

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

MICROBIOLOGIA DO PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS
LÁCTICAS DO SUCO DE LARANJA

Josefina Faria Franca Siebel

Farmaceutica-Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Fumio Yokoya

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

UNICAMP
BIBLIOTECA

As palavras de um professor tem efeito maravilhoso sobre os alunos; estes acreditam nele quase tanto quanto em Deus.

A minha fê na justiça de Deus dissolve qualquer aparência na injustiça em minha vida.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece sinceramente ao Professor Doutor Fumio Yokoya pela orientação, apoio e compreensão durante o curso e desenvolvimento da presente tese.

Ao Professor Doutor Ihriel Schwartz Schneider, pela amizade, co laboração e sugestões no desenrolar da tese.

Ao Professor Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela colaboração financeira que possibilitou a realização da presente pesquisa.

A Marilena Uzelac, colega e amiga, pela ajuda e incentivo na realização da tese.

Ao pessoal administrativo e técnico da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, especialmente ao Departamento de Ciência da FEA.

À Direção e funcionários da Indústria Citral S/A pelas facilidades proporcionadas na realização do presente trabalho.

RESUMO

Um total de 1.155 amostras de suco cítrico foram coletadas em onze pontos diferentes da linha de produção de uma indústria de suco de laranja, tendo sido examinadas as condições higiênicas da fabricação através da contagem microbiana, fungos e leveduras nos seguintes pontos da linha de processamento: "finisher" (após o acabamento), centrífuga, seis estágios de evaporação (concentração), "flash cooler", tanque de mistura e trocador de calor.

As contagens obtidas situaram-se em torno de 5×10^5 germes por grama do produto para as bactérias lácticas e 25×10^4 para leveduras. Os ensaios realizados nos pontos antes e depois do pasteurizador mostraram que, apesar do tratamento térmico ter sido eficiente, ocorria recontaminação após a pasteurização.

Dentre as bactérias lácticas isoladas, houve predominância dos tipos heterofermentativos em forma de bastonetes. As bactérias encontradas e caracterizadas foram: Lactobacillus plan tarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum, Pediococcus acidilactici e Pediococcus halo philus. Não foram encontradas espécies do gênero Streptococcus.

SUMMARY

A total of 1,155 samples were collected at eleven different points of concentrate orange juice plant. The higienic condition was examined by counts of bacteria, molds and yeasts , from following points of the processing line: after the finisher, centrifuge, the six stages of evaporation, flash cooler, mixing tank and heat exchanger.

The counts of final product were approximately 5×10^5 lactic acid bacteria per gram and 25×10^4 yeasts. The assays carried out before and after the pasteurization showed that, although the thermal treatment had been efficient, recontamination - after pasteurization was observed at great extent.

Among the lactic acid bacteria isolated, there was a predominance of the heterofermentative types in the form of rods. The types found and characterized were: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum, Pediococcus acidilactici and Pediococcus halophilus. No species of the Streptococcus were found.

ÍNDICE

PÁGINA

AGRADECIMENTOS

RESUMO	1
SUMMARY	2
ÍNDICE DE TABELAS	7
ÍNDICE DAS FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Contaminação microbiana na indústria de citrus	12
2.2. Análises do suco de laranja visando o controle microbiano	19
2.3. Características das bactérias lácticas presen- tes no suco de laranja	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Material	29
3.1.1. Amostras de suco	29
3.1.2. Equipamentos especiais	30
3.1.3. Meios de cultura	32
3.1.4. Reagentes	33
3.2. Métodos	35

3.2.1. Determinação do pH e do grau Brix	35
3.2.2. Contagem de microrganismos	35
3.2.3. Pesquisa de leveduras	37
3.2.4. Características morfológicas das culturas	37
3.2.5. Reação de Gram	37
3.2.6. Comprovação da pureza das colônias ...	37
3.2.7. Reativação das culturas	38
3.2.8. Prova da catalase	39
3.2.9. Prova de benzidina ou de heme-proteína	39
3.2.10. Produção de CO ₂ a partir da glicose .	39
3.2.11. Medição das colônias e das células ..	40
3.2.12. Prova de vermelho de metila e Voges Proskauer	41
3.2.13. Testes de fermentação	41
3.2.14. Detecção de manitol a partir de frutose	42
3.2.15. Redução de nitratos a nitritos	42
3.2.16. Produção de amônia a partir de l-arginina	43
3.2.17. Tolerância a cloreto de sódio	43
3.2.18. Desdobramento da esculina	43
3.2.19. Testes de produção de dextrano	44
3.2.20. Metabolismo de ácidos orgânicos	44
3.2.21. Determinação do pH mínimo de crescimento das bactérias lácticas	44
3.2.22. Detecção de colônias hetero e homofex	

mentativas	45
3.2.23. Determinação de ácidos totais e voláteis	45
3.2.24. Determinação dos parâmetros de crescimento (k e μ)	46
3.2.25. Identificação das culturas	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Análise dos sucos	48
4.2. Características das leveduras do suco	57
4.3. Características das bactérias lácticas do suco	58
4.3.1. Distribuição dos grupos	58
4.3.2. Espécies caracterizadas	59
4.4. Testes bioquímicos	62
4.4.1. Prova de vermelho de metila	62
4.4.2. Voges Proskauer	63
4.4.3. Fermentação de carboidratos	63
4.4.4. Produção do manitol	63
4.4.5. Redução de nitratos a nitritos	64
4.4.6. Produção de amônia	64
4.4.7. Tolerância a cloreto de sódio	64
4.4.8. Desdobramento da esculina	65
4.4.9. Metabolismo dos ácidos orgânicos	65
4.5. Determinação do pH mínimo de crescimento das bactérias lácticas	65
4.6. Determinação dos ácidos totais e voláteis	67
4.7. Confirmação das características hetero e homo	

fermentativas	68
4.8. Crescimento em diferentes temperaturas	68
5. CONCLUSÕES	70
6. BIBLIOGRAFIA CITADA	71
7. APÊNDICES	
Apêndice 1 - Curvas de Arrhenius das 12 linhagens de bactérias lácticas (Figuras 5 a 16)	79
Apêndice 2 - Tabelas do pH de crescimento das bact <u>é</u> rias lácticas (Tabelas nºs 7 a 18)	91

ÍNDICE DE TABELAS

PÁGINA

TABELA 1 - Contagem de bactérias lácticas no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento (em meio OSA a 30°C - pH 5,6) ...	51
TABELA 2 - Contagem de leveduras e fungos no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento (em meio PDA a 30°C - pH 3,5) ...	52
TABELA 3 - Estudo morfológico das linhagens selecionadas em onze pontos de coleta	60
TABELA 4 - Reações bioquímicas das 30 linhagens de bactérias lácticas do suco de laranja	61
TABELA 5 - Características das 12 linhagens de bactérias lácticas quanto à temperatura de incubação	69
TABELA 6 - Valores de pH mínimo de crescimento das 30 linhagens de bactérias lácticas isoladas da linha de processamento do suco cítrico	66

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1 - Fluxograma do processamento do suco concentrado de laranja	31
FIGURA 2 - Curva da elevação dos sólidos do suco de laranja durante as etapas de concentração	49
FIGURA 3 - Contagem de bactérias lácticas no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento	53
FIGURA 4 - Contagem de leveduras e fungos no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento	54

1. INTRODUÇÃO

É consenso geral que os alimentos destinados ao consumo humano estão sujeitos a contaminações de várias ordens. Também os sucos de frutas não fogem a esta regra apresentando contaminação proveniente tanto da casca do fruto como do equipamento, do ambiente, das embalagens e dos próprios operadores.

A ocorrência desses contaminantes, mesmo em frutos íntegros, é considerada inevitável e sua minimização é de fundamental importância tecnológica e econômica.

A literatura menciona cifras bastante elevadas de microrganismos em casca de frutos cítricos, mesmo com aparência normal. Aparecem, portanto, cifras da ordem de 5×10^5 a 1×10^7 microrganismos por cm^2 sobre cascas de frutas, podendo os fungos chegarem a 6×10^5 ou mais.

Acresce também que, dentre esses contaminantes dos sucos cítricos, ocorrem espécies com ação prejudicial e que elaboram acetil-metil-carbinol, que, por sua vez, é convertido em diacetil responsável por modificações de sabor. Neste caso, podemos mencionar principalmente os gêneros Leuconostoc e Lactobacillus. Destes, as espécies de maior ocorrência são: Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides e Leuconostoc sp.

