para o isolamento de microrganismos catalase-negativa, segundo EMARD & VAUGHN (38), 0,12% de ácido sórbico permite o crescimento de bactérias láticas e clostrídios, tanto em meio sólido como líquido; porém, inibe o desenvolvimento de bolores, leveduras, actinomicetos e bactérias catalase-positivas, quando o pH é mantido na faixa de 5,0-5,5. Nessa faixa de pH a atividade é auxiliada pela ausência de fosfato (38).

A inibição de microrganismos do gênero *Pseudomonas*, potente agente deteriorador de produtos alimentícios de origem animal sob refrigeração, foi conseguida com a utilização de sorbato de potássio, tendo sido constatado que a adição de 0,05% de sorbato a um meio de cultura com pH ajustado para 5,5, promove a inibição completa do crescimento desses microrganismos, enquanto que a 0,2% a pH 6,0 apenas retarda o desenvolvimento do organismo (95).

No trabalho de revisão de SOFOS & BUSTA (104) está demonstrado que o efeito inibidor de sorbato de sódio contra *Bacillus* sp é 5 vezes maior a pH 6,0 que a pH 7,0.

A concentração limite de ácido sórbico passível de ser utilizada para microrganismos láticos está por volta de 0,1%, estando provado que concentrações superiores afetam *Pediococcus* e *Lactobacillus* (11).

## Bactérias Láticas como Fermento Industrial

A preservação de alimentos por processos fermentativos é um dos mais remotos métodos de conservação de que se tem notícia. Dentre eles, a fermentação láctica é um dos processos mais antigos e amplamente utilizados (9,67,111), possuindo capital importância na indústria de transformação do leite (54,100).

Os microrganismos que realizam a fermentação láctica são conhecidos no meio laticínista como culturas ou fermentos lácticos (48,111), sendo todos componentes do grupo láctico (9,70,100,111). Sua utilização visa, de uma forma ou de outra, a tirar proveito das propriedades básicas apresentadas por esses microrganismos, como: produção de ácido láctico e componentes voláteis; contribuição no desenvolvimento de sabor e textura dos produtos fermentados, através da proteólise e lipólise, além da prevenção do desenvolvimento de alguns microrganismos patogênicos (9,100,111). Além disso, os produtos fermentados por bactérias lácticas apresentam maior valor nutritivo e digestibilidade que o próprio leite (2,4,107), podendo, inclusive, contribuir na redução dos níveis de colesterol e até de células neoplásicas, como no tumor de Erlich (2).

Os microrganismos que compõem as culturas mesófilas empregados na fabricação de queijos de massa crua e semi-cozida e de outros produtos fermentados, são os mais estudados. Estão divididos em produtores de acidez e produtores de aroma. Os produtores de acidez são *S. lactis* e *S. cremoris*, e os produtores de aroma são *Leuconostoc cremoris*, *L. dextranicum* e *S. diacetylactis* (que também é produtor de acidez) (9,24,67,70,111).

Os fermentos termófilos, que são muito utilizados no fabrico de queijos de massa cozida, como Parmesão, Grana, Emmental

(3,67) e iogurte (89), são separados em 2 categorias principais : os fermentos naturais ou soro-fermento (9), que AUCLAIR & ACCOLAS (3) chamam de "fermentos artesanais" e os fermentos selecionados e de composição conhecida, onde se encaixam aqueles utilizados para iogurte (3,9).

Os fermentos naturais são preparados de modo empírico, como aqueles utilizados na produção de queijos Gruyère e Emmental nos alpes franceses (3) e Grana na Itália (9). Possuem composição pouco definida, são muito ácidos, com predominância de lactobacilos (*L.bulgaricus*, *L.helveticus*, *L.lactis* e *L.fermentum*), embora também ocorra *S. thermophilus* e alguns estreptococos fecais (3,9). Já as culturas selecionadas e de composição conhecida são compostas de uma ou várias linhagens de *S. thermophilus* e/ou lactobacilos (*L.bulgaricus*, *L.lactis* e *L.helveticus*) (3).

É comum agruparem-se os fermentos para uso industrial em três categorias principais: simples, múltiplos e mistos (24,29,30,111). Os fermentos simples consistem, teoricamente, de um único tipo de organismo, porém, na prática, raramente são empregados dessa forma. São muito utilizados na forma pareada, devido à introdução de outro microrganismo, o que ajuda a conferir, às culturas, resistência a bacteriófagos, sal e variações de temperatura (11). Os múltiplos consistem de números conhecidos de linhagens puras, o que permite utilizá-los por longos períodos (111). Os fermentos mistos, por sua vez, são compostos de bactérias acidificantes e produtoras de aroma, em proporções indefinidas, para o caso de queijos (69,111) e em proporções definidas para o iogurte, geralmente envolvendo mais de uma espécie de microrganismo.

Os critérios a serem empregados na seleção dos fermentos ou culturas lácticas devem refletir, de um modo geral, as con-

dições de atuação desses microrganismos no produto desejado (29). Assume-se, entretanto, que o requisito básico de uma boa cultura láctica deve ser a atividade acidificante, ou seja, a capacidade de produzir ácido láctico (24,48,51,54,70), embora outras indicações também sejam feitas, tais como: promoção de transformações desejáveis durante o processo de cura (29,54); capacidade proteolítica adequada, sem ocorrência de amargor (29,93,94,100,114); tempo de geração relativamente baixo (26); resistência a bacteriófagos (29,30,54,69) e crescimento a diferentes temperaturas (30,51), além de compatibilidade de crescimento em associação com outras linhagens e/ou espécies (30,48), características organolépticas e tecnológicas adequadas (43) e estabilidade das propriedades desejáveis (29,30,48).

A comparação da atividade acidificante das culturas é extremamente difícil, visto existirem vários métodos descritos para realizá-la (9,17,51,61). Normalmente, recomenda-se uma temperatura de incubação de 30°C, pelo fato dessa temperatura estar próxima àquela em que ocorre, para os mesófilos, maior produção de ácido (29,61). No entanto, COGAN (24) relata que a 22°C existe menor efeito inibidor da combinação acidez-temperatura. Porém, Pearce, citado por HUGGINS (54), afirma que se deve testar a atividade a 22°C e a 30°-38°C. Especial atenção deve ser dada também aos fatores que podem afetar a atividade das culturas, como: sistema lactoperoxidase-tiocianato, imunoglobulinas presentes no leite, presença de oxigênio, antibióticos, detergentes, tratamento térmico aplicado ao leite, luz, volume de inóculo (61), metabólitos produzidos pela própria cultura, aglutininas e bacteriófagos (70).

A realização de uma prova organoléptica da coalhada produzida pelas culturas, associada à característica de atividade

acidificante e desempenho tecnológico, segundo GARCIA (43), também oferece boas indicações para a seleção de culturas a serem utilizadas industrialmente.

Devido à intensa problemática causada pelos bacteriófagos nas indústrias de queijos da Nova Zelândia, onde inclusive se deixa de produzir qualquer tipo de queijo durante dois meses por ano (junho e julho) visando a se obter uma redução quase que absoluta dos níveis de ocorrência de bacteriófagos, LAWRENCE et alii (166) propuseram uma bateria de testes para a seleção de culturas. Assim, após o conhecimento das características fisiológicas dos organismos e comportamento em testes de simulação de desenvolvimento industrial, determina-se, além da atividade acidificante e resistência a antibióticos, a sobrevivência em soros industriais contendo fagos, e só então as culturas são testadas em associações de diferentes linhagens para o estudo da compatibilidade e possível liberação industrial.

O estudo das bactérias lácticas tem enveredado nos últimos anos para o campo da genética bacteriana, buscando maiores informações e mais estabilidade das várias propriedades dos componentes do grupo láctico (78).

A elevada frequência de aparecimento de variantes negativas irreversíveis para metabolismo de lactose (lac), habilidade proteolítica (prt) e produção de nisina (nis), mostra a ligação dessas propriedades com moléculas de DNA extracromossômico denominadas plasmídeos (9,70). Essas partículas de material genético são muito mais comuns em estreptococos que em lactobacilos (32). Segundo MCKAY (78), o fato dos plasmídeos replicarem independentemente do material genético, possibilita o aparecimento de falhas mutacionais, quando da divisão celular, levando à formação de cé-

lulas filhas sem cópia dos plasmídeos parentais, e, assim, incapazes de realizarem as mesmas funções, caracterizando o fato de que as propriedades associadas a plasmídeos são mais instáveis que as funções controladas por genes cromossômicos.

Além das propriedades de metabolismo da lactose, produção do sistema de enzimas proteolíticas e nisina, sabe-se, atualmente, que outras propriedades microbianas ou são ou supõe-se que sejam mediadas por plasmídeos, como: metabolismo da galactose, utilização de citrato, sistemas de modificação/restricção, resistência a drogas, produção de substâncias tipo bacteriocina, produção de substâncias viscosas ou propriedade "filante", etc (24,32, 78).

Além da instabilidade genética associada com os plasmídeos, outro fator de extrema importância para as bactérias lácticas são os bacteriófagos que, ao infectarem uma cultura láctica, levam à perda de suas capacidades vitais, ocasionando graves problemas técnico-econômicos nas indústrias de transformação (3,9,24,32, 70).

A busca de linhagens que possam ser utilizadas a nível industrial com características mais estáveis, tem sido feita através de métodos de transferência de genes de uma célula para outra (32,70,100). Dos quatro métodos potenciais de transferência de genes, três têm sido descritos para os estreptococos lácticos: conjugação, transdução e fusão de protoplastos (32). Conjugação é o método mais convencional, podendo operar com alta eficiência e promover a transferência de grandes quantidades de plasmídeos e DNA cromossômico, inclusive entre espécies de estreptococos e lactobacilos. Transdução tem a desvantagem de somente poder ser aplicada a poucas linhagens infectadas pelo fago transducente, já

que a quantidade de DNA passível de ser transferida é limitada pela capacidade da cabeça do fago. A aplicação da fusão protoplásmica fornece um enorme potencial, já que ela é totalmente não específica, podendo ser amplamente aplicável a combinação entre genomas inteiros (32).

### Amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram de leite bovino cru dos tipos B e Especial, da bacia leiteira de Campinas, S.P.. Parte das amostras foi coletada na plataforma de recepção de uma usina de processamento de leite na cidade de Campinas, S.P., e o restante em fazendas e pontos de espera para o transporte do leite até a usina de beneficiamento.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro estéreis com tampas rosqueáveis e transportadas ao laboratório em recipientes com gelo, assegurando, assim, refrigeração às amostras.

### Microrganismos referência

Os microrganismos utilizados como referência (Tabela 1) foram provenientes das coleções de cultura da Secção de Leite e derivados do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola (LTA) da UNICAMP, ambos de Campinas, S.P..

### Diluições

Para a realização das diluições das amostras destinadas ao plaqueamento microbiológico, preparavam-se frascos contendo 99,0 mL de água peptonada a 0,1%. As diluições decimais foram preparadas segundo a técnica de transferência de 1,0 mL da amostra, como recomendado pelo Standard Methods for the Examination of Dairy Products (74), das quais transferia-se 1,0 mL para placas de Petri, em duplicata.

TABELA 1. Microrganismos utilizados como referência

Microrganismos	Linhagem	Procedência
<i>Streptococcus lactis</i>	NCDO 2001	ITAL
<i>S. lactis</i>	NCDO 1992	ITAL
<i>S. lactis</i>	NCDO 2003	ITAL
<i>S. lactis</i>	ATCC 7962	ITAL
<i>S. lactis</i>	SLL 0013	LTA
<i>S. lactis</i>	SLL 0010	LTA
<i>S. cremoris</i>	HP	ITAL
<i>S. cremoris</i>	AM <sub>2</sub>	ITAL
<i>S. cremoris</i>	NCDO 1998	ITAL
<i>S. cremoris</i>	NCDO 1999	ITAL
<i>S. cremoris</i>	NCDO 1428	ITAL
<i>S. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	NCDO 176	ITAL
<i>S. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	NCDO 162	ITAL
<i>S. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	SLL 0011	LTA
<i>S. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	SLL 0029	LTA
<i>Lactobacillus casei</i>	NCDO 161	ITAL
<i>L. casei</i>	NCDO 251	ITAL
<i>L. casei</i>	SLL 0156	LTA
<i>L. casei</i>	ATCC 0469	ITAL
<i>Leuconstoc</i> sp	SLL 0320	LTA
<i>L. cremoris</i>	SLL 0155	LTA
<i>Propionibacterium shermanii</i>	NCDO 566	ITAL
<i>Propiobacterium</i> sp	SLL 0315	LTA

## Leites utilizados

Durante todo o experimento utilizou-se leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) reconstituído a 10,0%, o qual, exceto ressalva oportuna, era esterilizado a 121°C por 15 minutos.

O leite tornassolado empregado foi preparado, segundo as modificações de MACHADO (73), a partir de Litmus Milk (Difco) e esterilizado a 121°C por 15 minutos.

## Contagem total

A contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos presentes nas amostras de leite cru foi realizada utilizando-se Ágar Padrão (Plate Count Agar, Difco) como meio de cultura, semeadura por profundidade e 32°C por 48 horas como condições de incubação (74).

## Contagem de coliformes totais

A pesquisa de coliforme totais foi levada a efeito em meio sólido, utilizando-se o Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (Merck), através de semadura por profundidade e incubação por 24 horas a 32°C, tal como recomendado pela literatura (74).

## Contagem de enterococos

Os microrganismos pertencentes ao grupo dos enterococos (estreptococos do grupo fecal) foram pesquisados em meio sólido e inoculação por profundidade, segundo as recomendações de SPECK (106), utilizando-se Ágar KF Streptococcus (Difco) como meio de cultura e 32°C por 48 horas como condições de incubação.

## Contagem de microrganismos do grupo lático

A pesquisa dos microrganismos do grupo lático presentes nas amostras de leite cru foi realizada empregando-se o Ágar APT-S, cujo desenvolvimento foi realizado durante o presente trabalho, através de uma modificação do Ágar APT (BBL).

Para o preparo do meio APT-S adicionava-se, por litro de meio final, 1,0g de sorbato de potássio (B. Herzog), 54,0g de Ágar APT (BBL) desidratado e 5,0g de ágar-ágar. A mistura era, então, reidratada e aquecida até a ebulição para a completa dissolução dos ingredientes. Após resfriamento para temperatura ao redor de 50°C, o pH era ajustado para 6,0 com ácido lático (Riedel-de Haenag, Hannover). A seguir distribuía-se o meio em erlenmeyer e esterilizava-se por 15 minutos a 121°C.

## Leitura das contagens

As contagens dos diversos grupos microbianos foram realizadas em um contador de colônias HELLIGE (Hellige, Garden City, New York).

## Isolamento de microrganismos lácticos

Para o isolamento das bactérias lácticas, após crescimento em Ágar APT-S, dividiam-se as placas de Petri com número de colônias na faixa de 30 a 300, em quatro quadrantes, e as colônias visíveis de um quadrante escolhido ao acaso eram transferidas para tubos de ensaio, contendo leite tornassolado. Os tubos assim inoculados eram incubados por, no máximo, sete dias a 32°C.

À medida em que os tubos inoculados mostravam formação de coágulo, checava-se a pureza da cultura, por exame microscópico de um esfregaço da mesma.

### Isolamento de *Propionibacterium* e *Leuconostoc*

O isolamento de microrganismos do gênero *Propionibacterium* foi realizada plaqueando-se alíquotas de 1,0 mL de todas as diluições decimais até  $10^{-5}$ , de leite cru, em Ágar Lactare (106), com incubação por 6 dias a 30°C, em atmosfera contendo 95% de nitrogênio e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o isolamento dos microrganismos pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, as alíquotas de 1,0 mL das diluições até  $10^{-5}$  foram plaqueadas utilizando-se o meio de cultura descrito por MAYEUX et alii (76), com incubação a 30°C por 48 horas, tal qual recomendado por McDONOUGH et alii (77).

### Purificação dos isolados lácticos

A purificação dos isolados lácticos foi feita, inicialmente, usando plaqueamento por esgotamento em ágar APT de uma suspensão do leite coagulado pela cultura teste, em água estéril, com uma sobrecamada de 5-6mL do próprio meio e incubação por 48 horas a 32°C.

As colônias morfológicamente diferentes eram isoladas e transferidas para tubos contendo leite em pó reconstituído e estéril. A seguir, realizavam-se esfregaços em lâminas e exame microscópico com coloração de Gram e teste de catalase, ambos feitos segundo as recomendações de HARRIGAN e McCANCE (50).

## Estocagem e manutenção das culturas isoladas

Após a confirmação da pureza dos isolados, uma cultura considerada ativa após crescimento por 18 horas a 32°C em leite era transferida para tubos contendo leite desnatado reconstituído estéril, na proporção de 10,0% (v/v) e imediatamente congeladas em congelador doméstico (-18° a -20°C), sem qualquer incubação prévia, como recomendado por FOSTER (40).

Na ocasião do uso dessas culturas, elas eram deixadas descongelar em temperatura ambiente, após o que eram incubadas a 32°C até promoverem a coagulação do leite. A seguir, eram submetidas a três repicagens sucessivas para reativação completa, e, então, empregadas com a finalidade desejada.

A cada seis meses, todas as culturas mantidas congeladas eram reativada e novamente congeladas.

## Determinações de acidez

### - pH

A leitura dos valores de pH das culturas foi realizada em um aparelho pH-meter Micronal, modelo B221.

### - Acidez titulável

A verificação da acidez titulável desenvolvida pelas culturas testadas foi levada a efeito através da titulação de 10,0 mL da cultura com NaOH N/9 (soda Dornic), até o ponto de viragem do indicador fenolftaleína.

Os resultados foram expressos como °D (graus Dornic, 1°D corresponde a 0,1 mL de NaOH N/9 gastos na titulação).