As leveduras também ocupam um papel de destaque como agentes de deterioração de vários produtos vegetais inclusive de sucos cítricos. Tem maior atuação os gêneros Saccharomyces cerevisiae, S. chevalieri e Zigosaccharomyces vini.

A importância do grupo de bactérias ácido-láticas ainda é maior se considerarmos que este, além de ocorrer em sucos de frutas, também tem sido constatado em cervejas, vinhos, tomates, emulsões de carne, pepinos fermentados, azeitonas, chucrute, ervilhas, pessegos enlatados e mesmo em refinarias de açúcar.

É necessário todavia destacar que as propriedades fermentativas de algumas espécies desses gêneros são aproveitadas na elaboração, modificação e melhoria das características de uma série de produtos para uso na alimentação humana. Assim é que algumas espécies de bactérias láticas se empregam no preparo de emulsões de carnes e na fermentação de pepinos e chucrute que se processam às custas de Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus brevis e Lactobacillus plantarum. Existem, ainda, alguns Lactobacillus que produzem alterações em produtos fermentados como a cerveja, o vinho e as azeitonas principalmente por espécies de Lactobacillus brevis. Também turbidez provocada por Lactobacillus heterofermentativos não é incomum em vegetais fermentados. O Leuconostoc mesenteroides provoca decomposição gasosa em abacaxi e ervilhas enlatados e gomosidade em pessegos. Finalmente, o Leuconostoc dextranicum causa alte

rações nos sucos concentrados de laranja, provocando grandes prejuízos econômicos a esta indústria.

Ainda no que respeita aos sucos cítricos parece haver certo - consenso quanto a relação proporcional existente entre o número de contaminantes e a quantidade de diacetil. Há trabalhos que procuram estabelecer uma relação entre o número de contaminantes presentes em um suco e a quantidade de diacetil.

Tem-se procurado estabelecer padrões calcados no número de germes encontrados em relação a quantidade de diacetil, mas não há concordância numérica entre os vários pesquisadores.

A constatação e identificação dos agentes produtores de diacetil e sua eliminação é da mais alta relevância para a indústria de sucos sendo a principal razão desta pesquisa.

O presente trabalho tem pois como objetivo principal:

- 1.- O levantamento microbiológico do suco cítrico em diferentes pontos da linha de processamento;
- 2 - A verificação dos índices de contaminação nos diferentes pontos desta linha;
- 3 - A caracterização das espécies de microrganismos predominantes na linha de fabricação de suco cítrico;
- 4 - A verificação da eficiência da pasteurização;
- 5 - A constatação da recontaminação ou não dos produtos após pasteurização e sua extensão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação microbiana na Indústria de Citrus

Vários pesquisadores tem estudado o problema de contaminantes em produtos cítricos e seus reflexos sobre o gosto, sabor e a celitabilidade.

MURDOCK (35), estudou o controle da contaminação microbiana - na indústria cítrica e, observou que, além da qualidade dos frutos, é importante, também, a manutenção de um programa de sanidade durante todas as fases do processamento. O mesmo autor, enfatizou a necessidade de precauções visando proteger o equipamento durante os períodos de inatividade e durante a entre-safra, confirmando a importância da prova do diacetil na detecção da atividade microbiana nos concentrados de laranja e pomelo.

GARRO e HERNANDEZ (18), estudaram a influência de várias qualidades de laranja na contaminação do suco. Estes autores valeram-se do controle microbiológico para o exame do suco à saída dos extratores utilizando laranjas de má qualidade e refrigeradas. Mesmo com a linha de produção desinfetada, a experiência resultou na produção de um suco altamente contaminado e, decorridas duas horas de funcionamento, revelou um índice de diacetil superior a 0,6 ppm. O intervalo de desinfecção - que seria de quatro horas para os extratores, cinco horas para os homogeinizadores, três horas para as centrífugas e qua-

tro a cinco para o pasteurizador, não poderia prevalecer com este tipo de matéria-prima que, já com duas horas alcançou 0,6 ppm de diacetil.

SHARF (42), chamou a atenção para a limpeza frequente dos equipamentos a fim de evitar que dentro do sistema, pudesse formar-se um ponto adequado à multiplicação e fixação de colônias bacterianas, tornando-se assim um reservatório de contaminação contínua do produto. Ainda Sharf concluiu que as bactérias dos gêneros Leuconostoc e Lactobacillus, bem como as leveduras, se desenvolvem entre 1,7 a 10°C. Daí a necessidade de manter-se o suco próximo a 0°C. Nem todos estes microrganismos revelaram porém o mesmo gradiente térmico observando-se que, enquanto o Leuconostoc crescia entre 4,5 a 10°C os Lactobacillus somente se desenvolviam acima de 10°C, o que reforçou mais ainda a necessidade da manutenção de boa supervisão higiênica na elaboração destes produtos.

GENTH (20), também enfatizou a importância de medidas sanitárias adequadas na indústria de bebidas não alcoólicas face aos desastrosos efeitos resultantes quando da negligência de tais precauções. Quanto a origem dos contaminantes, o mesmo referiu como causas: a matéria-prima, os produtos semi-acabados, os recipientes reaproveitados, equipamentos, maquinária e o problema de pessoal com inadequada educação sanitária. Ainda Genth fez menção sobre a necessidade da utilização de agentes desinfetantes de boa qualidade e eficiência, bem como seu uso na concentração adequada. Também o perigo de contami-

nação por leveduras e fungos foi enfatizado, dado a crescente importância das micotoxinas..

GARRO E HERNANDEZ (19), levaram a efeito um estudo sistemático visando determinar os focos de contaminação existentes nas linhas de fabricação a fim de que este conhecimento servisse de base para o desenvolvimento de um programa racional de limpeza e higiene. O exame foi conduzido sobre cinco pontos diferentes da linha de processamento, chegando-se a conclusão de que, no início do trabalho, era necessário limpar e desinfetar os pontos críticos de contaminação. Nos referidos pontos eram alcançados, após três a cinco horas de operação, contagens de contaminantes de aproximadamente 250.000 germes por ml. A desinfecção e limpeza da linha, feita a cada quatro horas, resultou numa redução palpável do número de bactérias, ao passo que, a omissão desta prática, resultava em uma elevada e progressiva contaminação acompanhada de alterações de sabor e gosto.

MURDOCK (34), tentou estabelecer tabelas quantitativas de ocorrência de bactérias em suco de laranja concentrado e demonstrou que nos diversos pontos da linha de processamento se constataavam diferenças microbianas quantitativas. O mesmo autor verificou, ainda, que estas diferenças variavam com a estação do ano, aumentando de janeiro a maio nos Estados Unidos. Este estudo, que teve a duração de 16 anos, começando sempre no extrator e acabando no "finisher", evidenciou que as conta

gens mais elevadas dependiam da estação do ano sendo sempre mais altas nos meses mais quentes.

O problema de acúmulo e desenvolvimento de germes em determinados pontos da linha de processamento começou a assumir grande importância na medida em que os sucos cítricos passaram a constituir artigo de exportação. Daí em diante, vários pesquisadores se interessaram pelo assunto e procuraram remediá-lo pelo uso de mais severas medidas higiênicas e de substâncias inibidoras ou desinfetantes. Assim é que, WEBEROVA et al. (50), procuraram verificar a ação de inibidores sobre Leuconostoc mesenteroides utilizando um produto contendo 36 a 40% de ácido peracético, 7 a 10% de água oxigenada e 1% de ácido sulfúrico. Em uma outra série de experiência os mesmos autores usaram dietil pirocarbonato verificando que, as mínimas quantidades necessárias para destruir este microrganismo eram 20 ppm em 60 minutos para o primeiro ensaio e 75 ppm em 30 minutos para o segundo. O segundo dos produtos era preferível, por agir também contra leveduras e, por decomposição, produzir CO₂ e etanol que são preferíveis ao ácido acético resultante do primeiro produto.

BARKAI e AHAROMI (3), estudaram a ação dos vapores de acetaldeído sobre o desenvolvimento das leveduras tendo verificado que a ação fúngica é uma função da concentração da droga frente ao tempo de exposição. Assim é que a exposição por 10 horas a 0,5% de acetaldeído foi letal para quase todas as espécies.

Os Schizosaccharomyces, principais responsáveis pela deterioração de sucos cítricos, foram sensivelmente inibidos por vapores de acetaldeído.

DJIEN et al. (15), estudaram o efeito combinado do benzoato de sódio e tratamento térmico sobre o suco de laranja. Constataram que a adição de 250 ppm de benzoato de sódio a 50°C reduziu o tempo de letalidade de Saccharomyces cerevisiae em 100%, ao passo que, 100 ppm a 60°C reduziram a mesma em apenas 90%.

COSTER (10), estudando o efeito do pH sobre aeróbios esporulados, utilizou suco de fruta concentrado contaminado com 100 esporos por ml. Verificou que, esses aeróbios esporulados não conseguiam atacar o suco de pH normalmente baixo. O aquecimento a 96°C por 20 segundos reduziu este número de esporos mas, conservadores químicos não tiveram efeito. Ainda COSTER e MAK (11), contaminaram suco concentrado com 70 anaeróbios esporulados por ml e o incubaram por sete dias à 37°C. Não observaram modificação organoléptica do suco e o número de bactérias declinou para cinco por ml após esse período de incubação. Em outra experiência, a concentração de bactérias foi elevada para 10^6 por ml e após cinco dias à 37°C não foi observada decomposição da pectina nem limosidade. Recomendaram então, uma pasteurização à 96°C por 20 segundos a fim de eliminar os esporos.

SVORCOVA (45), estudou a propagação de psicrófilos e outros

germes produtores de mucosidade em meio artificial contendo carboidratos, tanto em aerobiose como em anaerobiose e em várias temperaturas. Concluiu, que a propagação dos psicrófilos pode ser controlada e restringida pelo emprego de normas higiênicas habituais. Por outro lado, o autor verificou ainda que a manutenção de bebidas a 18°C não constitui fator limitante uma vez que este grupo de germes se desenvolve e prolifera, mesmo a 1°C.

Em vista da importância das leveduras na elaboração de bebidas não alcoólicas, estas tem merecido cuidadosos estudos. Entre os pesquisadores que se dedicaram a este assunto, podemos mencionar PATRICK e HILL (39), PITT (40) e PUTT et al. (41), que, estudando bebidas e alimentos líquidos deteriorados, isolaram várias leveduras. Estudando estes microrganismos, Pitt verificou que são bastante resistentes podendo crescer em meio com pH muito baixo, não sendo portanto inibidos em alimentos ácidos. Todavia, tanto o ácido acético como o ácido ascórbico se mostraram eficientes contra a maioria destas leveduras. Apesar disso, as leveduras constituem importante problema devendo merecer considerações especiais no exame dos alimentos ácidos.

TURTURA e SAMAJA (47), estudando a deterioração de sucos de frutas por estes microrganismos fizeram uma menção especial quanto aos efeitos do pH entre 2,35 a 3,8 e a pureza da sacarose utilizada no produto. O resultado mostrou que o cresci-

mento das leveduras diminuía com o decréscimo do pH e que bebidas preparadas com açúcar comercial permitiam melhor crescimento de leveduras do que aquelas em que se usava sacarose p.a.

Até este ponto, vimos vários trabalhos referentes à ocorrência de bactérias e leveduras em alimentos líquidos, ou seja em sucos cítricos. Sabe-se todavia que os alimentos, além de veicularem agentes microbianos, também são capazes de serem portadores, de forma passiva, de alguns virus tal como o da poliomelite e da hepatite infecciosa. Muito embora, os virus não sejam capazes de multiplicarem-se nos alimentos, encontram nesses, um meio de sobrevivência adequado para manter sua viabilidade por tempo variável. Assim é que KOCOT (29), fazendo uma revisão deste assunto, constatou que, em quatro de cada dez surtos de poliomelite, o veículo foi leite cru ou pasteurizado, creme ou limonada. Em outros sete surtos, relatados pelo mesmo autor, a fonte de contaminação inicial foi relacionada a pessoas infectadas, principalmente leiteiros. No caso do virus da hepatite infecciosa do homem, os alimentos responsáveis foram o leite, os moluscos, salada de batata, sorvete e suco de laranja. Este aspecto do problema ainda não foi suficientemente estudado sendo que a literatura poucos trabalhos apresenta a respeito. Todavia, tendo em conta a importância destes achados em saúde pública, não poderíamos ter deixado de mencioná-lo a fim de despertar a atenção para o problema, principalmente quanto à sua possível importância na indústria de sucos de frutas como possível agente de disseminação.

2.2. Análises do suco de laranja visando Controle Microbiano

JUVEN (27), em 1976 apresentou uma técnica simples e fácil para detectar germes produtores de gás em alimentos líquidos. O autor isolou uma amostra de Lactobacillus brevis de uma lata estufada contendo pomelo com xarope.

Esta amostra de Lactobacillus brevis, quando inoculada em suco de laranja com pH inferior a 3,5 produziu diacetil e um cheiro desagradável. Este germe provocava deterioração de sucos cítricos com pH inferior a 3,5.

O Serviço de Pesquisa do Ministério de Agricultura dos Estados Unidos (1), mencionou ter identificado Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum variedade mobilis, Leuconostoc dextranicum e Leuconostoc mesenteroides em sucos, responsabilizando-os pela elaboração do diacetil.

BERRY et al. (4), CARR (8) e CARR (9), estudaram os germes implicados na deterioração de sucos cítricos mencionando o Leuconostoc sp., o Lactobacillus plantarum variedade mobilis e a Zigosaccharomyces vini como responsáveis pela deterioração.

Quando um alimento oferece condições próprias à proliferação microbiana, a multiplicação destes traz um aumento do número de germes e, também, o aparecimento de produtos metabólicos e catabólicos, no interior do alimento. Dentre estes produtos, temos substâncias resultantes do desdobramento do substrato e,

no caso dos sucos de frutas, o aparecimento do diacetil.

De acordo com MURDOCK (35) e ZANGELMI et al. (53), a atividade microbiana no suco cítrico pode ser avaliada pela determinação quantitativa do diacetil, pois, os principais microrganismos que se desenvolvem no suco (bactérias lácticas e leveduras) produzem esse metabolito durante o seu crescimento.

GARRO E HERNANDEZ (18), face as interferências que ocorrem na determinação do diacetil apresentaram uma equação derivada da absorvância a 530 nm a um minuto e trinta minutos após o aparecimento da cor na reação de Voges Proskauer (reação do diacetil com α -naftol em meio alcalino). Constataram grande sensibilidade do processo e determinaram uma relação linear entre a carga microbiana e o conteúdo de diacetil no suco de laranja.

O teste do diacetil é usado rotineiramente na indústria como índice que indica crescimento bacteriano no suco. Como citado por WEISSMAN (51), um produto é considerado insatisfatório quando o conteúdo de diacetil ultrapassa 5 ppm.

O conteúdo de diacetil inferior a 0,37 ppm ou uma carga microbiana em torno de 69.000/ml indicariam produto elaborado em boas condições higiênicas ao passo que, cifra superior a uma carga de 228.000/ml e índice de diacetil superior a 0,45 ppm denotariam condições higiênicas de produção pouco adequada - GARRO E HERNANDEZ (19).

O valor do diacetil depende principalmente da concentração de acetoina nos sucos de frutas cítricas, que é um metabolito de bactérias ácido-tolerantes, tais como os gêneros Leuconostoc e Lactobacillus.

Quando o teor do diacetil é suficientemente grande, resulta na formação de sabor e aroma anormais denominados pelos pesquisadores de língua inglesa de "buttermilk". Como já mencionamos, este é provavelmente o problema mais importante na conservação e comercialização dos sucos cítricos sendo de to interesse a eliminação dos agentes que o elaboram, visto seu motivo de desvalorização ou mesmo de rejeição de partidas de sucos congelados por parte dos países importadores.

De acordo com WEISSMAN (51), as leveduras também são capazes de produzir diacetil, porém, algumas conseguem eliminar esse composto, provavelmente por ação de enzimas redutoras, e desta forma, produtos que a princípio dariam ensaios positivos, acabam dando uma reação de resultado negativo para o diacetil. Assim, um produto com elevado teor de diacetil indica certamente um suco em via de deterioração; no entanto, aquele de baixo teor de diacetil nem sempre indica um produto de boa qualidade uma vez que há possibilidade de um amento deste índice com o decorrer do tempo. Para controle mais aprimorado desta prova foi sugerida a contagem das bactérias utilizando-se o meio "orange serum agar" (OSA).