## Crescimento dos isolados em diferentes temperaturas

Para essa determinação, inoculava-se 1,0% (v/v) de uma cultura ativa em tubos de ensaio contendo leite estéril, os quais eram incubados a 21°C, 32°C e 42°C por 24 horas. Ao final desse período, realizava-se a leitura dos valores de pH desenvolvido em cada temperatura testada. Foi considerado como desenvolvimento completo dos microrganismos o ato de promover a coagulação do leite em 24 horas, coincidindo com uma faixa de pH entre 4,5 e 5,0.

### Atividade acidificante

A atividade acidificante das culturas isoladas foi medida após o desenvolvimento de 1,0% (v/v) de uma cultura ativa em leite estéril, através da leitura dos valores de pH e acidez titulável após incubação a 30°C por períodos de 5 horas (51, 114) e 24 horas (10, 24, 61).

### Tempo de geração

Na determinação do tempo de geração das culturas, utilizou-se cultura ativa inoculada a 1,0% (v/v) em tubos de ensaio de 12x220 mm, contendo 40 mL de leite estéril e incubadas por 6 horas a 30°C.

O tempo de geração foi, então, calculado, como recomendado por RICHARDSON et alii (94), pela fórmula:

$$G_{\text{pH}} = \frac{0,693}{2,303 \frac{\Delta \text{pH}}{t}} \quad \text{onde,}$$

$G_{\text{pH}}$  = tempo de geração (h), calculado com base na diferença de pH antes e após a incubação a 30°C por 6 horas.

$\Delta$ pH = diferença dos valores de pH medidos antes e após a incubação.  
t = tempo de incubação.

### Atividade proteolítica

Para a verificação da atividade proteolítica, escolheram-se as culturas que mostraram boa atividade acidificante em pelo menos duas das três temperaturas utilizadas. A atividade proteolítica foi, então, medida nas temperaturas de bom desenvolvimento, através do método de HULL (58), seguidas as recomendações de CITTI et alii (22).

A tubos contendo 10,0 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 10% e pasteurizado a 63°C por 30 minutos inoculou-se 1,0% de uma cultura com 24 horas de desenvolvimento. O sistema foi inoculado na temperatura em que ia se testar a atividade proteolítica por 24 horas. Ao final desse período, 5,0 mL desse leite eram retirados e misturados com 1,0 mL de água destilada e 10,0 mL de ácido tricloroacético 0,72N. Após vigorosa agitação e repouso por 10 minutos, a mistura foi filtrada em papel de Hellma n° 642 (= Whatman n° 42). Tomou-se, então 5,0 mL do filtrado, adicionou-se 10,0 mL de uma solução de pirofosfato (150,0 g de carbonato de sódio + 10,0 g de metafosfato de sódio por litro de água destilada) e 3,0 mL de uma solução de fenol (Folin-Ciocalteu 1:2 em água), sob agitação lenta e contínua.

Após um repouso de 5 minutos para aparecimento da cor, efetuou-se a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro Bausch & Lomb Spectronic 20, num comprimento de onda de 650nm.

Os resultados foram expressos como ug de tirosina (Tyr) por mililitro de amostra, após confronto com uma curva pa-

drão de tirosina (Riedel-de Haenag Seelze, Hannover), apresentando as características de  $y = 0,0388 + 0,00639x$  e  $r = 0,9935$ , onde  $x$  = concentração de tirosina e  $y$  = densidade óptica.

### Seleção de isolados para uso como fermento

Com base na atividade acidificante, eficiência de produção de ácido lático, comportamento quanto à atividade proteolítica e característica de crescimento a diferentes temperaturas, selecionou-se linhagens que apresentassem possibilidades de serem empregadas como fermento na indústria de produtos fermentados de leite.

Dos microrganismos que apresentaram atividade nas temperaturas de 21°C, 32°C e 42°C, ou ao menos nas de 21°C e 32°C, com boas atividades acidificantes e de produção de ácido lático, foram produzidos leites fermentados pela inoculação de 1,0% de culturas ativas em leite bovino fervido e resfriado a ca. 32°C e incubados por 24 horas e 32°C. Após esse período, submetia-se o produto fermentado à refrigeração por 5 horas, após o que analisavam-se as propriedades de aparência e firmeza do coágulo. A seguir, deixava-se o leite fermentado a temperatura ambiente até atingir 15°C, realizando-se, então, uma prova organoléptica para a pesquisa de sabor característico, tal como descrito por GARCIA (43).

Com culturas que apresentaram as propriedades características, realizaram-se ensaios para verificar sua curva de acidificação e resistência ao cloreto de sódio.

#### - Curvas de acidificação

A frascos previamente esterilizados, contendo leite em pó pasteurizado a 63°C/30 min., inoculou-se uma cultura sele-

cionada e ativa, na razão de 2,0% e o conjunto foi incubado a 30°C. A cada 30 minutos de incubação, retiravam-se, assepticamente, alíquotas desse leite, do qual se media a acidez titulável desenvolvida.

#### - Resistência ao cloreto de sódio

A erlenmeyers de 250 mL foram adicionada, para cada cultura teste, quantidades de cloreto de sódio da ordem de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 g, e o conjunto, assim, esterilizado por 15 minutos a 121°C. Um conjunto de frascos sem adição do cloreto de sódio foi utilizado como testemunha. Após a esterilização, 100mL de leite reconstituído pasteurizado a 63°C por 30 minutos foram transferidos de maneira asséptica para cada um dos frascos erlenmeyers e, a seguir, inoculados com 1,0% de cultura teste ativa. A inoculação era feita a 30°C.

Duplicatas de alíquotas de 10 mL foram retiradas, de modo asséptico, nos intervalos de tempo de 0 e 5 e 24 horas, e lidos os valores de pH e acidez titulável.

#### Identificação dos isolados

A identificação dos microrganismos isolados foi feita através das provas indicadas pelo "Bergey's Manual" (16), as quais foram realizadas segundo as indicações de HARRIGAN e McCANCE (50).

FIGURA 1. Chave para a identificação de cocos láticos.

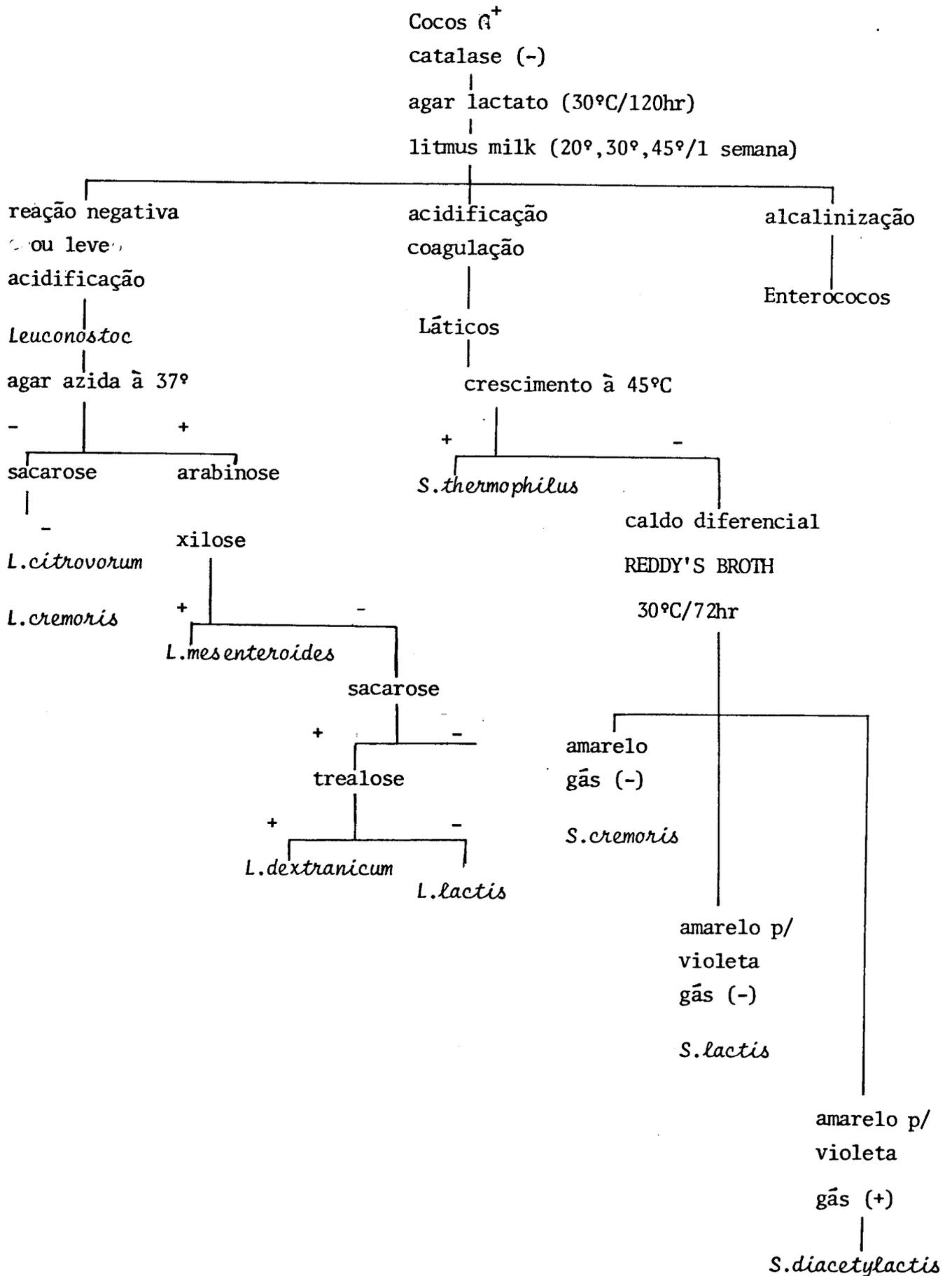
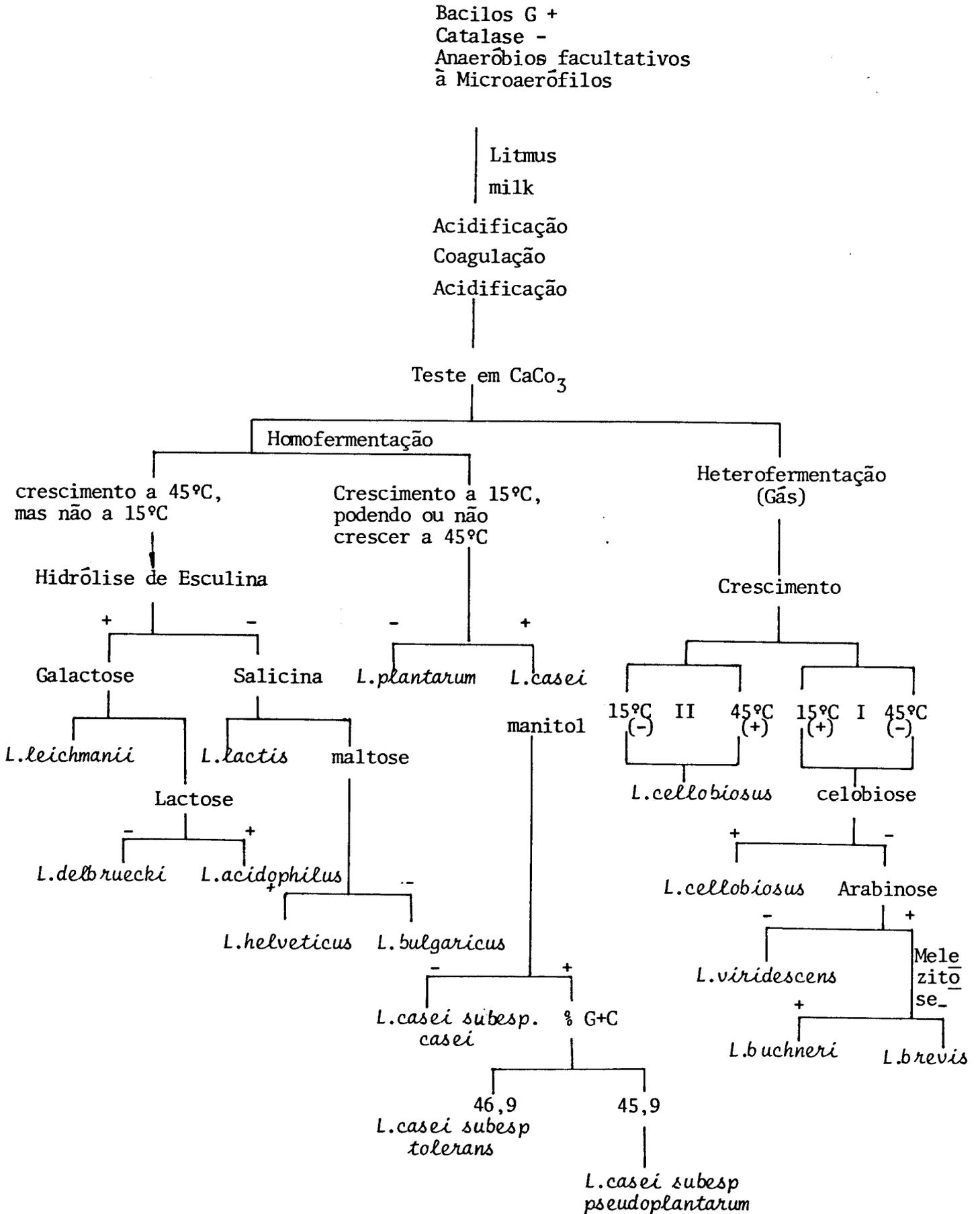


FIGURA 2. Chave para a identificação de bacilos lácticos.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Qualidade microbiológica das amostras

A qualidade microbiológica do leite é um fator de extrema importância para o produto, pois a composição dessa microflora é influenciada por uma série de fatores, os quais podem, inclusive, beneficiar certos grupos microbianos presentes, quer sejam componentes da microflora normal do leite, quer sejam contaminantes nele desenvolvidos.

Embora o intuito primário deste trabalho tenha sido a caracterização da flora láctica originalmente presente no leite cru, o conhecimento do estado microbiológico das amostras destinadas ao isolamento das bactérias lácticas presentes tornou-se importante, no sentido de se observar se amostras de leite tipo B e leite tipo Especial estavam, do ponto de vista microbiológico, dentro de um comportamento normal da realidade brasileira desses produtos ao serem recebidos na plataforma de recepção das indústrias de beneficiamento. Assim, três dos principais grupos de microrganismos do leite cru (mesófilos totais, coliformes totais e estreptococos fecais) foram estudados para se saber se poderia haver alguma possível influência desses grupos microbianos, que normalmente são contaminantes externos do leite, sobre a população láctica presente. Por ser a quase totalidade das amostras coletadas provenientes de leites não resfriados, a determinação dos microrganismos psicrotróficos não assume muita relevância, já que as observações de VILLAFANE (113) evidenciam que esse grupo de microrganismo não apresenta importância significativa em leites pouco ou não resfriados.

Como o intuíto primário não era o estudo da qualidade microbiológica do leite, mas apenas o conhecimento do seu estado microbiológico no recebimento industrial e as possíveis influências que poderiam ser sofridas pelas bactérias láticas, utilizaram-se 20 amostras de leite tipo B e 30 amostras de leite tipo Especial para a montagem dos ensaios de qualidade microbiológica das amostras.

Os resultados médios das contagens totais de mesófilos, coliformes e estreptococos fecais das amostras de ambos os tipos de leite são expressos no Quadro 1, e os dados totais de todas as amostras no Apêndice (Quadro 15).

QUADRO 1. Resultados médios, em unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL), das contagens total, de coliformes e de estreptococos fecais, das amostras de leites tipo B e Especial.

Tipo de leite	Contagem total	Coliformes	Estreptococos fecais
B	$6,03 \cdot 10^6$	$2,70 \cdot 10^4$	$3,27 \cdot 10^4$
Especial	$1,73 \cdot 10^7$	$1,29 \cdot 10^6$	$1,45 \cdot 10^4$

A análise desses dados revela que o leite recebido para beneficiamento industrial, ou a ele destinado, mostrou elevadas contagens microbianas. Pelo Quadro 1, nota-se que, como esperado, o leite tipo Especial apresentou uma carga microbiana média total e de coliformes, superior a do leite tipo B, porém, a população de estreptococos fecais do leite tipo B esteve 2,26 vezes acima da do leite tipo Especial. Isto permite afirmar que, embo-

ra os cuidados higiênicos com os animais, ordenhas, etc., para o leite tipo B sejam maiores, ao menos recomenda-se que sejam, neste caso, a presença desses microrganismos leva a algumas possíveis hipóteses: ou esses microrganismos, por constituírem uma flora mais resistente, estão adaptados às condições de sublimpeza em que se usa algum tratamento térmico, ou existe ocorrência de mamite no rebanho, ou ainda, indica contato com material de origem fecal. Como consequência, tem-se que ter em mente que os estreptococos fecais apresentam uma significativa termorresistência, podendo, portanto, sobreviver à pasteurização e estarem presentes no produto destinado ao consumidor.

Os elevados dados médios de contagem total do leite tipo B ( $6,03 \cdot 10^6$  ufc/mL) decorrem, provavelmente, da multiplicação de microrganismos contaminantes que são favorecidos por condições inadequadas de higiene, de armazenamento e manuseio do produto. Os dados de coliformes totais, principalmente para o leite tipo B, são pouco preocupantes, não só porque sua presença não se deu de modo maciço, mas também porque BARROS et alii (5) demonstraram que esses microrganismos são destruídos, durante a pasteurização, na faixa de 99,9%.

Nos Quadros 2 e 3 são mostradas as faixas de variações, frequências e porcentagens de aparecimento das contagens microbianas dos leites tipo B e Especial. A verificação desses dados, principalmente se confrontados com aqueles preconizados pela legislação brasileira em vigor (13) de no máximo  $5,0 \cdot 10^5$  ufc/mL para recebimento de leite tipo B cru, evidencia o fato de que somente 35% das amostras desse tipo de leite estariam dentro dos padrões permitidos, sendo que o maior número de amostras (40%) apresentou contagens num limite 10 vezes superior ( $1,1 \cdot 10^6$  a  $5,0 \cdot 10^6$  ufc/mL). Na comparação desses dados com aqueles oriundos das análises de leite tipo Espe

QUADRO 2. Faixas de variações, frequências e porcentagens de distribuição das contagens microbianas total, de coliformes e de estreptococos fecais, em amostras de leite tipo B cru.