Dentre os muitos autores que estudaram o problema, COSTER -

(10), recomendou os meios de glicose-triptona-extrato de leveda agar (GTL), WL-nutriente agar e meio de extrato de fígado para uso rotineiro de controle microbiológico do suco cítrico durante as fases de produção. A incubação nesses meios foi feita a 30°C por 72 horas, sendo que o GTL podia ser usado como meio universal por prestar-se à detecção de fungos, leveduras e bactérias; o meio WL-agar é mais útil para a distinção visual entre os vários grupos de microrganismos, e, o último dos meios mencionados indicaria mais propriamente germes formadores de gás quando em anaerobiose.

MURDOCK e HATCHER (36), estudaram o método da alça de platina padronizada de 0,01 e 0,001 ml comparativamente ao processo de sementeiras em placas para contagem global de bactérias em suco de laranja não concentrado. A vantagem do uso da alça assim padronizada é que ela não necessita pipetas e frascos de diluição, simplificando o trabalho. Os resultados deste estudo comparativo revelaram haver uma diferença estatisticamente significativa, nos dados obtidos. Todavia, tendo em vista que tal diferença é muito pequena para condições normais de rotina de trabalho, os autores foram de opinião que este processo constituía uma alternativa válida para trabalhos rotineiros podendo ser conduzido mesmo sem flambar a alça; é um processo rápido, não requer equipamento especial mas necessita um bom treinamento prévio a fim de se manter um bom grau de precisão.

CRANSTON e CALVER (13), tratando do mesmo assunto, descreve -

ram um processo de coloração fluorescente que torna possível a avaliação rápida de leveduras contaminantes em bebidas. Esse método permite distinguir células vivas de mortas tendo revelado ainda uma boa correlação com aquele de contagem em placa.

Finalmente, BEECH (5), fez uso de membrana filtrante simples para exame do equipamento de uma fábrica de extração de sucos de cidra a fim de comprovar a esterilidade final do produto. O processo é simples e de fácil aplicação para o equipamento descrito.

Com a mesma finalidade, PATON e JONES (38), empregam membrana filtrante preta ou marrom para contagem de microrganismos de amostras de alimentos fluídos. Após a filtração, a membrana é montada sobre lâmina e examinada ao microscópio com luz U.V. Os microrganismos presentes na membrana fluorescem fortemente baixo a incidência dos raios de luz U.V. Para a verificação da existência de células vivas, o material em exame é misturado a uma solução de acetato de fluoresceína. Por este processo as células vivas viáveis fluorescem ao passo que, as não viáveis não mostram fluorescência. A comparação deste processo com aquele de exame em placas mostra boa correlação. Ao que tudo indica, este processo pode vir a ser de grande utilidade prática visto que pode indicar as condições higiênicas dos alimentos antes de seu tratamento térmico dando uma boa idéia sobre as condições do trato e conservação da matéria-pri

ma antes do processamento final.

2.3. Características das bactérias lácticas presentes no suco de laranja

As bactérias lácticas apresentam-se sob a forma de bastonetes ou cocos Gram positivo. São tolerantes à acidez elevada e convertem grande percentagem de açúcares em ácido láctico. Metabolicamente, existem dois tipos: os homofermentativos e os heterofermentativos. Os homofermentativos produzem quase que exclusivamente ácido láctico pela fermentação da glicose, ao passo que os heterofermentativos produzem, além do ácido láctico, ácido acético, álcool etílico e dióxido de carbono LA-MANNA e MALLETTE (30).

Tanto os homofermentativos como os heterofermentativos, quando na forma de bastonetes pertencem ao gênero Lactobacillus. Os homofermentativos na forma de cocos pertencem aos gêneros Pediococcus ou Streptococcus e os heterofermentativos na forma de cocos pertencem ao gênero Leuconostoc. Algumas espécies dos gêneros já mencionados, quando presentes no suco de frutas, são responsáveis pela deterioração destes, causando alteração na composição química e propriedades sensoriais do produto. CARR (7), abordou o problema da presença destes microrganismos em forma de tétrades, em cidra, devido a tolerância a condições ácidas e a teores alcoólico e salino. Algumas formam limosidade e, em certos substratos, tais como cerveja, cau

sam uma alteração que se traduz por uma viscosidade filamentosa denominada de "ropiness". O mesmo autor verificou que tanto os Lactobacillus como os Pediococcus são comumente encontrados em cidra, ao passo que as tétades homofermentativas são extremamente raras.

É de notar-se que as bactérias lácticas são prejudiciais à indústria de sucos de frutas. Representantes deste tipo de microrganismos são necessários na indústria de leite e derivados por serem responsáveis pela fermentação de produtos lácteos com produção de características organolépticas desejáveis. É o caso dos leites fermentados, queijo e manteiga onde tais bactérias são as grandes responsáveis na transformação do leite e no processamento industrial dos produtos dele derivados, GOMEZ-RUIZ (21), FOSTER et al. (17), WILSON e MILLES (52).

Algumas espécies de Lactobacillus e Streptococcus lactis são utilizados como fermento ou indicadores dos processos que contribuem para dar a muitos queijos sabor, aroma e melhor coeficiente de digestibilidade FOSTER et al. (17) e GOMEZ-RUIZ (21), outros produtos como cremes ácidos, iogurte e leites acidófilos devem sua acidez, seu sabor e seu aroma ao ácido láctico, ácidos voláteis, acetofina e diacetil elaborados pela flora láctica.

Outras bactérias do ácido láctico como Pediococcus cerevisiae também são empregadas na elaboração de produtos fermentados -

em emulsões de carne, na fermentação de pepinos, chucrute e a zeitonas GOMEZ-RUIZ (21) e CARR (7).

O primeiro representante deste grupo foi isolado de leite fermentado "kefir", por Kern em 1881 o qual batizou pelo nome de Dispora kaucasica posteriormente Lactobacillus caucasicum atualmente Lactobacillus lactis. Depois de Kern, vários outros autores descreveram germes similares da secreção vaginal, estômago, fezes de lactantes e invertebrados, iogurte, leite comum, peixes, mamíferos, saliva humana, solo, ensilagem, cáries dentárias, esgoto, carnes frescas e curadas, nas aves e em produtos marinhos, WILSON e MILLES (52) e GOMEZ-RUIZ (21).

Algumas espécies heterofermentativas, notadamente o Lactobacillus hilgardii e Lactobacillus trichodes que são encontrados em sucos de frutas são fortemente acidófilos e contribuem para o sabor em vinhos pela conversão do ácido málico a ácido láctico e CO₂, Manual de BERGEY (6).

Ainda no Manual de BERGEY, constam 29 espécies do gênero Lactobacillus, 6 espécies do gênero Leuconostoc, 5 espécies do gênero Pediococcus e 21 espécies do gênero Streptococcus, perfazendo um total de 61 espécies. Muitas dessas espécies apresentam ainda sub-espécies, o que vem demonstrar não só a complexidade deste grupo como também as dificuldades que apresentam para tipificação e classificação.

Portanto, no grupo de bactérias objeto do nosso estudo, há de

terminados representantes úteis à indústria de alimentação, e também há espécies que causam danos à vários produtos elaborados. Assim é que certos Lactobacillus produzem alterações em produtos fermentados. Destes, certas linhagens de Lactobacillus casei e Lactobacillus acidophilus provocam alterações no leite tornando-o viscoso (leite filante) e outras linhagens halotolerantes alteram as salmouras utilizadas na fabricação de queijos e de carnes em processo de maturação. A cerveja, a cidra e o vinho também são por vezes alterados principalmente por espécies de Lactobacillus brevis sendo que a turbidez destes é causada por Lactobacillus heterofermentativos, UNDERKOFER e HICKEY (48).

No entanto, as espécies de Lactobacillus plantarum e Lactobacillus brevis produzem sabor desejável à manteiga pela formação de diacetil ao passo que, em suco de frutas produzem defeitos dos mais graves por alterar o sabor normal do produto, BEECH (5). Ainda o Lactobacillus plantarum provoca o aparecimento de manchas brancas em azeitonas fermentadas e tomates. Também o gênero Leuconostoc, a par de fermentações úteis, tem sido encontrado em fermentações anormais como é o caso do Leuconostoc mesenteroides que provoca decomposição gasosa em abacaxi e ervilhas verdes enlatadas bem como viscosidade filamentosa em pessegos além de causar problemas nas refinarias de açúcar pela formação de dextrano.

Por último, de acordo com OWEN (37), o Leuconostoc dextrani -

cum, pelas alterações que produz em sucos concentrados congelados de laranja nos quais provoca grandes prejuízos econômicos, tornou-se ainda mais importante visto que também produz dextrano em caldo de cana de açúcar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Amostras de sucos

As amostras de suco de laranja foram coletadas em diferentes pontos correspondentes às etapas mais importantes, do ponto de vista microbiológico, da linha de processamento, em um estabelecimento de industrialização localizado em Limeira, São Paulo. A coleta foi feita em frascos esterilizados de 250 ml e o material foi transportado ao laboratório da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, acondicionado em caixas de "Isopor" contendo gelo picado. Entre o momento da coleta e o momento dos exames, decorreram aproximadamente 18 horas. Durante esse período, o suco foi sempre conservado em temperatura inferior a 5°C, porém superior à temperatura de congelação.

As amostras foram colhidas nos seguintes pontos:

- Amostra 1 - após o acabamento ("finisher");
- Amostra 2 - após a centrifugação;
- Amostra 3 - após a pasteurização;
- Amostra 4 a 8 - nos seis estágios de evaporação (concentrador);
- Amostra 9 - no resfriador ("flash");
- Amostra 10 - no tanque de mistura;
- Amostra 11 - após o trocador de calor.

Obteve-se, assim, um total de 11 amostras correspondendo a on

ze pontos de coleta (ver fluxograma na Figura 1).

A coleta das amostras foi feita em três intervalos de higienização: (1) logo após a lavagem da linha, (2) a nove horas e (3) dezoito horas de trabalho contínuo.

3.1.2. Equipamentos especiais

Além dos equipamentos e aparelhos normais de laboratório de Microbiologia foram utilizados os seguintes aparelhos:

1. Incubador de temperatura gradiente da Scientific Industries Inc., New York, N.Y., equipado com tubos especiais em forma de "L" (17 mm de diâmetro e 170 mm de comprimento).
2. Agitador de frascos rotatório New Brunswick Scientific, - N.B.S., Modelo V.
3. Spectrofotômetro "Bausch and Lomb" Spectronic 20, adaptado para operar com tubos de 20 mm de diâmetro externo. Comprimento de onda utilizado 600 nm. Uma adaptação foi feita no protetor dos raios externos para poder receber os tubos em "L" do incubador de temperatura gradiente.
4. Microscópio de contraste de fase "Nikon" modelo L-Ke, adaptado com ocular micrométrico "Nikon tipo filar".
5. Conjunto de filtros de membrana de Millipore.

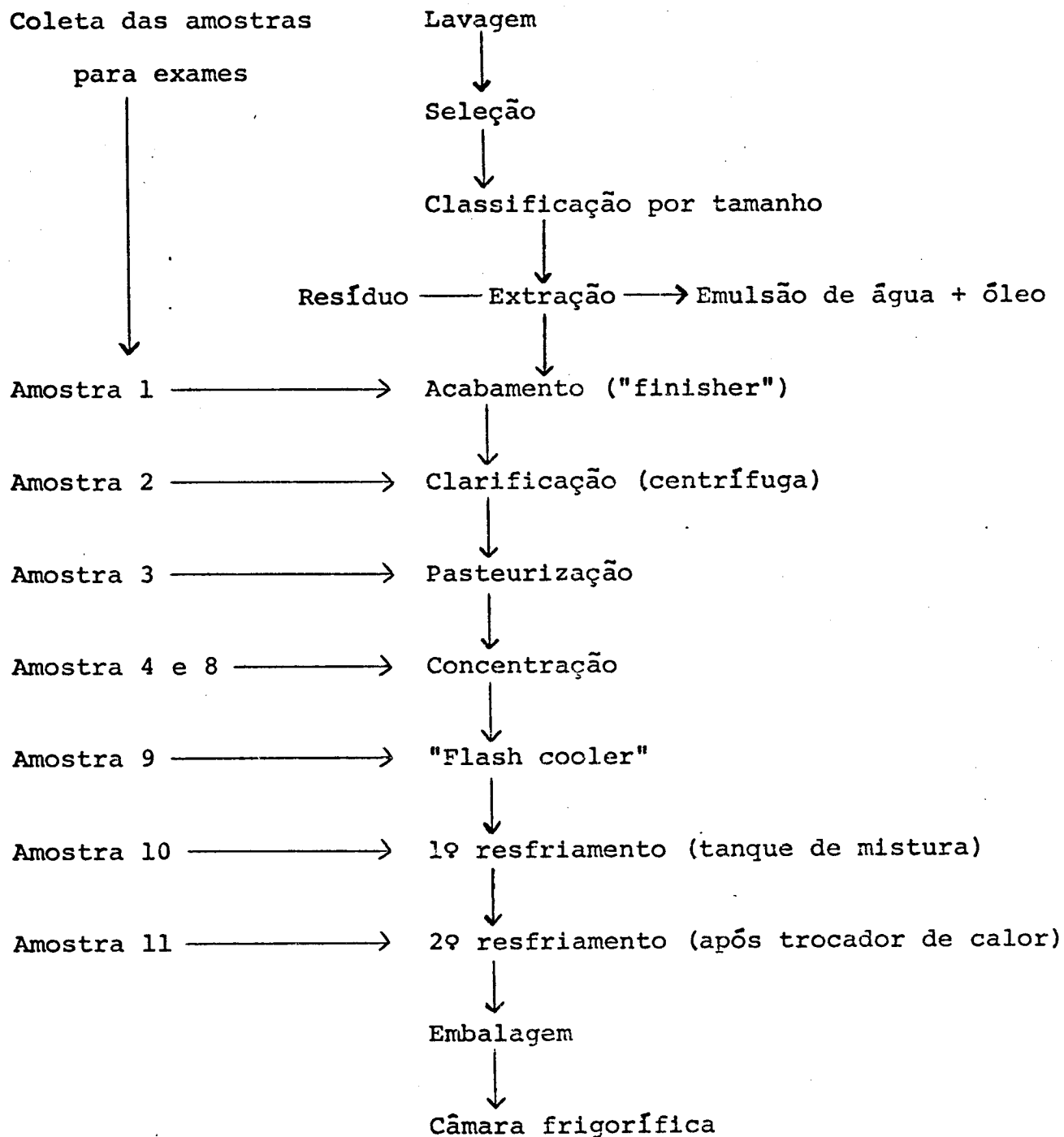


Figura 1 - FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA.

6. Potenciômetro de pH Corning Digital 110.
7. Jarras anaeróbias com seus respectivos catalizadores e en-
velopes geradores de gases "GasPack Anaerobic System" -
(BBL).
8. Banho termostático de temperatura controlada "Fanem" Mod.
120/2 de 110 V e 1000 KW.
9. Conjunto para cromatografia de camada delgada marca "Desa
ga Heidelberg".
10. Refratômetro tipo Abbé da Carl Zeis.
11. Incubador agitador-rotativo, Mod. G-25, New Brunswick
Scientific Co. Inc.

3.1.3. Meios de cultura

1. "Potato Dextrose Agar" da Difco Laboratories, Inc., SHARF
(42).
2. "All Purpose Medium with Tween" (APT-sólido) da Difco La-
boratories, Inc., SHARF (42).
3. "All Purpose Medium with Tween" (APT-líquido) da Difco La-
boratories, Inc., SHARF (42).
4. "Orange Serum Agar" (OSA) da Difco Laboratories, Inc., -
SHARF (42).

5. "Man Rogosa Sharp" (MRS) da Difco Laboratories, Inc.,
Difco (14).
6. Fígado sorbato (FS), SHARF (42).
7. Meio base para fermentação de açúcares, HARRIGAN e McCANCE
(14).
8. Meio para produção da amônia a partir da l-arginina,
SKERMAN (43).