Faixa de variação (ufc/mL)	Contagem total		Coliformes		Estreptococos fecais	
	frequências	%	frequências	%	frequências	%
menor que $10^3$	0	0	4	20	14	70
$1,1 \cdot 10^3$ a $5,0 \cdot 10^3$	1	5	6	30	1	5
$5,1 \cdot 10^3$ a $1,0 \cdot 10^4$	0	0	1	5	1	5
$1,1 \cdot 10^4$ a $5,0 \cdot 10^4$	3	15	6	30	1	5
$5,1 \cdot 10^4$ a $1,0 \cdot 10^5$	0	0	0	0	2	10
$1,1 \cdot 10^5$ a $5,0 \cdot 10^5$	3	15	2	10	1	5
$5,1 \cdot 10^5$ a $1,0 \cdot 10^6$	2	10	0	0	0	0
$1,1 \cdot 10^6$ a $5,0 \cdot 10^6$	8	40	1	5	0	0
$5,1 \cdot 10^6$ a $1,0 \cdot 10^7$	1	5	0	0	0	0
$1,1 \cdot 10^7$ a $5,0 \cdot 10^7$	1	5	0	0	0	0
$5,1 \cdot 10^7$ a $1,0 \cdot 10^8$	1	5	0	0	0	0
TOTAL	20	100	20	100	20	100

QUADRO 3. Faixas de variações, frequências e porcentagem de distribuição das contagens microbianas total, de coliformes totais e de estreptococos fecais, em amostras de leite tipo Especial cru.

Faixa de variação (ufc/mL)	Contagem total		Coliformes		Estreptococos fecais	
	frequências	%	frequências	%	frequências	%
menor que $10^3$	0	0	8	26,7	17	57
$1,1 \cdot 10^3$ a $5,0 \cdot 10^3$	0	0	5	16,7	5	17
$5,1 \cdot 10^3$ a $1,0 \cdot 10^4$	0	0	2	6,7	1	3
$1,1 \cdot 10^4$ a $5,0 \cdot 10^4$	1	3	9	30,0	5	17
$5,1 \cdot 10^4$ a $1,0 \cdot 10^5$	1	3	2	6,7	1	3
$1,1 \cdot 10^5$ a $5,0 \cdot 10^5$	8	24	2	6,7	1	3
$5,1 \cdot 10^5$ a $1,0 \cdot 10^6$	0	0	0	0	0	0
$1,1 \cdot 10^6$ a $5,0 \cdot 10^6$	9	27	1	3,3	0	0
$5,1 \cdot 10^6$ a $1,0 \cdot 10^7$	2	6	0	0	0	0
$1,1 \cdot 10^7$ a $5,0 \cdot 10^7$	4	12	1	3,3	0	0
$5,1 \cdot 10^7$ a $1,0 \cdot 10^8$	5	15	0	0	0	0
TOTAL	30	100	30	100	30	100

cial (Quadro 3), observa-se que 30% das amostras deste tipo de leite mostrou contagens inferiores a  $5,1.10^5$  ufc/mL, sendo que a faixa de até  $5,0.10^6$  ufc/mL é quem apresentou a maior incidência numérica de amostras (27%). Além disso, nota-se que 33% delas estiveram acima desse limite de contagem. Constata-se, então, que as amostras de leite tipo B apresentaram uma baixa qualidade microbiológica, tanto em termos de contagem total quanto de coliformes totais, onde ambos apresentaram porcentagens muito próximas, especialmente para aquelas faixas menores que  $5,0.10^4$  ufc/mL.

Os resultados obtidos para o leite tipo Especial, se por um lado são semelhantes aos obtidos recentemente por PRATA(87), são inferiores aos que BARROS et alii (5) encontraram em leite cru na cidade de São Paulo, S.P., e inferiores àqueles obtidos em estudos anteriores na mesma região ora em estudo, por MACHADO (73), OLIVEIRA (80) e VILLAFANE (5), o que demonstra, apesar de tudo, uma melhoria nas condições higiênicas e de manuseio do leite nessa região.

Das análises do leite tipo B, conclui-se que os resultados são muito semelhantes aos de COVARRUBIAS & HAVERBECK (28), KARIM & KACHANI (65), PRATA (87), MACHADO (73) e VILLAFANE (5), o que o coloca em condições semelhantes aos dos leites de países do terceiro mundo. Por outro lado, mostram melhores resultados para coliformes totais, mas piores que os de COSTA et alii (27) tanto para leite obtido por ordenha manual como mecânica.

Os dados de ambos os tipos de leite, de uma forma geral, quando confrontados, se somam às observações de VILLAFANE (113) de que não existe, praticamente, diferença entre eles quando entregues na plataforma de recepção da indústria. Isto demonstra que, a par de todas as exigências efetuadas ao produtor, ou a fis-

calização tem se mostrado inoperante para abaixar o nível microbiológico de leite cru,, ou realmente tem-se que ir de encontro às propostas de OLIVEIRA & BORGES (81), já reforçadas por PRATA (87), de que as normas de legislação para o leite cru, e de modo especial para o leite tipo B, devem ser um tanto mais realistas e corresponderem às condições brasileiras, sem que haja uma simples transferência dos padrões de países mais adiantados, onde a realidade laticinista é completamente diferente daquela encontrada no Brasil.

### Desenvolvimento do ágar APT-S

A afirmação segura da contagem de microrganismos láticos é um ato difícil de ser realizado, uma vez que as bactérias láticas, por serem organismos muito exigentes, requerem meios de cultura muito complexos, os quais nem sempre exercem boa seletividade sobre os demais organismos presentes na amostra. Dessa forma, outros microrganismos são passíveis de crescimento nos meios utilizados para os láticos.

Para a contagem e isolamento de microrganismos láticos são encontrados na literatura vários meios de cultura. Dentre eles, o ágar APT é citado por GERALDINI et alii (45) como sendo superior, inclusive, ao meio de Elliker, tido por muitos autores como o melhor meio de cultura para bactérias láticas. No entanto, os resultados que levaram aqueles autores a essas conclusões foram obtidos em trabalhos com culturas puras. Para a contagem e isolamento a partir de leite cru, onde existe uma microflora muito variada, essa constatação nem sempre pode ser feita. Entretanto, KING & KOBURGER (66) e HITCHENER et alii (53) descrevem que obtiveram ótimos resultados no isolamento de microrganismos láticos.

cos quando utilizaram o ágar APT, em uma série de alimentos, como produtos lácteos, cárneos e vegetais. Assim, na tentativa de se aumentar ainda mais a eficiência do ágar APT, possibilitando obter um meio com maior seletividade para as bactérias lácticas, promoveu-se a adaptação no ágar APT que resultou no desenvolvimento do ágar APT-S.

Para a confirmação da eficiência do ágar APT-S no isolamento de microrganismos lácticos a partir de leite cru, foram montados experimentos destinados a verificar o comportamento da flora láctica em relação à flora total. Dessa forma, através de contagem total e contagens com os ágares APT e APT-S, buscou-se estudar, não somente a eficácia do meio de cultura adaptado, mas também a incidência da população láctica nas amostras.

No Quadro 4 são apresentados dados exemplificativos do comportamento das amostras nas contagens total e no ágar APT, cujos dados totais são apresentados no apêndice. Pelos dados mostrados no apêndice, percebe-se que as amostras de leite tipo B tiveram uma contagem total média de  $6,03 \cdot 10^6$  ufc/mL e uma contagem média em ágar APT de  $2,22 \cdot 10^6$  ufc/mL, enquanto os mesmos dados para o leite tipo Especial foram, respectivamente,  $1,73 \cdot 10^7$  ufc/mL e  $7,16 \cdot 10^6$  ufc/mL. Salta à vista que essas contagens apresentam uma relação muito próxima, ou seja, a contagem em ágar APT, que poderia traduzir a população láctica, está com dados muito próximos aos daquela envolvendo todos os microrganismos da amostra. Mesmo sendo o leite uma excelente fonte de microrganismos do grupo láctico, em condições normais, eles representam apenas uma parcela dos contaminantes, o que força, então, a pensar que os dados da contagem em APT não exprimem a realidade da flora láctica presente.

QUADRO 4. Resultados exemplificativos das análises de contagem total e contagem em ágar APT de amostras de leites tipos B e Especial, em unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL).

Tipo de leite	Nº da amostra*	Contagem total	Contagem em APT
B	07	$1,85 \cdot 10^6$	$5,50 \cdot 10^4$
	08	$3,84 \cdot 10^6$	$2,22 \cdot 10^6$
	09	$1,61 \cdot 10^6$	$2,18 \cdot 10^6$
	10	$3,90 \cdot 10^5$	$3,90 \cdot 10^5$
	11	$5,00 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^6$
	12	$2,48 \cdot 10^5$	$1,38 \cdot 10^5$
	13	$1,77 \cdot 10^6$	$3,50 \cdot 10^6$
	14	$4,00 \cdot 10^4$	$1,52 \cdot 10^4$
	15	$6,55 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^6$
Especial	02	$1,80 \cdot 10^7$	$1,33 \cdot 10^7$
	07	$6,20 \cdot 10^7$	$5,24 \cdot 10^7$
	09	$2,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^3$
	10	$6,85 \cdot 10^7$	$5,79 \cdot 10^6$
	11	$1,10 \cdot 10^6$	$7,40 \cdot 10^5$
	13	$4,20 \cdot 10^5$	$4,20 \cdot 10^5$
	14	$1,54 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$
	16	$1,10 \cdot 10^6$	$2,85 \cdot 10^5$
	21	$1,70 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^5$
	30	$4,40 \cdot 10^6$	$6,00 \cdot 10^4$

\* número original das amostras, como apresentado no Apêndice (Quadro 15).

A observação, tanto dos dados apresentados no Quadro 4, como pelos do Apêndice, possibilita constatar que algumas amostras tiveram resultados iguais entre as contagens, e em outras, as contagens em ágar APT foram superiores aos da contagem total. Isto, na verdade, reforça a idéia de que existe a necessidade de se criar uma seletividade ainda maior no ágar APT, quando da utilização de leite cru como fonte microbiana, já que os resultados de GERALDINE et alii (45) demonstraram a alta eficiência desse meio de cultura para crescimento de bactérias do grupo láctico.

Embora o aumento da seletividade dos meios de cultura possa ser conseguido através de diferentes maneiras, para bactérias lácticas, segundo CHO (21) e EMARD & VAUGHN (38), o emprego de ácido sórbico e seus sais, chamados genericamente de sorbatos, é particularmente eficiente, uma vez que os microrganismos catalase negativa são pouco afetados por esses compostos, especialmente em concentrações da ordem de 0,1% (6,11). A potencialização da ação dos sorbatos é auxiliada pela acidificação do meio, especialmente para faixas próximas a do pK dos compostos (44), e a simples redução do pH já atua como agente seletivo no desenvolvimento microbiano.

Na tentativa de encontrar os melhores parâmetros para a adaptação do meio APT, foram testadas várias combinações de concentração de sorbato de potássio e pH, tendo-se constatado que à medida em que se afastavam de 6,0 em direção a zona ácida, os valores do pH do meio, ocorria uma concomitante redução no tamanho das colônias dos microrganismos, o que dificultava a sua visualização para contagem e isolamento. Dessa forma, mesmo sendo certo de que na faixa de 3,0 a 4,5 existe uma maior quantidade de ácido não-dissociado, havendo maior seletividade, a acidificação do meio a esses valores de pH não puderam ser empregados, inclusive por-

que nem todos os componentes do grupo láctico se desenvolvem nesse intervalo de pH.

Com essa fundamentação, o meio de ágar APT foi adaptado pela adição de 0,1% de sorbato de potássio, 0,5% de ágar para facilitar a gelatinização, e o pH reduzido para 6,0 com ácido láctico, por ser o principal produto do metabolismo dos microrganismos lácticos, com o intuito de se obter um meio de cultura que permitisse caracterizar a flora láctica do leite cru, tal qual chega às indústrias de beneficiamento. O meio assim desenvolvido foi denominado de ágar APT-S.

As condições de pH e concentração de sorbato de potássio escolhidas para a adaptação do meio APT, após vários ensaios prévios, se mostraram muito boas para as bactérias lácticas, como pode ser observado pelo Quadro 5, que traduz os resultados do crescimento de culturas puras de microrganismos catalogados em coleções nacionais e internacionais de culturas, tanto no meio APT original, como no adaptado. Pela verificação do Quadro 5 constata-se que nenhuma das linhagens de *S. lactis* testadas apresentou inibição. Ao contrário, as contagens foram maiores no meio APT-S que no meio APT original. Já, com relação as linhagens de *S. cremoris*, *S. diacetylactis* e *Lactobacillus casei*, foi constatada uma leve inibição, porém, sem que essa inibição comprometesse os resultados ou a utilização do ágar APT-S. Diferentemente das demais espécies, as linhagens de *Leuconostoc* foram as únicas a apresentarem uma inibição apreciável.

As observações realizadas em função do Quadro 5, quando somadas às indicações de SOFOS & BUSTA (104), permitem concluir que os parâmetros acrescentados na adaptação realizada com o meio APT, em muito se prestam para a contagem de microrganismos do grupo lácti-

QUADRO 5. Resultados das contagens de culturas puras de microrganismos do grupo láctico nos meios de cultura APT e APT-S.

Espécie	Linhagem	APT	APT-S
<i>Streptococcus lactis</i>	NCDO 2001	1,45.10 <sup>6</sup>	2,20.10 <sup>6</sup>
<i>Streptococcus lactis</i>	NCDO 2003	1,15.10 <sup>6</sup>	1,20.10 <sup>6</sup>
<i>Streptococcus lactis</i>	ATCC 7962	1,01.10 <sup>8</sup>	1,69.10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus lactis</i>	SLL 13	1,53.10 <sup>9</sup>	2,08.10 <sup>9</sup>
<i>Streptococcus lactis</i>	SLL 10	1,09.10 <sup>9</sup>	1,09.10 <sup>9</sup>
<i>Streptococcus cremoris</i>	HP	1,50.10 <sup>8</sup>	4,10.10 <sup>7</sup>
<i>Streptococcus cremoris</i>	NCDO 1998	5,40.10 <sup>8</sup>	1,60.10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus cremoris</i>	NCDO 1999	3,70.10 <sup>8</sup>	3,25.10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus cremoris</i>	NCDO 1428	3,45.10 <sup>8</sup>	3,21.10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	NCDO 176	2,11.10 <sup>9</sup>	1,98.10 <sup>8</sup>
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	SLL 11	8,00.10 <sup>8</sup>	1,16.10 <sup>9</sup>
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	SLL 29	1,32.10 <sup>9</sup>	8,25.10 <sup>8</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	NCDO 161	6,95.10 <sup>8</sup>	2,50.10 <sup>8</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	SLL 156	3,98.10 <sup>8</sup>	3,83.10 <sup>8</sup>
<i>Leuconostoc cremoris</i>	SLL 155	4,20.10 <sup>4</sup>	2,90.10 <sup>3</sup>
<i>Leuconostoc sp</i>	SLL 322	5,40.10 <sup>4</sup>	4,82.10 <sup>4</sup>
<i>Propionibacterium sp+</i>	ITAL	1,00.10 <sup>3</sup>	9,80.10 <sup>2</sup>
<i>Propionibacterium sp+</i>	SLL 335	5,10.10 <sup>3</sup>	5,00.10 <sup>3</sup>

+ linhagens cultivadas em condições anaeróbicas

co a partir de amostras de leite cru, uma vez que os contaminantes naturais desse produto são inibidos nessas condições, e os lácticos, se o forem, serão de tal forma pouco inibidos que não interferirão substancialmente nos resultados.

São mostrados, no Quadro 6, dados exemplificativos da contagem total, e contagem em ágar APT e ágar APT-S, procurando traduzir o comportamento apresentado em todas as amostras, que têm seus resultados tabelados no Apêndice. Observando-se os dados desse experimento, nota-se que houve uma redução na contagem em ágar APT-S, com relação aqueles da contagem total, refletindo um possível efeito seletivo sobre a microflora presente.

Considerando que a contagem total expressa, ao menos em tese, a porcentagem total da microflora presente nas amostras, e que as bactérias lácticas são passíveis de crescimento em ágar padrão, observa-se a existência de uma relação percentual entre as contagens que tentam exprimir a flora láctica e a contagem total. Assim, nas amostras de leite tipo B, a contagem em APT corresponde a 36,12% da contagem total, enquanto que a de APT-S equivale a 1,48%. Já para o leite tipo Especial, as relações correspondentes são de 41,39% para APT e 4,42% para APT-S. Esses resultados percentuais, se por um lado são inferiores aos de GAHLOT et alii (42), por outro estão altamente relacionados com os de KARIM & KACHANI (65), sendo que as condições de obtenção das amostras estão muito mais próximas às de KARIM & KACHANI (65) que às de GAHLOT et alii (42), o que reforça a idéia de que os dados obtidos com o meio de cultura APT-S refletem a contagem microbiana láctica das amostras de leite analisadas.

A baixa relação percentual de microrganismos lácticos do leite tipo B pode ser explicada pelo fato das amostras terem

QUADRO 6. Resultados exemplificativos do comportamento da contagem total e contagem em ágar APT e ágar APT-S, em ufc/mL.

Tipo de leite	Nº da amostra*	Contagem total	Contagem em APT	Contagem em APT-S
B	07	$1,85 \cdot 10^6$	$5,50 \cdot 10^4$	$4,05 \cdot 10^5$
	08	$3,84 \cdot 10^6$	$2,22 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^5$
	09	$1,61 \cdot 10^6$	$2,18 \cdot 10^6$	$2,00 \cdot 10^3$
	10	$3,90 \cdot 10^5$	$3,90 \cdot 10^5$	$4,50 \cdot 10^4$
	11	$5,00 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^6$	$4,00 \cdot 10^2$
	12	$2,48 \cdot 10^5$	$1,38 \cdot 10^5$	$1,50 \cdot 10^5$
	13	$1,77 \cdot 10^6$	$3,50 \cdot 10^6$	$6,72 \cdot 10^4$
	14	$4,00 \cdot 10^4$	$1,52 \cdot 10^4$	$1,81 \cdot 10^3$
	15	$6,55 \cdot 10^6$	$1,52 \cdot 10^6$	$8,72 \cdot 10^4$
	16	$2,86 \cdot 10^6$	$5,19 \cdot 10^5$	$2,00 \cdot 10^4$
E	02	$1,80 \cdot 10^7$	$1,33 \cdot 10^7$	$8,40 \cdot 10^2$
	07	$6,20 \cdot 10^7$	$5,24 \cdot 10^7$	$5,08 \cdot 10^6$
	09	$2,00 \cdot 10^6$	$5,00 \cdot 10^3$	$4,50 \cdot 10^4$
	10	$6,85 \cdot 10^7$	$5,79 \cdot 10^6$	$3,15 \cdot 10^4$
	11	$1,10 \cdot 10^6$	$7,40 \cdot 10^5$	$3,08 \cdot 10^3$
	13	$4,20 \cdot 10^5$	$4,20 \cdot 10^5$	$2,85 \cdot 10^4$
	14	$1,54 \cdot 10^6$	$1,11 \cdot 10^6$	$2,20 \cdot 10^6$
	16	$1,10 \cdot 10^6$	$2,85 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^4$
	21	$1,70 \cdot 10^5$	$9,00 \cdot 10^5$	$6,00 \cdot 10^4$
L	30	$4,40 \cdot 10^6$	$6,00 \cdot 10^4$	$4,98 \cdot 10^4$

\* número original das amostras, conforme apresentado no Apêndice.

sido obtidas de leites em latões. Quando o produto é acondicionado em carretas, mesmo que isotérmicas, a distância e, logicamente, o tempo para se chegar à indústria são maiores. Assim, esses microrganismos conseguem se multiplicar mais rapidamente que os demais contaminantes, elevando a relação percentual

#### Isolamento e identificação da microflora

Utilizando-se o meio de cultura ágar APT-S, foram isoladas 300 colônias a partir de 50 amostras de leite cru. Dessas, através da seqüência metodológica empregada para a confirmação de características relacionadas com o grupo láctico, foram descartadas 118 culturas, dando, assim, ao ágar APT-S um índice de eficiência de isolamento de bactérias lácticas de 60,7%. A distribuição das 182 culturas de microrganismos lácticos isolados é mostrada no Quadro 7.

QUADRO 7. Frequências de isolamento e porcentagem relativa das espécies de bactérias lácticas isoladas de leite cru, com a utilização do ágar APT-S.

Espécie	frequências	%
<i>Streptococcus lactis</i>	144	79,20
<i>S. cremoris</i>	12	6,55
<i>S. lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	12	6,55
<i>Lactobacillus casei</i>	8	4,40
<i>L. lactis</i>	4	2,20
<i>Leuconostoc cremoris</i>	2	1,10
TOTAL	182	100

Os resultados do quadro 7 evidenciam a clara predominância da espécie *Streptococcus lactis* (79,20%) nas amostras analisadas. Esses dados assim demonstrados estão amplamente de acordo com aqueles descritos por CHAZAUD (20), KING & KOBURGER (66), LAWRENCE et alii (70), MACHADO (73) e SANDINE et alii (98), de que esse tipo de microrganismo domina amplamente a flora isolada a partir de leite cru, podendo chegar, como citado por SANDINE et alii (98), a constituir 95% dos organismos lácticos isolados.

No decorrer do experimento, linhagens de *Streptococcus lactis* foram isoladas de todas as amostras testadas, em qualquer um dos dois tipos de leite analisados, representando, portanto, uma frequência de 100%. As demais espécies isoladas tiveram a seguinte frequência de aparecimento: *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*, 15%; *Lactobacillus casei*, 15%; *Streptococcus cremoris*, 9%; *Lactobacillus lactis*, 4% e *Leuconostoc cremoris*, 2%.

Os resultados de porcentagens de isolamento de linhagens de *S. cremoris* (6,55%) estão próximos àqueles obtidos por Radich, segundo citação de SANDINE et alii (98), de 9,68%. KING & KOBURGER (66) e LAWRENCE et alii (70) relatam que o *S. cremoris* aparece em número muito menor que o *S. lactis*, embora, possivelmente, estejam presentes nas mesmas condições ambientais, somente que, por estarem em número baixo, perdem-se durante a realização das diluições. Este é um fato a ser considerado, principalmente quando se sabe que, como citado por LAWRENCE et alii (70), em fermentos lácticos mistos, normalmente o crescimento do *S. cremoris* sobrepuja o de *S. lactis*, ou seja, com número semelhante de células, o *S. cremoris* pode apresentar uma velocidade de desenvolvimento superior a do *S. lactis*.

Por esses dados pode-se concluir, então, que o isolamento de *S. cremoris*, por técnicas que não envolvam pré-incubações,

como recomendado por Radich (Apud 98), é pouco fácil de ser obtido, e que o meio APT-S, ora desenvolvido, se comportou bem no tocante ao isolamento desse microrganismo.

Os dados sobre o aparecimento de *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis* (Quadro 7), tal qual para *S. lactis* e *S. cremoris*, também seguem os dados de Radich (Apud 98). Da mesma forma que as demais espécies do gênero *Streptococcus*, o *S. diacetylactis* também foi isolado de ambos os tipos de leite testados, só que diferentemente do *S. cremoris*, onde 66,7% (8 culturas) foram isoladas de leite tipo B, esse microrganismo não apresentou preferência por algum tipo de leite.

Os resultados do isolamento de *Lactobacillus casei* seguiu extritamente o preconizado por JENSEN & EDMONSON (63) e HILL & THORNTON (52) de que essa espécie de lactobacilo aparece em leite cru. Além disso, HANSEN (49) já observou que extratos celulares de *S. cremoris* e *S. lactis* beneficiam o desenvolvimento desse microrganismo. Assim, se nas amostras analisadas houve ocorrência de lise celular de linhagens de *S. lactis* e *S. cremoris*, o desenvolvimento de *L. casei* foi beneficiado. E mais, como a temperatura de incubação das amostras foi de 32°C e não se utilizou nenhuma técnica especial para gerar anaerobiose, a incidência das demais espécies de lactobacilos foi prejudicada, enquanto que o *L. casei* que é um organismo mesófilo típico, conseguiu se desenvolver. Vale ressaltar, ainda, que todas as linhagens de *L. casei* isoladas são da subespécie *casei*.

O aparecimento de 4 linhagens de *Lactobacillus lactis* (2,20% dos isolados), possivelmente exprime uma capacidade dessas culturas de se desenvolverem em temperaturas pouco ótimas, além de conseguirem vencer a competição existente no desenvolvimento

da microflora. Isso, no entanto, difere dos dados de JENSEN & EDMONSON (63) que não obtiveram lactobacilos em leite cru, e também de HILL & THORNTON (52) que não obtiveram lactobacilos capazes de crescer abaixo de 45°C. Porém, vem de encontro às conclusões dos mesmos JENSEN & EDMONSON (63) de que quanto melhor a qualidade do leite, mais facilmente se obtém lactobacilos. As 12 culturas de lactobacilos isoladas foram provenientes de amostras de leite tipo B, nas quais a contagem total era inferior a  $1,0 \cdot 10^6$  ufc/mL, e dessa forma, puderam vencer a competição estabelecida com os estreptococos e outros possíveis contaminantes, sendo, então isoladas.

Como afirmado por HILL & THORNTON (52) de que a bacteriologia do leite de clima frio pode ser diferente da de áreas temperadas, é de se esperar que isso também se dê para as zonas de clima tropical. Tal fato pode ter contribuído para que se obtivessem culturas de *L. lactis*, mesmo tendo se usado incubação em temperaturas sub-ótima para esse microrganismo.

Também chama a atenção na observação do Quadro 7 o fato do grupo láctico estar quase que totalmente representado. No entanto, há uma porcentagem de incidência muito baixa de *Leuconostoc* e nula de propiônicos. Isso indica que, além de estarem numa proporção muito baixa, outros fatores possivelmente interferiram no seu não isolamento, como: o meio APT-S pode não ter exercido uma boa seletividade para esses microrganismos ou foram descartados por não apresentarem as reações características em leite tornassolado. Para a constatação da possível presença desses organismos em leite cru, foram testados meios específicos para cada um desses gêneros, verificando-se uma incidência de *Leuconostoc* em 20% das amostras testadas. Tanto HARRIGAN & McCANCE (50), como MAYEUX et alii (76) recomendam a utilização de azida de sódio

como agente seletivo para os integrantes do gênero *Leuconostoc*. Possivelmente, por estarem em baixa frequência, esses organismos perdem a competição para os estreptococos, quando o agente de seleção é o sorbato de potássio.

Para o isolamento de microrganismos propiônicos, a partir de leite cru, sem qualquer pré-tratamento, a utilização de mecanismos geradores de anaerobiose favorece o desenvolvimento de lactobacilos, perdendo os propiônicos na competição que se estabelece nas amostras. Quando da utilização de fontes ricas de *Propionobacterium*, como queijo tipo Suíço ou mesmo culturas puras dessas bactérias, verifica-se que tais organismos são passíveis de crescimento no meio APT-S, somente que devem ser empregados anaerobiose e maior tempo de incubação, beneficiando, assim, esse tipo de microrganismo.

#### Caracterização dos isolados

A elucidação de várias características das diferentes espécies isoladas assume um caráter importante, especialmente quando se trata de observar o comportamento das linhagens sob uma ótica geral. Isto porque são inexistentes os dados sobre a caracterização da flora láctica como um todo, pois a literatura somente trata de caracterizar bactérias para uso específico, como fermento industrial, não dando a atenção devida às variações que ocorrem como decorrência da heterogeneidade das linhagens presentes em leite cru.

Buscando, então, informações que permitissem caracterizar a flora láctica presente em leite cru, foram realizados ensaios com os organismos isolados quanto ao seu comportamento em

diferentes temperaturas, atividade acidificante, tempo de geração e atividade proteolítica, para, dessa forma, ter-se uma idéia real do comportamento global da flora láctica brasileira e as suas possibilidades de aplicações

### Comportamento em diferentes temperaturas

A atividade primária da maioria dos organismos pertencentes ao grupo láctico é a conversão de carboidratos fermentescíveis em ácido láctico, gerando um poder acidificante ao meio de desenvolvimento. Montou-se, então, um experimento com a finalidade de medir o crescimento das diversas linhagens de microrganismos isolados, em diferentes temperaturas de incubação, através do pH desenvolvido em leite estéril. Para tanto, considerou-se como desenvolvimento completo dos microrganismos o ato de promover a coagulação do leite em 24 horas, coincidindo com uma faixa de pH compreendida entre os valores 4,5 e 5,0.

É sabido que as bactérias lácticas podem se desenvolver em um amplo espectro de temperatura. Assim, procurou-se abranger pontos de temperatura diferentes. Utilizou-se a faixa de 30° - 32°C por ser considerada ótima para os organismos mesófilos do grupo láctico, os quais representam a maioria dos integrantes do grupo. A temperatura de 42°C, também escolhida para teste, além de propiciar uma adequação a possíveis organismos termófilos presentes, indica também o desenvolvimento dos mesófilos em temperaturas superior ao seu ótimo. Por outro lado, pode-se extrapolar que as culturas mesófilas que mostram bom desenvolvimento a 42°C, podem apresentar boas características para serem empregadas como fermento láctico industrial em nossas condições, uma vez que, na fabricação de queijos de massa semi-cozida são empregadas tempera

turas nessa faixa para o semi-cozimento da massa. A incubação a 21°C se deveu, principalmente, à tendência internacional de se utilizar a faixa de temperatura compreendida entre 21°-22°C para o desenvolvimento das culturas mesófilas, especialmente para se diferenciar culturas rápidas de culturas lentas, tal como citado por BOTTAZZI (9) e CITTI et alii (23). Os resultados desse experimento são apresentados no quadro 8.

Pela observação do Quadro 8, verifica-se que, sob os parâmetros estabelecidos para o desenvolvimento completo, as culturas isoladas se comportaram da seguinte maneira: 18 (9,9% do total) cresceram a 21°C, 100 (54,9%) a 32°C e 46 (25,3%) a 42°C.

Uma análise mais detalhada do Quadro 8 permite observar que, a 21°C, em contraste com 18 culturas com desenvolvimento completo, 53,8% (98 culturas) praticamente não apresentaram desenvolvimento nessa temperatura, ao menos nas primeiras 24 horas de incubação, uma vez que não conseguiram transpor a zona de pH correspondente a 6,0. Enquanto isso, 36,2% das culturas tiveram um desenvolvimento apenas parcial, não conseguindo coagular o leite nas condições empregadas, mostrando apenas uma variação nos valores de pH da ordem de uma unidade, o que reflete um discreto desenvolvimento. Deve ser ressaltado, ainda, que das dezoito culturas que mostraram crescimento na temperatura de 21°C, doze também cresceram nas outras temperaturas utilizadas, sendo que somente seis não se desenvolveram a 42°C.

Segundo as afirmações de COX (29), as dezoito culturas que conseguiram crescer bem a 21°C são, à primeira vista, potenciais para testes visando a sua utilização como fermento, visto que, segundo aquele autor, culturas que crescem bem a 21°C têm menores chances de apresentar perda de sua capacidade acidificante, coisa que não acontece com aquelas que se desenvolvem bem somente a 32°C.

QUADRO 8. Distribuição dos microrganismos, segundo a capacidade de crescimento a 21°, 32° e 42°C, usando inóculo de 1,0% e 24 horas de incubação.

Faixa de pH	21°C		32°C		42°C	
	N.C.*	%	N.C.*	%	N.C.*	%
6,50 - 6,00	98	53,8	8	4,4	64	35,1
6,00 - 5,50	46	25,2	26	14,3	32	17,5
5,50 - 5,00	20	11,0	48	26,4	40	22,0
5,00 - 4,50	18	9,9	65	35,7	22	12,1
4,50 - 4,00	-	-	33	18,1	2	1,1
4,00 - 3,50	-	-	2	1,1	22	12,1
TOTAL	182	100	182	100	182	100

\* N.C. = número de culturas

Nos dados mostrados no Quadro 8 fica claro que a maioria das culturas isoladas não cresceu na temperatura de 21°C. BOTTAZZI (9), CITTI et alii (23), COGAN (24) e LAWRENCE et alii (70) definem que, com vistas à aplicação tecnológica, as culturas que não coagulam o leite dentro de 18-24 horas nas temperaturas de 21°C são consideradas como sendo culturas lentas. Embora a caracterização tecnológica não tenha sido o enfoque essencial deste trabalho, segundo aqueles autores, a maioria dos isolados são considerados como culturas lentas. Porém, é provável que esse fato se deva a uma adaptação dos organismos a temperaturas mais elevadas do que a temperatura onde tal conceito foi estabelecido, como é o caso em questão. Essa suposição encontra suporte nas afirmações de JENSEN e EDMONSON (63) de que deve existir uma diferença de comportamento entre as bactérias isoladas em condições climaticamente diferentes. No entanto, no presente trabalho não se pretendeu isolar e focar as culturas especificamente sobre aquelas definições.

A presença de culturas com uma lenta capacidade de desenvolvimento a 32°C também pode ser evidenciada no Quadro 8. Nota-se, aí, que cerca de 45% dos isolados não apresentaram pleno desenvolvimento nessa temperatura de incubação. Nesses dados podem estar incluídos além de estreptococos e *Leuconostoc sp*, alguns lactobacilos, visto que nessa temperatura nem todos são passíveis de produzir acidez. Mas, por outro lado, a maioria das culturas produziu ácido lático suficiente para levar o leite até a coagulação, onde o maior valor individual nos intervalos de pH corresponde à faixa de 5,0 a 4,5, representada por 65 culturas (35,7%).

Sobre os dados relativos à capacidade de desenvolvimento dos microrganismos na temperatura de 42°C, é possível observar que vários organismos apresentaram um bom desenvolvimento nes

sa temperatura de incubação, indicando uma versatilidade de crescimento, mesmo considerando que alguns lactobacilos têm nessa temperatura a sua faixa ótima de desenvolvimento. Pode ser notado ainda pelo Quadro 8 que, na temperatura de 42°C, as culturas se apresentaram, aproximadamente, em três grupos. O primeiro composto por 64 culturas (35,1%) praticamente não mostrou desenvolvimento nessa temperatura. No segundo grupo, cujo pH esteve entre 5,0 e 6,0, colocaram-se 72 culturas (39,5%). E, por fim, no terceiro grupo estão reunidas as 46 culturas (25,3%) que tiveram um bom desenvolvimento, levando o leite à coagulação. Chama a atenção, ainda, o fato de que uma considerável porcentagem de microrganismos apresentou, na temperatura de 42°C, uma capacidade de desenvolvimento superior àquela apresentada a 32°C, levando o pH para valores bem mais baixos, ou seja, na faixa de 3,5 a 4,0. O número de isolados que conseguiu levar o pH do meio para essa faixa foi, inclusive, superior àquele cujo pH final ficou entre 4,0 e 4,5. Este fato reflete uma possível adaptação da microflora às condições ambientais, permitindo que seus integrantes possam, então, se desenvolver bem em temperaturas mais elevadas que a sua faixa ótima de desenvolvimento. Por outro lado, esse tipo de constatação somente pode ser empregado para as linhagens de *S. lactis*, visto que nenhum dos isolados de *S. cremoris* conseguiu se desenvolver, ao menos razoavelmente, a 42°C. Este fato, no entanto, pode ser explicado por ser uma característica inerente aos integrantes dessa espécie o não desenvolvimento em temperaturas superiores a 40°C.