3.1.4. Reagentes

1. Reagentes de Benzidina preparado da seguinte forma:

Composição:

Hidrocloreto de benzidina	1 g
Ácido acético glacial	20 ml
Água destilada	30 ml

Aquecer para dissolver os ingredientes. Resfriar e adicionar 50 ml de álcool etílico a 95%. Colocar o reagente em frasco escuro e guardar em refrigerador à 10°C.

2. Reagente de Catalase-Água oxigenada à 3% (v/v), Taylon e Achanzar (46).
3. Solução alcoólica de Vermelho de Metila, HARRIGAN E McCANCE (14).
4. Reagente de Nessler, HARRIGAN E McCANCE (14).

5. Reagente para coloração de Gram preparado segundo a técnica de Hucker, Society of American Bacteriologists (44).

6. Tampão fosfato a pH 7,2, SHARF (42).

7. Vaspar, SHARF (42).

8. Ácidos orgânicos: ácido cítrico, málico, láctico, quínico e succínico à 0,25% (p/v), CARR (7).

9. Reagentes para cromatografia.

Solventes para desenvolver placas de cromatografia de camada delgada com a composição abaixo, KREBS et al. (28), LEWIS e SMITH (31) e HOUGH (25).

A) n-butanol: hidróxido de amônio a 30%: água (85:5:10)

B) n-butanol: etanol: água (80:22:38)

Solventes para cromatografia em papel Whatman nº 1:

A) n-butanol, Piridina e água (6:4:3)

B) n-butanol, Piridina e água (6:6:3)

C) n-butanol, Piridina e água (10:4:3)

D) n-butanol, Piridina e água (6:4:1)

E) n-butanol, ácido acético e água (50:25:25)

F) n-butanol: etanol: água: hidróxido de amônio (80:22:38:80)

10. Reveladores de açúcares, LEWIS e SMITH (31) e HOUGH (25)

(A)

Solução de Dicromato de potássio

5 g

+

Ácido sulfúrico 40%

100 ml

(B)

Anilina

Iodo nº 141

Nitrato de prata, hidróxido de sódio nº 234

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinação do pH e do Grau Brix

Preliminarmente foram determinados o pH e o Grau Brix do suco concentrado. Em seguida foi feita a diluição com água destilada estéril até atingir a concentração natural do suco. As diluições decimais subsequentes, para fins de semeadura e isolamento de colônias, foram feitas com tampão de fosfato de potássio com pH 7,2.

3.2.2. Contagem de microrganismos

O suco concentrado de laranja reconstituído conforme acima descrito, foi diluído, a seguir, em ordem decimal até o ponto desejado, e as três últimas diluições foram semeadas em profundidade, em triplicata, para cada meio, em quantidade de 1,0 ml, em placas de Petri previamente esterelizadas. O mesmo foi feito com o suco concentrado a fim de verificar possíveis diferenças de comportamento no crescimento.

Em uma fase preliminar as placas foram adicionadas dos meios fundidos de "APT", OSA, FS e PDA acidificado a 45°C para se-

rem a seguir semeados. Em fase posterior, foram selecionados apenas o meio OSA e o PDA acidificado para prosseguimento dos testes de contagem dos microrganismos e o meio APT para os demais testes. Para tal fim foi utilizado o método recomendado por APHA (2) e HAUSLER (24).

As placas foram então incubadas em aerobiose e anaerobiose pelo processo "GasPack", posteriormente abandonado e substituído pela extração do ar atmosférico e sua substituição por nitrogênio e dióxido de carbono na proporção de 90:10 respectivamente. Para assegurar a eliminação mais completa possível do ar atmosférico esta operação foi repetida três vezes.

A incubação foi feita a temperatura de 30°C por 24 a 72 horas e para fins de contagem foram consideradas apenas as placas - contendo um mínimo de 30 e um máximo de 300 colônias. As colônias computadas foram multiplicadas pelo fator de diluição e os resultados expressos em número de bactérias por grama do produto ou logarítmo desse número.

Foram isoladas 400 colônias de bactérias lácticas das diferentes placas, tomando o cuidado de não proceder a seleção das colônias na retirada das linhagens. Para tanto, as placas apresentando até 5 colônias foram todas aproveitadas e aquelas contendo mais de 5 colônias foram subdivididas em setores de 1/2, 1/4 ou 1/8 de área, conforme a densidade, retirando-se todas as colônias presentes em um desses setores sorteados; - HARRIGAN e McCANCE (14).

3.2.3. Pesquisa de leveduras

Durante o isolamento das bactérias lácticas, foi feito o isolamento de algumas leveduras para verificar a sua capacidade produtora de diacetil. De um total de 100 culturas de leveduras isoladas, 20 foram estudadas com maiores detalhes.

3.2.4. Características morfológicas das colônias

Após a incubação as placas foram observadas com lupa de X10 sendo anotadas as seguintes características: (a) tamanho das colônias; (b) pigmentação; (c) forma; (d) elevação; (e) bordas; (f) superfície.

3.2.5. Reação de Gram

Procedeu-se o estudo da reação de Gram de cada colônia usando-se o método modificado por Hucker, APHA (2).

3.2.6. Comprovação da pureza das colônias

As colônias foram semeadas em estrias sobre placas de Petri com o meio APT-sólido pela técnica de esgotamento. A seguir, essas foram incubadas em jarras anaeróbias a 30°C durante 24 a 72 horas, sendo em seguida, reexaminadas com lupa para comprovação de sua morfologia, coloração e presença de relevo. Pela coloração de Gram, verificou-se, além desta reação, a morfologia e arranjo das células.

Comprovada a pureza, as colônias foram novamente semeadas em tubos de APT-sólido que, após incubação e desenvolvimento, foram cobertas com vaselina líquida esterilizada para evitar contacto com o ar atmosférico e a secagem do meio, mantendo-se assim a vitalidade das células por maior período de tempo.

3.2.7. Reativação das culturas

Todas as colônias que foram utilizadas nos testes bioquímicos e fisiológicos foram previamente revigoradas inoculando-se 0,1 ml para outro tubo contendo o meio APT-líquido recém preparado e incubando-se a 30°C durante 24 a 72 horas. Esta transferência foi repetida por três vezes a fim de se obterem culturas vigorosas. Os meios de cultura usados foram sempre de preparo recente, tendo sido fervidos por cinco minutos antes do uso para eliminar o oxigênio dissolvido.

Colônias bem isoladas apresentando características que lembravam bactérias lácticas foram transferidas em picada para tubos contendo o meio APT-sólido e estes foram posteriormente incubados a 30°C por 24 a 72 horas. Após o período de incubação foi verificada a pureza das culturas, baseada nas suas características tintoriais e morfológicas.

As colônias puras foram submetidas a testes bioquímicos e fisiológicos para sua caracterização.

3.2.8. Prova da catalase

Foi realizada pela utilização de colônias desenvolvidas em placas de APT-sólido. A catalase foi detectada observando-se o desprendimento de oxigênio sobre cada colônia após a adição de água oxigenada a 3% (v/v).

3.2.9. Prova de benzidina ou de heme-proteína

Foi adicionada água oxigenada à 3% mais uma gota de benzidina. O teste foi considerado positivo quando houve aparecimento de uma coloração azulada.

3.2.10. Produção de CO₂ a partir da glicose

Ao tubo com meio APT (semi-sólido, sem citrato de sódio) previamente derretido foi adicionada assepticamente uma solução de glicose à 0,7%, esterilizada por filtração. Este foi deixado em banho à 45°C por uma hora a fim de atingir a temperatura adequada de inoculação. A prova foi realizada em triplicata pela inoculação de 0,2 ml de cada uma das linhagens isoladas. Em seguida, os tubos foram selados com 0,2 ml de "Vaspar" previamente esterilizado à 121°C por quinze minutos e incubados a 30°C por quinze dias sendo examinados a cada 24 horas. Nos tubos em que o carboidrato foi fermentado acompanhado de produção de gás, houve a elevação do selo de "Vaspar" acima da superfície do meio de cultura. Neste caso, o teste foi considerado positivo para bactérias heterofermentativas. No caso

de não ter havido produção de gás, o teste foi considerado negativo e as bactérias tidas como homofermentativas.

De um total de 400 culturas isoladas e estudadas quanto a produção de catalase, benzidina e glicose, 30 linhagens foram utilizadas para o estudo mais detalhado, compreendendo os seguintes grupos:

Morfologia	Gram	Heterofermentativos	Homofermentativos
Bastonetes	+	5	5
Cocobacilos	+	5	5
Cocos	+	5	5
Total	+	15	15

3.2.11. Medição das colônias e das células

As colônias foram medidas através do uso de régua milimetrada. Sua morfologia e coloração foram observadas com lupa, através da luz refletida.