São mostrados no Quadro 9 os resultados, por espécie de microrganismo isolado, dos valores médios de pH alcançados após desenvolvimento por vinte e quatro horas em cada uma das três temperaturas testadas, e seus respectivos dados de desvio padrão. Po

de ser observado, por esse quadro, que mesmo em se tratando de linhagens selvagens cujos comportamentos são muito heterogêneos, com diferenças marcantes entre as linhagens, interferindo, assim, no resultado da flora láctica como um todo, os dados relativos às espécies *S. lactis*, *S. lactis* subsp *diacetylactis*, *L. casei* e *L. lactis* são bastante significativos, especialmente como média de uma população heterogênea. Os dados referentes a *S. cremoris* evidenciam que nas linhagens isoladas dessa espécie, a característica de células com baixo poder acidificante é mais marcante que nas demais, visto que, mesmo à temperatura de 32°C, os resultados médios das leituras do pH desenvolvido ficaram numa faixa mais baixa que aqueles encontrados para as espécies *S. lactis* e *S. diacetylactis*, que são os organismos mais relacionados com *S. cremoris*.

As linhagens de *Lactobacillus* confirmaram as expectativas de maior acidificação por parte dos integrantes desse gênero, especialmente aqueles agrupados entre os lactobacilos termófilos. Pode, assim, ser constatado que as células de *L. lactis* geraram um pH mais baixo quando na temperatura de 42°C, sendo nas demais temperaturas suplantado pelas linhagens de *L. casei*. Este fato também foi observado por BOTTAZZI (9), COX (29) e GORDON e SHAPTON (48).

As duas culturas de *Leuconostoc cremoris* também não revelaram qualquer surpresa quanto ao seu comportamento, uma vez que os integrantes desse gênero não são tidos como bons produtores de acidez. Dessa forma, as médias obtidas nas três temperaturas estão totalmente dentro do que poderia ser esperado para esses microrganismo, visto que eles são passíveis de mostrar crescimento celular quando se utiliza leite como meio de desenvolvimento, embora nem sempre desenvolvam acidez suficiente para promoverem grandes alterações de pH, em vinte e quatro horas de incubação.

QUADRO 9. Resultados médios, por espécie isolada, do pH desenvolvido em leite estéril, após 24 horas de incubação com inoculação de 1,0%.

Espécie	Número de isolados		21°C	32°C	42°C
<i>Streptococcus lactis</i>	144	$\bar{x}^*$	5,72	4,80	5,44
		DP**	0,53	0,38	0,94
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	12	$\bar{x}$	5,91	4,82	5,11
		DP	0,29	0,54	0,60
<i>Streptococcus cremoris</i>	12	$\bar{x}$	5,89	5,14	6,00
		DP	0,57	0,72	0,33
<i>Lactobacillus casei</i>	8	$\bar{x}$	5,28	4,36	4,21
		DP	0,28	0,34	0,51
<i>Lactobacillus lactis</i>	4	$\bar{x}$	5,99	4,70	4,01
		DP	0,45	0,70	0,44
<i>Leuconostoc cremoris</i>	2	$\bar{x}$	6,33	5,85	6,38
		DP	0,04	0,21	0,04

\*  $\bar{x}$  = média

\*\* DP= desvio padrão

Nos estudos envolvendo microrganismos lácticos, normalmente se utilizam linhagens obtidas em coleções de culturas internacionais, muito raramente isoladas em condições semelhantes às desse experimento. Isto pode acarretar comportamentos diferentes para os microrganismos. Procurou-se, então, comparar o comportamento dos isolados frente àquele apresentado por linhagens internacionalmente conhecidas. Assim, no Quadro 10, são mostrados os resultados obtidos em condições semelhantes àqueles do Quadro 9, somente que se trata de dados de organismos catalogados em coleções internacionais, amplamente difundidos entre os pesquisadores da área, e comumente empregadas como fermento láctico industrial. Quando se comparam os resultados dos Quadros 9 e 10, verifica-se que os valores médios de pH referentes aos *S. lactis* isolados são inferiores àqueles considerados como referência. É certo, no entanto, que os dados do Quadro 9 traduzem a média de toda população de *S. lactis* isolada, incluindo aqueles de acidificação mais lenta, ao lado daqueles que apresentaram capacidade acidificante semelhante ou até melhor que alguns dos microrganismos referência. Já os isolados de *L. casei*, como um todo, mostraram-se superiores às linhagens usadas como referência. Isso vem constatar que é possível isolar de leite cru, no Brasil, microrganismos lácticos com características semelhantes ou até melhores que os de coleções internacionais.

#### Atividade acidificante

Como o intuito primário da caracterização de bactérias lácticas é sua capacidade de produzir ácido láctico, o conhecimento do poder acidificante desses microrganismos é um dado altamente interessante. Porém, não existe uma padronização para essa

QUADRO 10. Dados do pH desenvolvido pelos microrganismos referência nas temperaturas de 21°C, 32°C e 42°C, com 1,0% de inóculo e 24 horas de incubação

	21°C	32°C	42°C
<i>S. lactis</i> NCDO 1992	4,3	4,1	4,8
<i>S. lactis</i> NCDO 2001	4,3	4,0	4,4
<i>S. lactis</i> NCDO 2003	4,6	4,8	5,3
<i>S. lactis</i> ATCC 7962	5,1	4,8	5,0
<i>S. cremoris</i> AM2	4,3	4,1	6,2
<i>S. cremoris</i> NCDO 1998	4,4	4,2	6,0
<i>S. cremoris</i> HP	5,8	5,4	5,2
<i>S. diacetylactis</i> * NCDO 176	4,6	4,6	5,0
<i>S. diacetylactis</i> * ITAL 162	5,6	5,1	5,1
<i>L. casei</i> ATCC 7469	4,6	4,3	4,5
<i>L. casei</i> NCDO 251	5,7	5,4	5,4

\* *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*

determinação o que dificulta a comparação dos isolados. Indica-se na literatura que essa atividade pode ser medida com cinco e vinte e quatro horas de incubação a 30°C, cujos valores resultam em informações necessárias para o conhecimento do comportamento acidificante dos organismos, visando, inclusive, a sua possível aplicação industrial. Em vista disso, procurou-se caracterizar a atividade acidificante de cada espécie isolada, sendo os seus resultados médios mostrados no Quadro 11 e os totais no Quadro 16.

A observação dos dados do Quadro 11 possibilita perceber que, embora o conjunto de microrganismos isolados constitua uma flora heterogênea, de um modo geral, esta mostrou uma boa capacidade geradora de ácido lático, destacando-se, principalmente, as linhagens de *S. lactis* e *L. casei*, cujos dados médios e respectivos de acidez desenvolvida são 68°D e 79°D, o que corresponde, respectivamente, a 0,68 e 0,79% de ácido lático. Se os dados obtidos com as linhagens de *S. lactis* chegarem a ser considerados não muito elevados para organismos potencialmente produtores de acidez, nas afirmações de COX (29) sobre a faixa da produção de ácido lático para culturas a serem empregadas como fermentos industriais na indústria de processamento de queijos, encontra-se a evidência que, como média, as linhagens de *S. lactis* se enquadram perfeitamente dentro dos limites de 0,6 a 1,0% de ácido, estabelecidos por aquele autor. ROSS (97) também estabeleceu que ótimos fermentos para queijo tipo Cheddar devem apresentar atividade de 0,6-0,7% de ácido lático ou pH entre 4,6 e 4,7. Nota-se, portanto, pelos dados do Quadro 11, que tanto as linhagens de *S. lactis* quanto as de *S. diacetylactis* se encaixam dentro de tais padrões, evidenciando uma atividade acidificante que permite, inclusive, sua seleção para testes visando à aplicação industrial, desde que apresentem outras características inerentes a esse fim. GARCIA

QUADRO 11. Médias das atividades acidificantes, por espécies isolada, com inoculação à razão de 1,0% e incubação a 30°C ou 42°C:

Espécies	Número de isolados	ATIVIDADE				
		5 hs		24 hs		
		pH	°D	pH	°D	
<i>Streptococcus lactis</i>	144	$\bar{x}^*$	6,00	18,5	4,70	68,40
		DP	0,11	1,31	0,47	14,54
<i>Streptococcus lactis</i> subsp <i>diacetylactis</i>	12	$\bar{x}$	5,90	19,0	4,60	62,50
		DP	0,09	1,29	0,31	10,04
<i>Streptococcus cremoris</i>	12	$\bar{x}$	6,03	17,8	4,80	59,00
		DP	0,12	0,75	0,51	12,80
<i>Leuconostoc cremoris</i>	2	$\bar{x}$	6,10	17,00	5,80	20,00
		DP	0,01	0,04	0,05	0,08
<i>Lactobacillus lactis</i> ***	4	$\bar{x}$	5,60	31,0	3,87	94,00
		DP	0,09	1,15	0,17	5,94
<i>Lactobacillus casei</i>	8	$\bar{x}$	6,10	17,00	5,80	79,00
		DP	0,01	0,04	0,05	0,08

\*  $\bar{x}$  = média

\*\* DP = desvio padrão

\*\*\* = incubadas a 42°C

(43) também obteve resultados semelhantes para culturas destinadas à fabricação de queijos nacionais tipo Minas e Prato.

O fato de algumas linhagens de *S. lactis* terem conseguido atingir valores de 133°D (1,33% de ácido lático), dados inclusive superiores até aos dos lactobacilos, reforça-se a idéia de que o leite cru nacional é uma boa fonte de microrganismos lácticos com alta capacidade de acidificação.

As linhagens isoladas de *S. diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris* mostradas no Quadro 11, também se enquadram dentro dos padrões estabelecidos por COX (29), de que na atividade acidificante medida com cinco horas de incubação a 30°C, a maioria das células apresenta atividade menor que 0,3% de ácido lático. Também os resultados médios obtidos para *S. diacetylactis* estão muito próximos daqueles obtidos por GORDON & SHAPTON (48) para a linhagem 1006 desse microrganismo. Os resultados apresentados pelos isolados de *S. cremoris* estão, por sua vez, próximos aos dados selecionados por ROSS (97), mas inferiores aos de COX (29), HUGGINS & SANDINE (55), GORDON & SHAPTON (48) e WULF & SANDINE (114). Vale ressaltar, uma vez mais, no entanto, que os dados mostrados no Quadro 11 refletem a média de uma população selvagem, enquanto que os obtidos por aqueles pesquisadores se devem a culturas já selecionadas. Segundo COLLINS (26), muitos *S. cremoris* não são bons produtores de acidez, e a população isolada desse microrganismo se enquadra dentro desses preceitos, mesmo porque, diferentemente de *S. lactis* onde algumas linhagens obtiveram resultados muito acima daqueles preconizados pela literatura, o comportamento das linhagens de *S. cremoris* foi muito homogêneo, não havendo nenhuma linhagem que sobrepujasse em muito as demais.

O comportamento apresentado no Quadro 11 pelas linhagens de *L. casei* quanto à atividade acidificante e produção de

ácido foi, de certa forma, homogênea, visto que os valores resultantes do cálculo do desvio padrão, especialmente para as determinações de pH, traduzem uma semelhança de comportamento entre as culturas testadas. Já as linhagens de *L. lactis*, testadas a 42°C por serem organismos termófilos, demonstraram um comportamento bem condizente com as outras linhagens já estudadas desse microrganismo. Assim, os resultados médios das atividades acidificantes são em muito semelhantes àqueles já obtidos por BOTTAZZI et alii (10); COX (29), SING & SHARMA (103) para os organismos do grupo *L. lactis-bulgaricus*, e superiores aos dos mutantes Prt<sup>-</sup> descritos por BOTTAZZI (9). Tal qual para *L. casei*, os baixos valores de desvio padrão para as linhagens de *L. lactis* indicam que entre as culturas testadas não houve variações significativas de comportamento acidificante, quer quanto ao pH desenvolvido (3,6-4,1), quer quanto à acidez produzida (89-102°D). Isso indica que, mesmo sendo normalmente suplantado pelos estreptococos em crescimento misto, os lactobacilos presentes em leite cru mostraram uma maior homogeneidade de comportamento quanto a sua atividade acidificante.

### Tempo de geração

Dentro do contexto de caracterização dos isolados lácticos de leite cru, uma propriedade desses isolados que também deve chamar a atenção é o tempo de geração das espécies isoladas. Assim, no Quadro 12 são expressos os resultados médios do tempo de geração das espécies isoladas, e no Quadro 16 (Apêndice) os dados individuais dos isolados. Embora tenha sido preconizado por COLLINS (26) que a temperatura exerce importante influência no crescimento microbiano, podendo haver comportamentos em diferentes faixas de temperatura, optou-se por realizar a medida do tem-

QUADRO 12, Resultados médios do tempo de geração, por espécie, durante 6 horas de incubação a 30°C.

ESPÉCIE	Nº de isolados	G(h)	variação	DP
<i>S. lactis</i>	144	4,53	1,25-10,04	2,08
<i>S. cremoris</i>	12	7,20	5,02-10,04	2,24
<i>S. diacetylactis</i>	12	4,73	3,01-7,53	1,47
<i>L. casei</i>	8	3,50	2,48-5,02	1,08
<i>L. lactis</i>	4	4,24	3,85-5,02	0,68
<i>Leuconostoc cremoris</i>	2	29,26	28,39-30,13	1,29

G = tempo de geração

DP = desvio padrão

po de geração na faixa de temperatura ótima para a grande maioria dos isolados, segundo incubação por 6 horas a 30°C.

Analisando-se os resultados mostrados no Quadro 12, observa-se que os menores valores médios de tempo de geração foram obtidos pelas linhagens de *L. casei* e *L. lactis*, seguidas pelas espécies *S. lactis*, *S. diacetylactis*, *S. cremoris* e *Leuconostoc cremoris*. Mesmo apresentando, individualmente, o menor tempo de geração (1,25 h), as linhagens de *S. lactis* forneceram um dado médio de 4,53 hs. Porém, cumpre ressaltar que aproximadamente 10% das 144 culturas testadas tiveram um tempo de geração superior a 10,0 hs, o que forçou a média global a se deslocar para um valor mais alto. Entretanto, mesmo assim, incluindo-se aqueles 10% de culturas com altíssimos tempos de geração, os dados apresentados estão próximos daqueles encontrados por SHELAIH et alii (101). Outro dado constatado é que os *S. cremoris* apresentaram um tempo de geração relativamente elevado, o que pode explicar a sua baixa capacidade de acidificação. Esses dados são semelhantes aos encontrados por RICHARDSON et alii (94) e SHELAIH et alii (101), em ensaios com culturas Prt<sup>-</sup>.

Os altos valores de tempo de geração apresentados pelas linhagens de *Leuconostoc cremoris* são essencialmente devidos ao método de análise empregado neste experimento, visto que esses microrganismos não são bons produtores de ácido quando se desenvolvem em leite. Se se empregasse a quantidade de células produzidas como índice da medida de geração, provavelmente os resultados teriam sido melhores que os apresentados por acidificação.

#### Atividade proteolítica

Segundo alguns autores (24,78), o desenvolvimento microbiano, em leite, é função da sua atividade proteolítica em gerar compostos nitrogenados a partir de caseína como única fonte

de aminoácidos. Assim, como foi constatado que as culturas se comportam diferentemente quando crescidas em diferentes temperaturas, mostrou-se um experimento visando a caracterizar a atividade proteolítica dos isolados nessas diferentes temperaturas de crescimento. Dessa forma, determinou-se a atividade proteolítica de todos os isolados, naquelas temperaturas em que mostravam crescimento.

O Quadro 13 expressa os resultados da atividade proteolítica, nas temperaturas de 21°C, 32°C e 42°C, de um grupo de microrganismos, mostrando o comportamento de todos os isolados frente a essas condições. Assim, uma análise do Quadro 13 permite observar que a atividade proteolítica teve resultados muito diferentes nas 3 temperaturas utilizadas para o crescimento microbiano, deixando claro, novamente, a ocorrência de um comportamento heterogêneo da microflora isolada. Dentro desses dados chama a atenção o fato das culturas de *S. lactis*, que conseguiram se desenvolver em todas as temperaturas, exceção feita a cultura de número 10, mostrarem uma maior atividade proteolítica a 21°C que a 32°C ou a 42°C. Isso permite que tais culturas possam ser testadas para a utilização como fermentos lácticos mesófilos, uma vez que essa característica pode ser importante, por exemplo, na fabricação de queijos. Os valores numéricos da atividade proteolítica para essas culturas (nºs 13 e 121) são semelhantes aos de BEAUQUESNE & CANTÉRI (7), e superiores aos de CITTI et alii (23) e GARCIA (43). Já os valores apresentados pela cultura número 10 são idênticos a valores encontrados por GARCIA (43).

Outro dado interessante observado no Quadro 13 é que as culturas que não cresceram a 42°C tiveram resultados mais homogêneos, não ocorrendo as variações que podem ser observadas nas culturas com crescimento nas três temperaturas. Essa heterogeneidade também foi observada entre as culturas que não cresceram a 21°C.

QUADRO 13. Atividades proteolíticas, em  $\mu\text{g}$  de tirosina/mL, de algumas culturas representativas de isolados lácticos, segundo a temperatura de crescimento.

Cultura	$\mu\text{g Tyr/mL}$			Identificação
	21°C	31°C	42°C	
7	-*	3	2	<i>S. lactis</i>
10	5	5	5	<i>S. lactis</i>
13	96	64	65	<i>S. lactis</i>
15	-	34	29	<i>S. lactis</i>
19	-	23	25	<i>S. lactis</i>
29	-	248	253	<i>S. diacetylactis</i>
32	-	81	92	<i>S. lactis</i>
53	-	254	289	<i>L. casei</i>
54	45	50	-	<i>S. lactis</i>
90	-	18	0	<i>S. cremoris</i>
111	-	99	117	<i>L. casei</i>
118	-	350	396	<i>L. lactis</i>
119	-	372	402	<i>L. lactis</i>
121	119	92	90	<i>S. lactis</i>
145	46	45	-	<i>S. lactis</i>
147	-	179	115	<i>L. casei</i>
148	-	241	260	<i>L. casei</i>
149	3	3	-	<i>S. cremoris</i>
150	202	486	481	<i>L. casei</i>
152	293	202	253	<i>L. casei</i>
174	-	41	0	<i>S. cremoris</i>
186	24	27	-	<i>S. lactis</i>

\* não houve ocorrência de crescimento microbiano

A análise do Quadro 13, permite, observar ainda, que algumas culturas de *S. lactis* apresentaram a mesma atividade em ambas as temperaturas, enquanto que outras tiveram atividade maior em sua faixa ótima de desenvolvimento (32°C), enquanto outras, ainda, parece que foram influenciadas positivamente pela temperatura de 42°C, onde apresentaram atividade mais elevadas. Por outro lado, as linhagens de *S. lactis* tiveram, especialmente para a temperatura de 32°C, dados parecidos com os de CITTI et alii (23), GARCIA (43) e WULF & SANDINE (114).

Os resultados da atividade proteolítica das linhagens de *S. diacetylactis* confirmam as afirmações de CASTBERG & MORRIS (18) de que, entre os mesófilos, esses organismos são os que apresentam atividade proteolítica mais similar a dos lactobacilos.

Entre os lactobacilos, repetiram-se os dados encontrados por Rapp (Apud 18) de que os lactobacilos termófilos apresentam maior atividade proteolítica que os lactobacilos mesófilos, e isto porque as linhagens de *L. lactis* tiveram resultados bem superiores às de *L. casei*, de modo especial, na temperatura de 42°C, que é a faixa ótima de temperatura para os *L. lactis*.

Os dados das atividades proteolíticas das linhagens de *L. lactis*, de uma forma geral, concordam com alguns já descritos pela literatura para organismos do grupo *L. lactis-bulgaricus* (8,102,103), sendo, inclusive superiores aos obtidos por CARINI et alii (17) para bactérias lácticas termófilas.

#### Potencialidade de utilização como fermento láctico

Como a maior utilização das bactérias lácticas está concentrada na área industrial, especialmente na indústria de produtos fermentados, objetivou-se caracterizar a potencialidade de

integrantes da microflora isolada serem empregados, como fermentos lácticos. Assim, com base nas afirmações de SELLARS & BABEL (99), de que a capacidade desses organismos em gerarem ácido láctico deve ser o primeiro passo num processo de caracterização e seleção de bactérias lácticas, nas de STAHOUDERS (108) que considera importante também o conhecimento de outras propriedades como proteólise, lipólise, etc, e nas de GARCIA (43) que indica a realização de provas organolépticas da coalhada produzida pelas culturas, selecionaram-se quatro culturas mesófilas de *S. lactis* (n<sup>o</sup>s 13,54,121 e 282) e uma termófila de *L. lactis* (n<sup>o</sup> 149) para serem submetidas a provas visando a caracterizar a curva de acidificação e a resistência ao cloreto de sódio, exemplificando aquelas com melhores resultados na prova organoléptica.

A produção de ácido láctico observada durante o desenvolvimento das culturas selecionadas é apresentada através das curvas de acidificação na figura 3. Verifica-se que as culturas mesófilas mostraram curvas com características parecidas. Esse fato indica que os microrganismos possuem comportamento acidificante semelhante. No entanto, pequenas variações na fase logarítmica de produção de ácido entre as culturas pode ser notado, como por exemplo entre as culturas de n<sup>o</sup> 13 e 54.. Porém, de uma forma geral, o comportamento acidificante das culturas testadas foi em muito semelhante àquele obtido por BEAUQUESNE & CANTÉRI (7) com fermentos lácticos industriais, e por GARCIA (43) com isolados lácticos destinados à fabricação de queijos nacionais. Também pode ser observado que os níveis de acidificação obtidos até o início da fase estacionária de produção de ácido láctico variaram entre 74°D e 92°D. KOSIKOWSKI (67) e REBELLO (90) preconizam uma acidificação para fermentos mesófilos industriais da ordem de 70°D e 80°D (0,70 a 0,80% de ácido láctico). Isto indica que as culturas

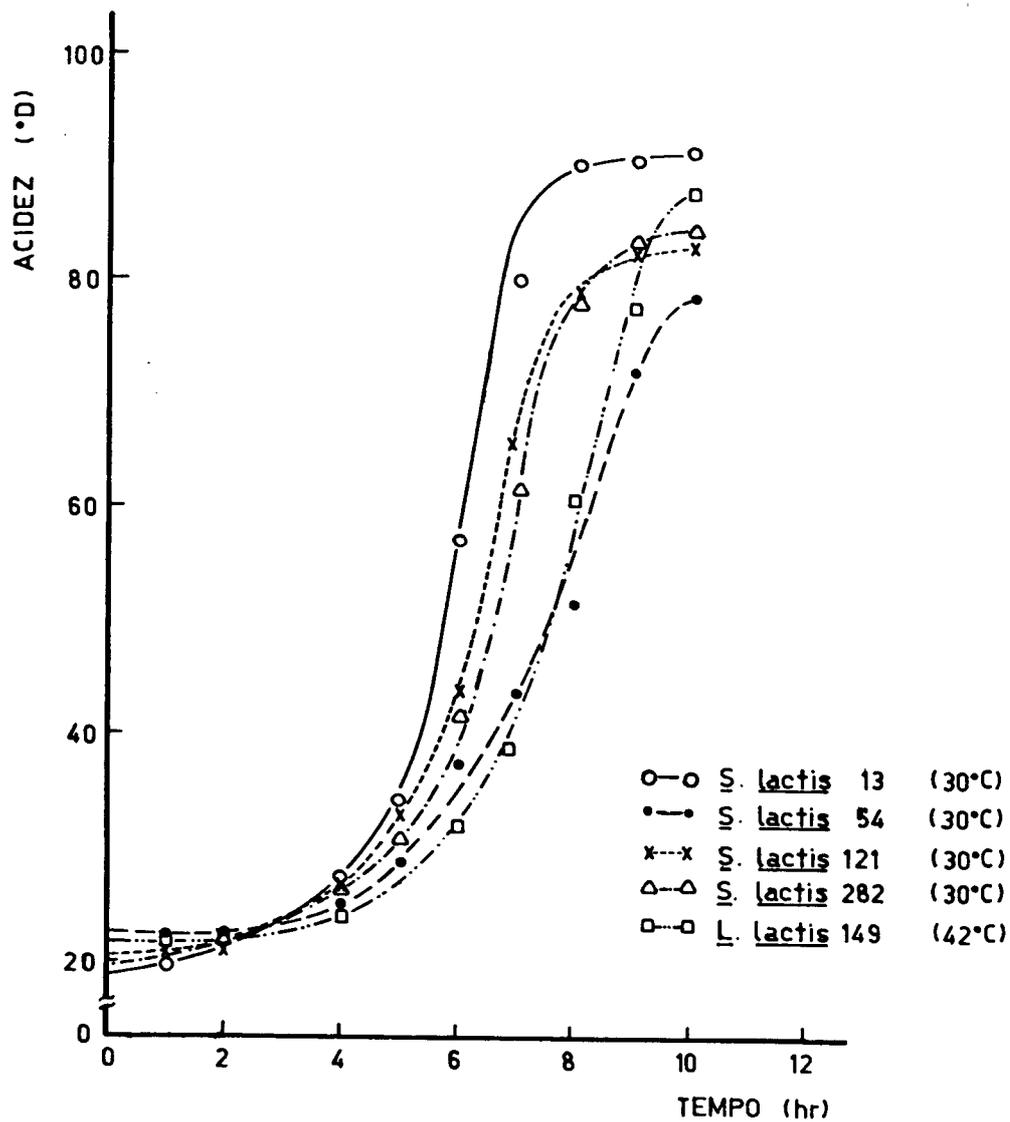


FIGURA 3. Curvas de acidificação de algumas culturas com potencialidade de uso como fermento láctico, 2% de inóculo.

testadas, por apresentarem uma acidificação mais alta que aqueles níveis preconizados, poderiam ser empregadas em proporções inferiores àquelas comumente utilizadas na indústria queijeira nacional (1,0%), o que levaria a uma economia para a indústria.

A curva de acidificação apresentada pela cultura de *L. lactis* n° 149, no curso do seu desenvolvimento, também encontra semelhança com as da literatura, especialmente as de BEAUQUESNE & CANTÉRI (7). Seu nível de acidificação também corresponde aos indicados por KOSIKOWSKI (67) para fermentos empregados na indústria de queijos de massa cozida, que é da ordem de 90° e 120°D.

No Quadro 14 são expressos os resultados dos ensaios da ação do cloreto de sódio, a níveis industriais, sobre as 5 culturas de bactérias lácticas selecionadas. Através dos dados apresentados nesse quadro, percebe-se que praticamente não houve inibição da atividade acidificante dos isolados, por parte do NaCl, tanto com 5 quanto 24 horas de incubação, em nenhum dos níveis testados.

A tendência dos estreptococos, especialmente *S. lactis*, em se mostrarem resistentes ao cloreto de sódio, também foi observado por RASIC (88) e GARCIA (43), que obtiveram resultados semelhantes aos do Quadro 14.

O comportamento da linhagem 149 de *Lactobacillus lactis*, frente ao cloreto de sódio, possibilita observar que os dados para esse organismo estão bem de acordo com aqueles de RASIC (88), de que algumas linhagens de lactobacilos apresentam resistência ao cloreto de sódio semelhante àquela mostrada por *S. lactis*.

QUADRO 14. Efeito de diferentes concentrações de cloreto de sódio sobre a atividade acidificante de bactérias lácticas.

CULTURA	Incubação (hs)	% NaCl									
		0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5				
		pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D	pH	°D
<i>S. lactis</i> 13	0	6,20	20,0	6,20	20,0	6,20	19,0	6,15	20,0	6,20	22,0
	5	5,95	26,0	5,95	28,0	6,0	28,0	6,0	26,0	6,05	26,5
	24	4,20	87,5	4,20	86,0	4,25	86,0	4,25	86,0	4,25	85,0
<i>S. lactis</i> 54	0	6,2	21	6,2	21	6,2	21	6,2	21	6,2	21
	5	6,0	24,0	6,0	24,0	5,9	24,5	5,9	24,5	6,0	24,0
	24	4,40	75	4,40	75	4,5	74,5	4,5	74,5	4,5	74,5
<i>S. lactis</i> 121	0	6,20	20,0	6,20	20,0	6,20	20,0	6,20	20,0	6,20	20,0
	5	5,90	25,5	5,90	25,5	5,95	25,5	5,95	25,0	6,0	25,0
	24	4,30	83	4,30	83	4,30	83	4,35	82	4,35	82
<i>S. lactis</i> 282	0	6,4	18,0	6,40	18,0	6,40	18	6,40	18,0	6,40	18,0
	5	6,0	24,0	6,0	24,0	6,05	24,0	6,05	23,5	6,05	23,5
	24	4,2	85,0	4,2	85,0	4,15	85,0	4,2	85	4,25	83,0
<i>L. lactis</i> 149	0	6,2	21,0	6,2	21,0	6,25	21,0	6,2	21,0	6,2	21,0
	5	5,6	40,0	5,6	40,5	5,6	40,5	5,6	40,5	5,6	40,0
	24	3,9	97,0	3,9	97,0	3,95	95,5	3,95	95,5	4,0	95,0

## CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- 1 - O leite cru, que serviu de amostra neste trabalho, mostrou elevadas contagens microbianas, as quais foram semelhantes às já descritas na literatura. Das amostras de leite tipo B, 40% estiveram fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, para o recebimento de leite cru.
- 2 - O ágar APT-S, desenvolvido neste trabalho através da modificação do meio APT pela adição de 0,1% de sorbato de potássio, 0,5% de ágar e abaixamento do pH para 6,0, apresentou bom comportamento para contagem e isolamento de bactérias lácticas, possibilitando sua utilização como meio seletivo para o grupo láctico.
- 3 - Dentre as culturas isoladas, 79,20% corresponderam a linhagens de *Streptococcus lactis*, 6,55% a *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*, 6,55% a *Streptococcus cremoris*, 4,40% a *Lactobacillus casei*, 2,20% a *Lactobacillus lactis* e 1,10% a *Leuconostoc cremoris*. Das espécies identificadas, *Streptococcus lactis* ocorreu em todas as amostras, enquanto que as demais tiveram índices de ocorrência inferiores a 15%.
- 4 - Além do fato de algumas culturas apresentarem atividade acidificante bem superior ao normal para microrganismos lácticos mesófilos, várias delas mostraram capacidade de se desenvolver normalmente nas temperaturas de 21°, 32° e 42°C.

5 - As culturas lácticas isoladas através da metodologia utilizada apresentaram características satisfatórias como fermento láctico para uso industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L.A.F. & J.S. OLIVEIRA. 1983. O emprego dos sorbatos em alimentos. Higiene Alimentar, 2:174-179.
2. AMER, M.A. & A.M. LAMMERDING. 1983. Health maintenance benefits of cultured dairy products. Cult. Dairy Prod. J., 18: 6-14.
3. AUCLAIR, J. & J.P. ACCOLAS. 1983. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industries. Antonie Van Leeuwenhoek, 49:313-326.
4. AYEBO, A.D. & K.M. SHAHANI. 1980. Role of cultured dairy products in the diet. Cult. Dairy Prod. J., 15:21-29.
5. BARROS, V.R.M.; J.C. PANETTA; E.M.C. PERCES. 1984. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo, Brasil. Higiene Alimentar, 3:199-207.
6. BELL, T.A.; J.L. ETCHELLS; A.F. BORG. 1959. Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts and filamentous fungi. J. Bacteriol., 77:573-580.
7. BEAUQUESNE, D. & G.A. CANTÉRI. 1982. Étude de l'activité protéolytique des souches et mélanges de souches des bactéries lactiques fournies à l'industrie laitière. Rev. Laitière Franc., 407:19-23.

8. BOTTAZZI, V.. 1962. Proteolytic activity of some strains of thermophilic lactobacilli. In. XVI Int. Dairy Congr., Kobenhavn. Section IV:I. 522-526.
9. BOTTAZZI, V.. 1979. Microbiologia dei fermenti lattici. Futurgraf, Reggio Emilia, 324p.
10. BOTTAZZI, V.; P.G. SARRA; M. VESCOVO; C. BERSANI, 1978. Caratteristiche dei bacilli lattici presenti nelle colture naturali in siero. 4<sup>a</sup> Parte: Saggi per la caratterizzazione delle colture. Sci. Tec. Lattiero-Casearia, 29:367-381.
11. BOYD, J.M. & H.L.A. TARR. 1955. Inhibition of mold and yeast development in food products. Food Technol., 9:411-412.
12. BOYKAND, S.L.; K.A.ACOOT; T.P. LABUZA. 1976. *Staphylococcus aureus* challenge study in an intermediate moisture food. J. Food Sci., 41:918-921.
13. BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 1255 de 25/06/1962.
14. BRIGGS, M.. 1953. The classification of lactobacilli by means of physiological tests. J. Gen. Microbiol., 9:234-248.
15. BRUCK, T.D.. 1974. Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 852p.

16. BUCHANAN, R.E. & N.E. GIBBONS. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> ed. Willians and Willians Company, Baltimore, 1268p.
17. CARINI, S.; R. LODI; A. VEZZONI. 1974. I batteri lattici ed il loro potere riducente, acidificante e caseinolitico. Il Latte, 2:969-973.
18. CASTBERG, H.B. & H.A. MORRIS. 1976. Degradation milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese making. A review. Milchwissenschaft, 31:85-90.
19. CHAMBA, J.F.; G. BONNAZ; P. BOURG. 1981. Comparisons de diverses méthodes de dénombrement de la flore acidifiante du lait cru. Le Lait, 61:555-567.
20. CHAZAUD, M.T.. 1977. Problèmes posés par les milieux sélectifs por streptocoques lactiques. Stabilité des levains industrielles. Rev. Lait. Franc., 358:605-607.
21. CHO, D.H.. 1970. The Lactic acid bacteria in connection with the fermentation vegetables. Korean J. Food Sci. Technol., 2:3-13.
22. CITTI, J.E.; W.E. SANDINE; P.R. ELLIKER. 1963. Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. J. Dairy Sci., 46:337.

23. CITTI, J.E.; W.E. SANDINE; P.R. ELLIKER. 1965. Comparison of slow and fast acid-producing *Streptococcus lactis*. J. Dairy Sci., 48:14-18
24. COGAN, T.M.. 1980. Les levains lactiques mésophiles. Une revue. Le Lait, 60:397-425.
25. COLLINS, E.B.. 1962. Cultures identity and selection. In: Symposium on lactic starter cultures. J. Dairy Sci., 45:799-804.
26. COLLINS, E.B.. 1977. Influence of medium and temperature on ends products and growth. In: Symposium: Pratical importance of the lactic streptococci. J. Dairy Sci., 60:799-804.
27. COSTA, L.C.G.; E.P. CARVALHO; A.S. CARVALHO. 1984. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio da ordenha manual e mecânica, na fonte de produção. Rev. I.L.C.T., 39(235):3-6.
28. COVARRUBIAS, M.P. & J. HAVERBECK. 1978. Variações na qualidade do leite cru. Fase estábulo-indústria. Rev. I.L.C.T., 33(195):3-12.
29. COX, W.A.. 1977. Characteristics and use of starter cultures in manufacture of hard pressed cheese. J.Soc. Dairy Technol., 30:5-15.

30. DALY, C.. 1983. The use of mesophilic cultures in the dairy industry. Antonie van Leeuwenhoek, 49:297-312.
31. DAVIDSON, C.M. & F. CRONIN. 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. Appl. Microbiol., 26:439-440.
32. DAVIES, F.L. & M.J. GASSON. 1981. Reviews of the progress of dairy science: Genetics of lactic acid bacteria. J. Dairy Res., 48:363-376.
33. DEAK, T.. 1973. Nutrient medium suitable for counting and isolation of lactic acid bacteria. Konzerv-es Paprikaipar, 5:167-170. Apud. Food Sci. Technol. Abst., 6(12):14(1974).
34. DE MAN, J.C.; M. ROGOSA; M.E. SHARPE. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23:130-135.
35. DEMETER, K.J.. 1969. Lactobacteriologia. Editorial Acribia, Zaragoza, 331p.
36. EKLUND, T.. 1980. Inhibition of growth and up take process in bacteria by some chemical foods preservatives. J. Appl. Microbiol., 48:423-432.
37. ELLIKER, P.R.; A.W.ANDERSON; G. HANESSON. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy Sci., 39:1611-1612.