Quanto às células, após a coloração pelo Gram, 10 foram medidas usando para tal fim a ocular micrométrica tipo filar, acoplada ao microscópio binocular. As medidas de comprimento e largura foram anotadas e, no caso de forma em cocos, apenas o

diâmetro do mesmo.

3.2.12. Prova de vermelho de metila e Voges Proskauer

Os tubos contendo caldo-glicose-peptona foram inoculados, em triplicata, com 0,2 ml de cada linhagem e incubados a 30°C durante 5 dias. Após a incubação uma porção do meio foi adicionada de cinco gotas de solução de vermelho de metila. O aparecimento de cor vermelha indicou teste positivo. A outra porção do meio de cultura foi utilizada para a prova de Voges Proskauer pela adição de 0,6 ml de uma solução a 5% de α -naph₁tol e 0,2 ml de hidróxido de potássio a 40%. O aparecimento da cor vermelha indicou teste positivo.

3.2.13. Testes de fermentação

Para o estudo das reações de fermentação, usou-se o meio básico de HARRIGAN E McCANCE (14) de extrato de carne, peptona e água, ao qual foi adicionado 1,0 ml de uma solução de bromocresol púrpura a 1,6% em álcool etílico.

Os diversos carboidratos foram esterilizados por filtração. Aos tubos contendo 5,0 ml do meio básico foram adicionados 0,5 ml de cada açúcar na concentração de 10%. A seguir, os tubos foram inoculados em triplicata, com 0,2 ml de cada linhagem e incubados a 30°C por 24 a 48 horas. Nos tubos em que o carboidrato foi fermentado, o indicador de pH mudou de vermelho púrpura para amarelo, indicando assim produção de ácido.

3.2.14. Detecção de manitol a partir de frutose

A partir dos tubos utilizados para a prova de fermentação da frutose que apresentaram reação positiva, foi feita a cromatografia em papel Whatman nº 1 e camada delgada para verificação do desdobramento deste carboidrato a manitol. Para esta última, foram preparadas placas de sílica G-60, e as amostras aplicadas com micropipetas, colocadas na estufa a 37°C até se car sendo então transportadas para a câmara com solvente para desenvolvimento do cromatograma. A seguir, procedeu-se a revelação das placas para observar presença ou ausência de carboidrato através dos solventes e reveladores que constam na lista dos reagentes. Paralelamente foi feita a cromatografia em papel Whatman nº 1 usando-se o solvente e reveladores já citados.

3.2.15. Redução de nitratos a nitritos

As culturas ativadas de 48 horas em meio líquido de APT foram adicionados 1,0 ml de cada um dos reativos para a prova de nitritos. Quando o teste resultava negativo, foi adicionado zinco em pó para proceder-se à redução do nitrato. O não aparecimento da cor vermelha, significava que o nitrato já havia sido anteriormente reduzido. Para maior segurança, esta prova foi realizada em triplicata.

3.2.16. Produção da amônia a partir da l-arginina

A amônia foi detectada pelo método desenvolvido por SKERMAN (43). Ao meio APT-líquido, foram adicionados 0,2 ml da cultura recentemente ativada e incubados a 30°C por 3 a 7 dias. A produção de amônia foi revelada pelo aparecimento de um precipitado vermelho-laranja com o reagente de Nessler. Paralelamente, o teste foi realizado em tubos sem l-arginina como contraprova em branco.

3.2.17. Tolerância a cloreto de sódio

Foi usado o meio de cultura MRS contendo 5% de cloreto de sódio CARR (7). Os tubos contendo 5,0 ml do referido meio foram inoculados com 0,2 ml de cada linhagem e incubados a 30°C por 24 a 72 horas. Paralelamente, o teste foi realizado em tubos sem cloreto de sódio como contraprova em branco.

3.2.18. Desdobramento da esculina

Para esta prova foi usado o meio básico já mencionado para a fermentação dos açúcares, acrescido de 0,2% de esculina e 0,5% de citrato férrico amoniacal conforme recomendado por CARR (7). A esculina, foi esterilizada por filtração e adicionada assepticamente ao meio. Aos tubos contendo 5,0 ml do meio, foram adicionados 0,5 ml de esculina a 0,2%. A seguir foi inoculado em triplicata, 0,2 ml de cada cultura. Esses foram incubados a 30°C por 240 horas e a mudança da cor do meio de

marrom para preto denotava o desdobramento da esculina.

3.2.19. Teste de produção de dextranio

Utilizou-se o meio agar-sacarose, SHARF (42) para o teste de produção de dextranio a partir de sacarose.

3.2.20. Metabolismo de ácidos orgânicos

Foi feito utilizando o meio APT-líquido contendo 0,25 (p/v) a cada um dos seguintes compostos: ácido cítrico, láctico, málico, quínico e succínico. Após a adição de cada ácido, o meio foi ajustado para pH 4,2 e adicionado indicador verde de bromocresol a 0,04% e autoclavado a 121°C por quinze minutos conforme CARR (7). Após resfriamento, os tubos foram inoculados com 0,2 ml de cada cultura e incubados a 30°C por quinze dias. Nos tubos em que havia utilização do ácido o indicador de pH mudava de verde para azul.

3.2.21. Determinação do pH mínimo de crescimento das bactérias lácticas

Para esta prova, foi utilizado o mesmo meio básico já empregado para as provas de fermentação dos açúcares contendo 0,5% de glicose mas sem indicador. A escala de valores de pH empregada foi de 2,5 a 8,0 com intervalos de 0,5. Os tubos de meios de cultura ajustados para a escala de pH acima mencionada, foram inoculados com 0,2 ml de cada inóculo e incubados a 30°C

por 5 dias. A leitura da absorvância foi feita após 3, 6, 8, 24, 55, 74, 96 e 123 horas, no espectrofotômetro a 600 nm.

3.2.22. Detecção de colônias hetero e homofermentativas

Para esta prova foi usado o meio já empregado para fermentação de açúcares ao qual foram adicionados 5% de glicose e distribuídos à razão de 80 ml em frascos de 250 ml. Estes foram inoculados com pipeta 0,2 ml das linhagens recentemente ativadas. Estas foram incubadas, com agitação a 220 rpm a uma temperatura de 28°C por 14 dias, CARR (7).

3.2.23. Determinação de ácidos totais e voláteis

Após a incubação, utilizaram-se 20 ml do meio de cultura e foi feita a titulação com NaOH 0,1N. Outros 40 ml de meio foram destilados e procedeu-se então à titulação do material destilado, utilizando-se 20 ml deste material.

Cálculo da quantidade percentual de ácidos voláteis com relação aos ácidos totais:

$$\frac{\text{ml NaOH 0,1N gastos na titulação dos 20 ml do material destilado}}{\text{ml NaOH 0,1N gastos na titulação dos 20 ml do meio}} \times 100$$

3.2.24. Determinação dos parâmetros de crescimento (k e μ)

Antes da realização do teste de crescimento a diversas temperaturas, os inóculos foram reativados, transferindo-se por três vezes a intervalos de quinze horas em meio APT-líquido e incubando-os a 30°C sob agitação constante a 220 rpm. Em seguida, foram preparadas as suspensões de bactérias em um tampão de fosfato de potássio a pH 7,2, adicionando-se 0,2 ml da linhagem desenvolvida no meio APT-líquido.

A semeadura para as constantes de crescimento foi realizada, transferindo-se 1,0 ml da suspensão em tampão de fosfato a pH 7,2, para cada tubo do incubador gradiente contendo 9,0ml de meio APT-líquido. O intervalo de temperatura do incubador foi ajustado de 20°C a 60°C, tendo-se utilizado 20 tubos nessa faixa de temperatura para cada linhagem isolada.

A incubação foi realizada sob agitação na velocidade de 60 rpm e o crescimento dos microrganismos foi detectado pelo valor da absorvância no espectrofotômetro a 600 nm. Foram feitas leituras a intervalos de quinze minutos e a constante k de crescimento foi determinada da porção retilínea de maior declive da curva de crescimento utilizando a seguinte equação:

$$k = \frac{2,303 (\log A_2 - \log A_1)}{t_2 - t_1}$$

Onde A_2 e A_1 são as absorvâncias lidas nos tempo t_2 e t_1 res

pectivamente.