38. EMARD, L.O. & R.H. VAUGHN. 1952. Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and Clostridia. J. Bacteriol., 63:487-494.
39. EVANS, J.B. & C.F. NIVEN Jr. 1951. Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. J. Bacteriol., 62:599-603.
40. FOSTER, E.M.. 1962. Culture preservation. In: Symposium on lactic starter cultures. J. Dairy Sci., 45:1290-1294.
41. FOSTER, E.M.; F.E. NELSON; M.L. SPECK; R.N. DOETSCH; J.C. OLSON. 1957. Dairy Microbiology. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 492p.
42. GAHLOT, D.P.; R.N. PAL; C.M. KAPOOR. 1976. Distribution of different physiological groups of micro-organisms in market-milk and laboratory pasteurized milk. Ind. J. Dairy Sci., 29:229-231.
43. GARCIA, S.. 1984. Isolamento e seleção de culturas lácticas para a fabricação de queijos. Campinas. 89p. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP.
44. GAVA, A.J.. 1984. Emprego de conservadores em alimentos. Bol. S.B.C.T.A., 18:183-194.
45. GERALDINI, A.M.; I. DELLAZARI; M.F.F. LEITAO; C.M.M. OLIVEIRA; M.N. UBOLI EIROA. 1979. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. I. Avaliação de meios sólidos para contagens de culturas puras. Bol. I.T.A.L., 16:53-64.

46. GOLDONI, J.S.; I.A. BONASSI; U.A. LIMA; A.R. GIL. 1977. Microbiologia do leite. 1. Flora microbiana do leite pasteurizado consumido em Botucatu, S.P.. Ind. Alim., 2(10):31-35.
47. GOODING, C.M.; D. MELNICK; R.L. LAWRENCE; F. LUCKMANN. 1955. Sorbic acid as a fungidstatic agent for foods. IX. Physico-chemical consideration in using sorbic acid to protect foods. Food. Res., 20:693-648.
48. GORDON, J.F. & N. SHAPTON. 1977. Characteristic and use of starters for the manufacture of yogurth, cottage cheese, cultured buttermilk and other fermented products. J. Soc. Dairy Technol. 30:15-22.
49. HANSEN, P.A.. 1941. A study in cheese ripening. The influence of autolyzed cells of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* on the development of *Lactobacillus casei*. J. Dairy Sci., 24:969.
50. HARRIGAN, W.F. & M.E. McCANCE. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London. 452p.
51. HEAP, J.A. & R.C. LAWRENCE. 1981. Recent modifications to the New Zealand activity test for cheddar cheese starters. N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 16:91-94.
52. HILL, D.A. & H.D. THORNTON. 1981. Lactobacilli in Edmonton dairy products. Can. J. Microbiol., 4:215-220.

53. HOTCHENER, B.J.; A.F. EGAN; P.J. ROGERS. 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol., 52:31-37.
54. HUGGINS, A. R.. 1984. Progress in dairy starter culture technology. Food Technol., 39(6):41-50.
55. HUGGINS, A.R. & W.E. SANDINE. 1984. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. J. Dairy Sci., 67:1674-1679
56. HUHN, S.; J.R. HAJDEWURCEL; J.M. MORAES; O.L. VARGAS. 1980. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. Rev. I.L.C.T., 35(209):3-8.
57. HUHTANEN, C.N. & J. FEINBERG. 1980. Sorbic acid inhibition of *Clostridium botulinum* in nitrite-free poultry frankfurtes. J. Food Sci., 43:1782-1785.
58. HULL, M. E.. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci., 30:881-884.
59. INGRAM, M. 1975. The lactic acid bacteria - A broad view. In: CARR, J.G.; C.V. CUTTING; G.C. WHITTING (Ed.). Lactic acid bacteria in beverages and food. Academic Press, London, New York and San Francisco, p. 1-13.

60. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1980. Microbial Ecology of foods. vol I & II. Academic Press, New York, London and San Francisco. 997 p.
61. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 1983. Factors affecting the results of an activity test of mesophilic cheese starters. Bulletin, n° 129:5-8.
62. JAY, J.M.. 1978. Modern Food Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. D. Van Nostrand Company, New York, Cincinnati, Toronto, London and Melbourne. 479p.
63. JENSEN, B.G. & J.E. EDMONSON. 1959. The characterization of some lactobacilli found in milk. J. Dairy Sci., 40:180-186.
64. KAMBAR, C.S.; G.W. REINBOLD; R.V. HUSSONG. 1952. A plating method for the isolation and enumeration of Propionibacteria. J. Dairy Sci., 35:915-919.
65. KARIM, G. & Gh. KACHANI. 1978. Flore bactérienne du lait cru de la région de Téhéran. Le Lait, 58:179-184.
66. KING, N.S. & J.A. KOBURGER. 1970. Characterization of some group N streptococci. J. Dairy Sci., 53:403-409.
67. KOSIKOWSKI, F. V.. 1978. Cheese and fermented milk products. 2<sup>nd</sup> ed., F.V. Kosikowski and associates, Brooktondale, 71lp.
68. LAW, B.A. & J. KOSTAD. 1983. Proteolysis systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49:225-245.

69. LAWRENCE, R. C.; H.A. HEAP; G. LIMSOWTIN; A.W. JARVIS. 1981. Cheddar cheese starters: current knowledge and practices of phages characteristic and strain selection. In: Symposium: Research and development trends in natural cheese manufacture and ripening. J. Dairy Sci., 61:1181-1191.
70. LAWRENCE, R.C.; T.D. THOMAS; B.E. THERZAGHI. 1976. Reviews of progress of dairy science: Cheese starters. J. Dairy Res., 43:141-193.
71. LIMSOWTIN, G.K.Y. & B.E. THERZAGHI. 1976. Agar medium for differentiation of "fast" and "slow" coagulating cells in lactic streptococcal cultures. N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 11:65-66.
72. LINCH, D. & N.N. POTTER. 1982. Effects of potassium sorbate on normal flora and on *Staphylococcus aureus* added to minced cod. J. Food Prot., 45:824-828.
73. MACHADO, E.S.V.. 1975. Flora dominante de leite cru e pasteurizado. Campinas, 39p.. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP.
74. MARTH, E.H. (Ed.). 1978. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington, D.C., 416p.
75. MAYEUX, J.V. & A.R. COLMER. 1961. Selective medium for Leuconostoc detection. J. Bacteriol., 81:1009-1011.

76. MAYEUX, J.V.; W.E. SANDINE; P. R. ELLIKER. 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. J. Dairy Sci., 45:655-656.
77. McDONOUGH, F.E.; R.E. HARGROVE; P. TITSLER. 1963. Selective plating medium for *Leuconostoc* in mixed lactic cultures. J. Dairy Sci., 46:386-390.
78. MCKAY, L.L.. 1983. Funtional properties of plasmids in lactic streptococci. Antonie van Leeuwnhoek, 49:259-274.
79. MUIR, D.D.; M.E. KELLY; J.D. PHILLIPS; G. WILSON. 1978. The quality of blended raw milk in creameries in south-west Scotland. J. Soc. Dairy Technol., 31:137-144.
80. OLIVEIRA, J.S.. 1976. Qualidade microbiológica do leite. Ind. Alim., 1:38-40.
81. OLIVEIRA, J.S. & S.F. BORGES. 1984. Qualidade do leite pasteurizado. Rev. I.L.C.T., 39(235):29-33.
82. ORDONEZ, J. A.. 1979. Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol., 46:351.
83. OTTOGALLI, G.. 1981. Microbiologia lattiero-casearia. C.L.E. S.A.V., Milano, 126p.
84. OTTOGALLI, G. & A. GALLI. 1978. Metodi per la conta, l'isolamento e l'identificazione della specie *Streptococcus ther-*

*mophilus* nei prodotti lattiero-caseari. Ann. Microbiol.,  
28:91-109.

85. OTTOGALLI, G.; A. GALLI; F. DELLAGIO. 1979. Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and other streptococci. J. Dairy Res., 46:127-131.
86. PARK, H.S. & E.M. MARTH. 1972. Inactivation of *Salmonella typhimurium* by sorbic acid. J. Milk Food Technol., 35: 532-539.
87. PRATA, L.F.. 1984. Aplicação do método de contagem microscópica no controle microbiológico do leite cru. Campinas, 85p. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP.
88. RASIĆ, J.. 1962. A study of the resistance of lactic acid bacteria to sodium chloride. In: XVI International Dairy Congress, Kobenhanm. Section IV; 2:881-887
89. RASIĆ, J. & J.A. KURMANN. 1978. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, 466p.
90. REBELO, A.G.. 1983. Queijo. Coleção Agros nº 15. Livraria Francisco Franco Ltda., Lisboa, 224p.
91. REDDY, M.S.; E.R. VEDAMUTHU; C.J. WASHAM; G.W. REINBOLD. 1969. Agar medium for differential enumeration of lactic streptococci. Appl. Microbiol., 24:947-952.

92. REDDY, M.S.; E.R. VEDAMUTHU; C.J. WASHAN; G.W. REINBOLD. 1969. Differential agar medium for separacting *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Appl. Microbiol., 18: 755-759.
93. RICHARDSON, G.H.. 1984. Proteinase negative cultures for cheese making. Cult. Dairy Prod. J., 19:6-9.
94. RICHARDSON, G.H.; C.A. ERNSTROM; J.M.; C.DALY. 1983. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. J. Dairy Sci., 66:2278-2286.
95. ROBACH, M.C.. 1978. Effect of potassium sorbate on the growth of *Pseudomonas fluorescenc*. J. Food Sci., 43:1886-1887.
96. ROGOSA, M.; J.A. MITCHELL; R.F. WISEMAN. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. J. Bacteriol., 62:132-133.
97. ROSS, G.D.. 1980. Observations on the effect of inoculum, pH on the growth and acid production of lactic streptococci in milk. Austr. J. Dairy Technol., 35:147-149.
98. SANDINE, W.E.; P.C. RADICH; P.R. ELLIKER. 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. J. Milk Food Technol., 35:176-185.
99. SELLARS, R.L. & F.J. BABEL. 1970. Cultures for manufacture of dairy products. CHR. Hansen's Laboratory, Milwaukee, 63p.

100. SHARPE, M.E.. 1979. Lactic acid bacteria in the dairy industry. J. Soc. Dairy Technol., 32:9-17
101. SHELAIH, M.S.; A.Y.E. GAMAY; S.L. WRIGHT; G.H. RICHARDSON. 1983. Temperature sensitive of proteinase negative variants of lactic streptococci. J. Dairy Sci., 66:2287-2289.
102. SINGH, J. & Y. KAUL. 1982. Activity of yogurth starter in different types of milk. Milchwissenschaft, 37:731-732.
103. SINGH, J. & D.K. SHARMA; 1982. Yoghurt starters in skin milk. 1. Acid and flavour production and proteolytic activity by yoghurt starters. Cult. Dairy Prod. J., 17:22-25.
104. SOFOS, J.N.; F.F. BUSTA; C.E. ALLEN. 1979. Sodium nitrite and sorbic acid effects on *Clostridium botulinum* spore germination and total microbial in chicken frankfurtes emulsion during temperature abuse. Appl. Env. Microbiol., 37:1103-1109.
105. SPECK, M.L.. 1962. Starter culture growth and action in milk. In: Symposium on lactic starter cultures. J. Dairy Sci., 45:1281-1283.
106. SPECK, M.L. (Ed.). 1976. Compendium methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C., 702p.
107. SPECK, M.L. & R.S. KATZ. 1980. ACDPI status paper-nutritive and health values of cultured dairy foods. Cult. Dairy Prod. J., 15:10-12.

108. STADHOUDERS, J.. 1974. Dairy starter cultures. Milchwissenschaft, 29:329-337.
109. STAMER, J.R.. 1979. The lactic acid bacteria: Microbes of Diversity. Food Technol., 33:60-65.
110. STANIER, R.Y.; E.A. ADELBERG; J.L. YNGRAHAN. 1976. General Microbiology. 4<sup>th</sup> ed., Prentice Hall, Englewood Cluffs, 871p.
111. TAMIME, A.Y.. 1981. Microbiology of starter culture. In: ROBINSON, R.K.. Dairy Microbiology, vol 2. Applied Science Publishers, London and New York, p.113-156.
112. TERZAGHI, B.E. & W.E. SANDINE. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol., 29:807-813.
113. VILLAFANE, H.H.M.. 1975. Aplicação de um método rápido para contagem de microrganismos psicrotróficos em leite. Campinas, 48p. Tese (Mestrado), Fac. Eng. Alim. Agric., UNICAMP.
114. WULF, J.J. & W.E. SANDINE. 1983. Isolation and characterization of fast acid-production antibiotic-resistant mutants of lactic streptococci. J. Dairy Sci., 66:1835-1842.
115. YORK II, G.K. & H. VAUGHN. 1955. Resistance of *Clostridium parabotulinum* to sorbic acid. Food Res., 29:60-65.

A P E N D I C E

QUADRO 15. Resultados das contagens microbianas total, de coliformes, de estreptococos fecais, em ágar APT e ágar APT-S, das amostras de leite cru, expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL).

Amostra	Contagens			
	Contagem total	Coliformes	Estreptococos Fecais	APT APT-S
	LEITE TIPO B			
1	4,41.10 <sup>5</sup>	1,22.10 <sup>3</sup>	< 10	1,19.10 <sup>6</sup> 7,15.10 <sup>4</sup>
2	1,86.10 <sup>7</sup>	3,30.10 <sup>4</sup>	10	2,90.10 <sup>7</sup> 1,20.10 <sup>4</sup>
3	7,00.10 <sup>7</sup>	1,07.10 <sup>5</sup>	4,36.10 <sup>4</sup>	4,75.10 <sup>5</sup> 9,25.10 <sup>4</sup>
4	1,50.10 <sup>6</sup>	1,10.10 <sup>4</sup>	< 10	1,25.10 <sup>6</sup> 2,90.10 <sup>5</sup>
5	5,00.10 <sup>4</sup>	1,20.10 <sup>2</sup>	< 10	3,01.10 <sup>4</sup> 1,00.10 <sup>4</sup>
6	2,23.10 <sup>6</sup>	6,40.10 <sup>4</sup>	4,75.10 <sup>5</sup>	1,72.10 <sup>6</sup> 2,50.10 <sup>4</sup>
7	1,85.10 <sup>6</sup>	7,00.10 <sup>3</sup>	6,70.10 <sup>3</sup>	5,50.10 <sup>4</sup> 4,05.10 <sup>5</sup>
8	3,84.10 <sup>6</sup>	1,65.10 <sup>5</sup>	5,00.10 <sup>2</sup>	2,22.10 <sup>6</sup> 4,00.10 <sup>5</sup>
9	1,61.10 <sup>6</sup>	1,50.10 <sup>3</sup>	5,00.10 <sup>2</sup>	2,18.10 <sup>6</sup> 2,00.10 <sup>3</sup>
10	3,90.10 <sup>5</sup>	1,00.10 <sup>3</sup>	5,50.10 <sup>2</sup>	3,90.10 <sup>5</sup> 4,50.10 <sup>4</sup>
11	5,00.10 <sup>3</sup>	5,00.10 <sup>2</sup>	6,20.10 <sup>4</sup>	2,10.10 <sup>6</sup> 4,00.10 <sup>2</sup>
12	2,48.10 <sup>5</sup>	5,00.10 <sup>4</sup>	1,05.10 <sup>3</sup>	1,38.10 <sup>5</sup> 1,50.10 <sup>5</sup>
13	1,77.10 <sup>6</sup>	4,45.10 <sup>4</sup>	6,30.10 <sup>4</sup>	3,50.10 <sup>6</sup> 6,72.10 <sup>4</sup>
14	4,00.10 <sup>4</sup>	3,50.10 <sup>2</sup>	< 10	1,52.10 <sup>4</sup> 1,81.10 <sup>3</sup>
15	6,55.10 <sup>6</sup>	1,32.10 <sup>4</sup>	5,50.10 <sup>2</sup>	1,52.10 <sup>6</sup> 8,72.10 <sup>4</sup>
16	2,86.10 <sup>6</sup>	2,50.10 <sup>3</sup>	2,50.10 <sup>2</sup>	5,19.10 <sup>5</sup> 2,00.10 <sup>4</sup>
17	5,76.10 <sup>5</sup>	2,34.10 <sup>3</sup>	1,16.10 <sup>2</sup>	7,42.10 <sup>4</sup> 6,90.10 <sup>4</sup>
18	6,84.10 <sup>6</sup>	3,50.10 <sup>4</sup>	< 10	1,92.10 <sup>4</sup> 2,51.10 <sup>4</sup>
19	4,63.10 <sup>4</sup>	2,80.10 <sup>2</sup>	< 10	2,82.10 <sup>2</sup> 2,89.10 <sup>2</sup>
20	6,41.10 <sup>5</sup>	1,05.10 <sup>3</sup>	< 10	5,50.10 <sup>3</sup> 5,92.10 <sup>3</sup>
Média	6,03.10 <sup>6</sup>	2,70.10 <sup>4</sup>	3,27.10 <sup>4</sup>	2,22.10 <sup>6</sup> 8,90.10 <sup>4</sup>

Continuação quadro 15

Amostra	Contagens			Estreptococos		APT	APT-S
	Contagem total	Coliformes	Fecais				
				LEITE TIPO ESPECIAL			
1	2,05.10 <sup>5</sup>	1,50.10 <sup>3</sup>	9,85.10 <sup>2</sup>		2,25.10 <sup>5</sup>	6,65.10 <sup>2</sup>	
2	1,80.10 <sup>7</sup>	1,85.10 <sup>4</sup>	3,40.10 <sup>3</sup>		1,33.10 <sup>7</sup>	8,40.10 <sup>2</sup>	
3	3,95.10 <sup>5</sup>	3,50.10 <sup>2</sup>	4,65.10 <sup>2</sup>		3,50.10 <sup>3</sup>	2,66.10 <sup>3</sup>	
4	5,42.10 <sup>6</sup>	3,00.10 <sup>4</sup>	3,15.10 <sup>3</sup>		5,55.10 <sup>8</sup>	2,50.10 <sup>4</sup>	
5	4,73.10 <sup>7</sup>	4,60.10 <sup>6</sup>	< 1		8,10.10 <sup>7</sup>	6,80.10 <sup>6</sup>	
6	1,00.10 <sup>5</sup>	4,82.10 <sup>2</sup>	< 1		6,58.10 <sup>3</sup>	3,95.10 <sup>4</sup>	
7	6,20.10 <sup>7</sup>	3,35.10 <sup>7</sup>	3,10.10 <sup>4</sup>		5,24.10 <sup>7</sup>	5,08.10 <sup>6</sup>	
8	2,02.10 <sup>6</sup>	1,56.10 <sup>4</sup>	8,90.10 <sup>4</sup>		1,35.10 <sup>5</sup>	3,60.10 <sup>5</sup>	
9	2,00.10 <sup>6</sup>	1,50.10 <sup>3</sup>	1,45.10 <sup>3</sup>		5,00.10 <sup>3</sup>	4,50.10 <sup>4</sup>	
10	6,85.10 <sup>7</sup>	1,01.10 <sup>5</sup>	8,45.10 <sup>2</sup>		5,79.10 <sup>6</sup>	3,15.10 <sup>4</sup>	
11	1,10.10 <sup>6</sup>	1,50.10 <sup>3</sup>	1,25.10 <sup>2</sup>		7,40.10 <sup>5</sup>	3,08.10 <sup>3</sup>	
12	1,95.10 <sup>6</sup>	1,00.10 <sup>2</sup>	8,00.10 <sup>3</sup>		1,00.10 <sup>5</sup>	6,10.10 <sup>5</sup>	
13	4,20.10 <sup>5</sup>	7,40.10 <sup>3</sup>	2,24.10 <sup>4</sup>		4,20.10 <sup>5</sup>	2,85.10 <sup>4</sup>	
14	1,54.10 <sup>6</sup>	1,30.10 <sup>4</sup>	4,50.10 <sup>4</sup>		1,11.10 <sup>6</sup>	2,20.10 <sup>6</sup>	
15	1,50.10 <sup>4</sup>	5,00.10 <sup>2</sup>	5,50.10 <sup>1</sup>		5,00.10 <sup>2</sup>	4,31.10 <sup>3</sup>	
16	1,10.10 <sup>6</sup>	1,00.10 <sup>3</sup>	< 1		2,85.10 <sup>5</sup>	1,35.10 <sup>4</sup>	
17	2,31.10 <sup>6</sup>	1,30.10 <sup>4</sup>	1,44.10 <sup>5</sup>		1,87.10 <sup>6</sup>	1,45.10 <sup>4</sup>	
18	2,70.10 <sup>5</sup>	8,00.10 <sup>3</sup>	2,66.10 <sup>3</sup>		1,21.10 <sup>5</sup>	7,00.10 <sup>4</sup>	
19	2,80.10 <sup>5</sup>	1,25.10 <sup>4</sup>	3,45.10 <sup>4</sup>		2,15.10 <sup>5</sup>	8,00.10 <sup>5</sup>	
20	2,80.10 <sup>5</sup>	6,00.10 <sup>2</sup>	< 1		2,75.10 <sup>5</sup>	4,20.10 <sup>4</sup>	
21	1,70.10 <sup>5</sup>	4,50.10 <sup>2</sup>	< 1		9,00.10 <sup>5</sup>	6,00.10 <sup>4</sup>	
22	4,50.10 <sup>5</sup>	3,95.10 <sup>4</sup>	4,50.10 <sup>4</sup>		2,30.10 <sup>5</sup>	1,10.10 <sup>5</sup>	
23	5,84.10 <sup>7</sup>	6,08.10 <sup>4</sup>	2,36.10 <sup>3</sup>		7,50.10 <sup>5</sup>	6,08.10 <sup>4</sup>	

Continuação quadro 15

Amostra	Contagens			Estreptococos		APT	APT-S
	Contagem geral	Coliformes	Fecais				
24	1,18.10 <sup>7</sup>	1,50.10 <sup>3</sup>	5,32.10 <sup>2</sup>	LEITE TIPO ESPECIAL		1,46.10 <sup>5</sup>	2,04.10 <sup>3</sup>
25	8,60.10 <sup>7</sup>	4,32.10 <sup>4</sup>	1,28.10 <sup>2</sup>			3,54.10 <sup>4</sup>	2,10.10 <sup>4</sup>
26	9,75.10 <sup>7</sup>	5,80.10 <sup>4</sup>	2,00.10 <sup>2</sup>			2,30.10 <sup>4</sup>	2,92.10 <sup>4</sup>
27	6,48.10 <sup>6</sup>	2,52.10 <sup>3</sup>	1,20.10 <sup>1</sup>			4,10.10 <sup>3</sup>	3,98.10 <sup>3</sup>
28	3,75.10 <sup>7</sup>	1,02.10 <sup>5</sup>	1,00.10 <sup>2</sup>			5,35.10 <sup>3</sup>	1,18.10 <sup>4</sup>
29	2,62.10 <sup>5</sup>	3,20.10 <sup>2</sup>	< 1			1,50.10 <sup>3</sup>	2,00.10 <sup>3</sup>
30	4,40.10 <sup>6</sup>	4,22.10 <sup>4</sup>	2,38.10 <sup>2</sup>			6,00.10 <sup>4</sup>	4,98.10 <sup>4</sup>
Média	1,73.10 <sup>7</sup>	1,29.10 <sup>6</sup>	1,45.10 <sup>4</sup>			7,16.10 <sup>6</sup>	4,98.10 <sup>5</sup>

QUADRO 16. Resultados da atividade acidificante e tempo de geração das 182 culturas láticas isoladas.

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
01	<u>Streptococcus lactis</u>	6,00	17,0	4,95	61,5	3,77
02	<u>S.lactis</u>	5,95	18,0	4,95	62,0	7,53
05	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	68,0	3,01
06	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	62,0	5,02
07	<u>S.lactis</u>	5,90	18,0	4,95	70,0	3,77
08	<u>S.lactis</u>	6,00	19,0	4,85	61,5	3,77
09	<u>S.lactis</u>	5,90	21,0	4,80	61,0	3,01
10	<u>S.lactis</u>	5,90	19,5	4,60	78,0	1,67
11	<u>S.diacetylactis</u>	5,90	20,0	4,80	63,0	3,77
12	<u>S.diacetylactis</u>	5,85	17,0	4,70	51,5	7,53
13	<u>S.lactis</u>	5,70	22,0	4,35	87,0	1,50
15	<u>S.lactis</u>	5,85	18,5	4,95	66,0	3,01
16	<u>S.diacetylactis</u>	5,75	21,0	4,55	65,0	5,02
17	<u>S.lactis</u>	5,90	19,5	5,10	53,5	5,02
18	<u>S.lactis</u>	6,00	20,0	4,90	60,0	3,77
19	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,00	55,0	7,53
20	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	61,5	3,01
22	<u>S.lactis</u>	5,90	18,5	4,35	70,0	7,53
24	<u>S.lactis</u>	6,00	18,5	4,50	70,0	2,51
25	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,00	83,0	5,02
26	<u>S.lactis</u>	6,05	18,5	4,90	58,0	5,02
27	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	5,00	56,0	7,53
29	<u>S.diacetylactis</u>	5,90	19,0	4,10	82,5	3,01
32	<u>S.lactis</u>	6,00	21,0	3,90	95,0	1,25

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
33	<u>S.lactis</u>	6,05	20,0	5,00	58,0	7,53
52	<u>S.diacetylactis</u>	6,00	19,0	4,55	64,5	3,77
53	<u>S.lactis</u>	5,80	20,5	4,00	92,0	1,88
54	<u>S.lactis</u>	6,00	19,0	4,30	75,0	1,50
57	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,75	61,0	3,01
60	<u>S.lactis</u>	5,95	18,5	4,40	61,0	7,53
61	<u>S.diacetylactis</u>	6,00	18,0	4,60	59,5	5,02
63	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,60	59,0	15,06
64	<u>S.lactis</u>	6,20	17,0	5,00	48,0	7,53
79	<u>S.lactis</u>	5,90	19,5	4,60	71,5	3,77
81	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,25	49,0	5,02
85	<u>S.lactis</u>	6,20	17,0	5,95	52,0	4,30
86	<u>S.lactis</u>	6,30	17,0	5,30	52,0	7,53
87	<u>S.lactis</u>	6,05	17,0	4,70	60,5	3,01
88	<u>S.lactis</u>	6,30	17,0	6,20	48,0	15,06
90	<u>S.cremoris</u>	5,90	18,5	4,80	68,0	5,02
93	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,50	71,0	1,67
95	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,70	75,0	5,02
96	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,50	67,0	4,88
111	<u>Lactobacillus casei</u>	5,90	20,0	4,30	83,0	5,02
112	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,00	56,5	3,85
113	<u>S.lactis</u>	6,05	18,0	4,60	67,0	6,03
114	<u>S.lactis</u>	6,10	17,5	4,82	62,0	3,35
115	<u>S.lactis</u>	6,10	17,5	4,50	70,0	15,06

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	ºD	pH	ºD	
118	<u>L.lactis</u> *	5,20	34,0	3,60	101,0	5,02
119	<u>L.lactis</u> *	5,52	31,0	3,65	107,0	3,85
120	<u>S.lactis</u>	6,0	17,0	4,20	68,0	3,85
121	<u>S.lactis</u>	5,05	19,0	4,20	76,0	5,02
122	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,15	79,0	3,85
123	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	3,60	133,0	5,02
124	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,25	83,0	6,03
125	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,20	86,0	3,30
126	<u>S.lactis</u>	5,90	17,0	6,10	47,0	7,53
127	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,20	8,70	5,02
128	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,10	6,70	3,85
130	<u>S.lactis</u>	6,05	19,0	4,30	82,0	10,04
121	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,85	57,0	10,05
133	<u>S.lactis</u>	6,05	17,0	4,90	65,0	10,06
134	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,85	55,0	15,06
136	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,85	62,0	4,30
137	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,95	55,0	3,77
138	<u>S.lactis</u>	5,80	21,0	4,60	72,0	3,01
139	<u>S.cremoris</u>	6,15	17,5	5,00	60,0	7,03
140	<u>S.lactis</u>	6,10	19,5	5,15	51,0	4,35
142	<u>S.cremoris</u>	6,00	18,0	4,20	70,0	6,03
143	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,60	63,5	6,03
144	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,30	78,5	4,88
145	<u>S.cremoris</u>	5,95	19,0	4,55	65,0	10,04

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
146	<u>S.cremoris</u>	6,00	18,0	5,00	57,0	6,03
147	<u>L.casei</u>	6,20	17,0	4,20	80,0	3,20
148	<u>L.casei</u>	6,20	17,0	4,70	65,0	3,30
149	<u>L.lactis</u> *	5,20	21,0	3,70	75,0	1,04
150	<u>L.casei</u>	6,00	18,0	4,00	88,0	2,48
151	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,10	90,0	4,30
152	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,10	90,0	3,30
153	<u>L.lactis</u> *	4,95	39,0	3,00	103,0	3,85
154	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,60	70,0	4,30
155	<u>Leuconostoc cremoris</u>	5,90	19,0	5,80	20,0	30,15
156	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,95	61,5	3,77
157	<u>S.lactis</u>	5,95	18,0	4,95	62,0	7,53
158	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	68,0	3,01
160	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	62,0	5,02
161	<u>S.lactis</u>	5,90	18,0	4,95	70,0	3,77
163	<u>S.lactis</u>	6,00	19,0	4,85	61,5	3,77
164	<u>S.lactis</u>	5,90	21,0	4,80	61,0	3,01
167	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,60	78,0	1,67
168	<u>S.diacetylactis</u>	5,90	19,0	4,80	63,0	3,77
169	<u>S.lactis</u>	5,70	22,0	4,35	87,0	1,50
170	<u>S.lactis</u>	5,85	19,0	4,95	66,0	3,01
171	<u>S.cremoris</u>	6,00	18,0	4,8	60,0	7,24
172	<u>Leuconostoc cremoris</u>	6,10	17,0	5,80	20,0	28,39
173	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,70	75,0	5,02

continua

continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
174	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,50	67,0	4,88
175	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,00	56,0	3,85
176	<u>S.lactis</u>	6,05	18,0	4,60	67,0	6,03
177	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,85	62,0	3,35
178	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,50		15,06
179	<u>S.diacetylactis</u>	5,85	17,0	4,70	51,5	7,53
180	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,20	68,0	3,85
181	<u>S.lactis</u>	5,05	19,0	4,20	76,0	5,02
182	<u>S.cremoris</u>	5,90	18,0	4,80	68,0	5,02
183	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,15	79,0	3,85
184	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	3,60	131,0	5,02
185	<u>L.casei</u>	5,90	20,0	4,30	83,0	5,02
186	<u>S.lactis</u>	6,00	20,0	4,90	60,0	3,77
187	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,00	55,0	7,53
188	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	61,5	3,01
189	<u>S.lactis</u>	5,90	18,0	4,35	70,0	7,53
190	<u>S.lactis</u>	6,00	19,0	4,50	70,0	2,51
191	<u>S.diacetylactis</u>	5,75	21,0	4,55	65,0	5,02
192	<u>S.lactis</u>	6,05	19,0	4,90	58,0	5,02
193	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	5,00	56,0	7,53
194	<u>S.diacetylactis</u>	5,90	20,0	5,10	53,5	5,02
195	<u>S.lactis</u>	6,00	21,0	3,90	95,0	1,25
196	<u>S.lactis</u>	6,05	20,0	5,00	58,0	7,53
197	<u>S.lactis</u>	5,80	20,0	4,00	92,0	1,88

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
198	<u>S.lactis</u>	6,00	19,0	4,30	75,0	1,50
199	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,75	61,0	3,01
200	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,40	61,0	7,53
208	<u>S.cremoris</u>	6,20	17,0	5,70	35,0	10,04
209	<u>S.diacetylactis</u>	5,90	19,0	4,10	82,0	3,01
211	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,60	59,0	15,06
212	<u>S.lactis</u>	6,20	17,0	5,00	48,0	7,53
213	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,60	71,0	3,77
214	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,25	49,0	5,02
215	<u>S.lactis</u>	6,20	17,0	5,95	52,0	4,30
216	<u>S.lactis</u>	6,30	17,0	5,30	42,0	7,53
217	<u>S.lactis</u>	6,05	17,0	4,70	60,0	3,01
218	<u>S.lactis</u>	6,30	17,0	6,20	48,0	15,06
219	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,50	71,0	1,67
220	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,25	83,0	6,03
222	<u>S.cremoris</u>	6,00	18,0	5,00	57,0	6,03
223	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,20	86,0	3,30
224	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	6,10	47,0	7,52
226	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,20	87,0	5,02
228	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,10	67,0	3,85
229	<u>S.lactis</u>	6,05	19,0	4,30	82,0	2,77
230	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,85	57,0	10,04
231	<u>S.lactis</u>	6,05	17,0	4,90	65,0	8,02
233	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,85	55,0	15,06

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	ºD	pH	ºD	
234	<u>S.diacetylactis</u>	6,00	19,0	4,50	64,5	3,77
235	<u>S.cremoris</u>	6,00	18,0	4,20	70,0	6,03
236	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,85	62,0	3,30
237	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,95	55,0	10,04
238	<u>S.lactis</u>	5,80	21,0	4,60	72,0	3,01
239	<u>S.lactis</u>	6,10	20,0	5,15	51,0	3,35
240	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,60	63,0	6,03
241	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,30	79,0	4,88
242	<u>L.casei</u>	5,90	20,0	4,30	83,0	5,02
243	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,10	90,0	3,30
250	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,10	90,0	3,30
252	<u>S.diacetylactis</u>	6,00	18,0	4,60	59,0	5,02
253	<u>S.lactis</u>	5,90	20,0	4,60	70,0	3,30
254	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,80	60,0	3,77
255	<u>S.lactis</u>	5,80	20,5	4,00	92,0	1,86
256	<u>S.cremoris</u>	6,15	17,0	5,00	60,0	6,03
257	<u>S.lactis</u>	5,75	21,0	4,55	65,0	5,02
258	<u>S.lactis</u>	5,95	19,0	4,80	61,5	3,01
261	<u>S.lactis</u>	6,00	21,0	3,90	95,0	1,25
268	<u>L.casei</u>	6,20	17,0	4,70	65,0	3,30
269	<u>S.lactis</u>	6,00	18,0	4,60	59,5	5,02
270	<u>S.lactis</u>	6,05	20,0	4,20	87,0	5,02
271	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	5,10	67,0	10,05
273	<u>S.lactis</u>	6,05	19,0	4,30	82,0	3,84
276	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,85	57,0	10,04

continua

Continuação quadro 16

cultura nº	Identificação	Atividade				G(h)
		5hs		24hs		
		pH	°D	pH	°D	
279	<u>S.lactis</u>	5,90	17,0	4,90	65,0	3,30
282	<u>S.lactis</u>	5,90	19,0	4,00	83,0	5,02
283	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	5,00	56,5	3,85
284	<u>S.lactis</u>	6,05	18,0	4,60	67,0	6,03
285	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,80	62,0	4,02
286	<u>L.casei</u>	6,00	18,0	4,00	88,0	2,48
287	<u>S.lactis</u>	6,10	17,5	4,5	70,0	1,50
288	<u>S.lactis</u>	6,10	17,0	4,6	62,0	3,77
290	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,8	60,0	5,02
295	<u>S.lactis</u>	6,05	18,0	4,3	72,0	3,77
296	<u>S.lactis</u>	6,10	17,5	5,25	58,0	7,33
297	<u>S.lactis</u>	6,00	17,0	4,8	71,0	3,20
298	<u>S.cremoris</u>	5,95	19	4,55	65,0	10,04
300	<u>L.casei</u>	6,20	17	4,20	80,0	3,20

\* culturas incubadas a 42°C.