O valor de μ (velocidade específica de crescimento) foi calculado da reta da curva de Arrhenius pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{4,574 \cdot (\log k_1 - \log k_2)}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}}$$

Onde T_1 e T_2 são temperaturas absolutas correspondentes a k_1 e k_2 , respectivamente.

3.2.25. Identificação das culturas

A identificação das linhagens obedeceu as normas gerais da 8ª edição do Manual de BERGEY (6).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise dos sucos

O grau Brix das amostras de suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento (Figura 1) variou de 12,5 a 65° conforme se pode ver na Figura 2. Quanto ao pH, sua variação foi insignificante tendo-se situado na faixa de 3,3 a 3,8. Estes resultados de pH estão de acordo com os achados de PATRICK e HILL (39) os quais constataram uma variação de 3,4 a 4,0.

A contagem das bactérias lácticas dos sucos coletados após a centrifugação com diversos meios testados forneceram os resultados constantes da tabela abaixo:

Amostra	Meios para				Meio para
	Bactérias Lácticas				Fungos e Leveduras
	OSA	APT	FS	MRS	PDA
1	14.000	87	72	63	30.000
2	99.000	185	161	92	130.000
Média	11.500	136	116	77	80.000

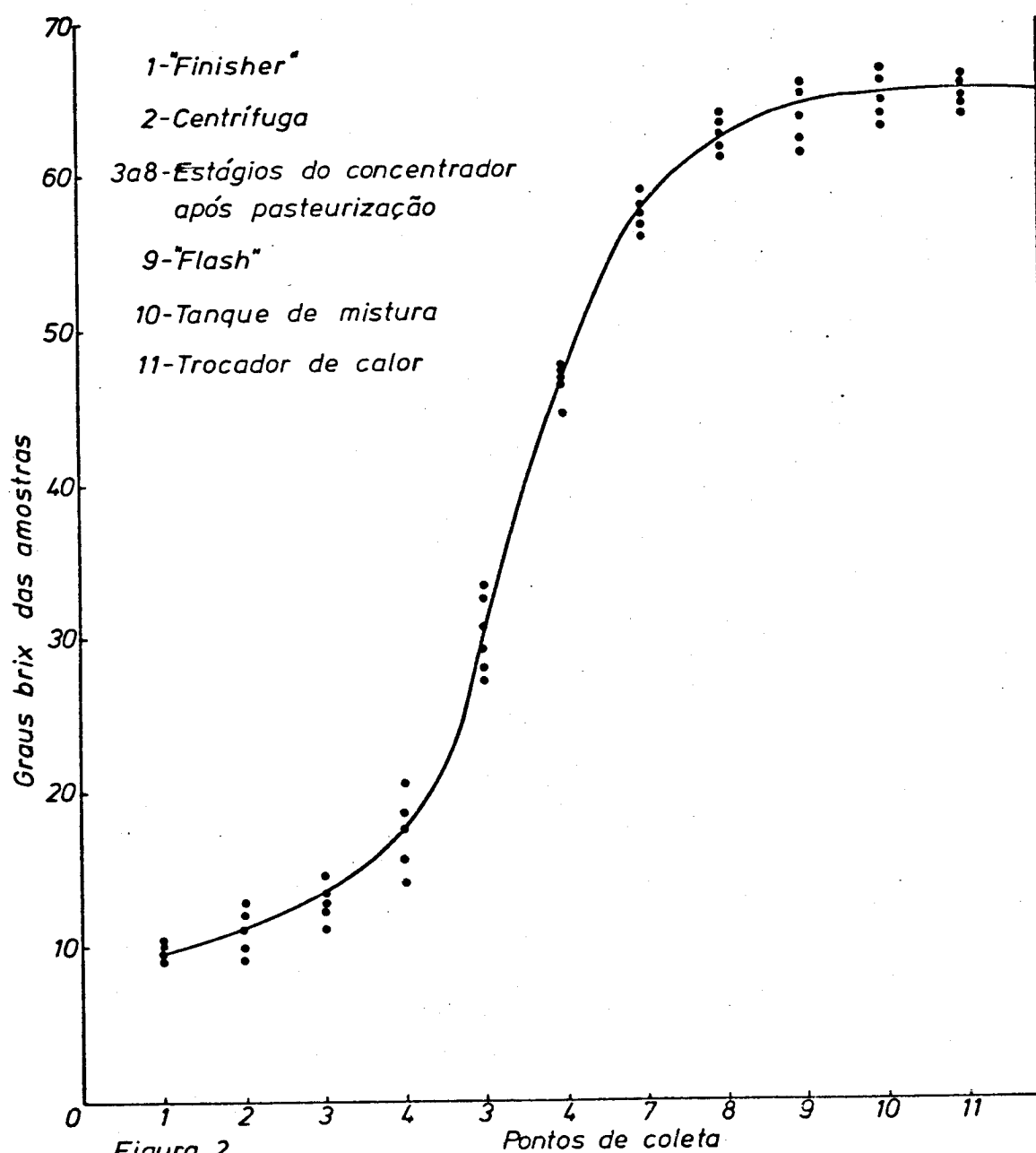


Figura 2

Contagem de leveduras e fungos no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento.

A tabela anterior evidencia que o meio OSA foi aquele que forneceu contagem mais elevada sendo pois o escolhido para o prosseguimento dos estudos. Por outro lado, o meio PDA foi adotado para contagens de fungos e leveduras, visto tratar-se de um meio clássico já sobejamente comprovado. Nossos achados estão de acordo com PATRICK e HILL (39) e o Serviço de Pesquisa do Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (1), que também utilizaram o meio de OSA por favorecer o crescimento de bactérias capazes de se multiplicarem no suco de laranja, causando-lhe modificações indesejáveis.

As contagens de microrganismos no suco de laranja em meio de OSA e PDA durante as diferentes fases do processamento, estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2 e Figura 3 e 4. As contagens mais elevadas de microrganismos foram observadas após a operação de centrifugação, com variação entre 83.000 a 500.000 bactérias e de 72.000 a 120.000 de leveduras e fungos por grama do produto. Após a pasteurização a contagem foi todavia reduzida a valores praticamente nulos. Na fase de concentração de seis estágios a uma temperatura ao redor de 58°C, a contagem microbiana permaneceu nula, mas no "flash", no tanque de mistura e no trocador de calor notou-se o aparecimento de leveduras e bactérias em número variando de algumas dezenas a centenas, fato que merece alguma consideração. GARRO e HERNANDEZ (19), traçaram uma relação entre o número de germes presentes em suco e o número de diacetil, afirmando que um conteúdo de diacetil inferior a 0,37 ppm ou uma carga microbiana ao redor

TABELA 1 - Contagem de bactérias lácticas no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento. (em meio OSA a 30°C - pH 5,6)

Pontos de coleta	Horas de coleta	Contagem* bactérias/g	Logarítmo das contagens
"Finisher"	0	324.000	5,51
	9	43.000	4,64
	18	89.000	4,95
Depois da centrífuga	0	83.000	4,92
	9	500.000	5,70
	18	137.000	5,14
Evaporador 1	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
Evaporador 2	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
Evaporador 3	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
"Flash"	0	207	2,32
	9	27	1,43
	18	27	1,43
Tanque de mistura	0	4480	3,65
	9	96	1,98
	18	213	2,33
Trocador de calor	0	93	1,97
	9	1580	3,20
	18	163	2,21

*média de 10 repetições.

TABELA 2 - Contagem de leveduras e fungos no suco coletado nos diferentes pontos da linha de processamento. (em meio PDA a 30°C - pH 3,5)

Pontos de coleta	Horas de coleta	Contagem* leveduras e fungos/g	Logarítmo das contagens
"Finisher"	0	45.000	4,65
	9	58.000	4,76
	18	250.000	5,40
Depois da centrífuga	0	120.000	5,07
	9	110.000	5,04
	18	72.000	4,85
Evaporador 1	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
Evaporador 2	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
Evaporador 3	0	-	-∞
	9	-	-∞
	18	-	-∞
"Flash"	0	48	1,68
	9	-	-∞
	18	23	1,36
Tanque de mistura	0	200	2,30
	9	43	1,63
	18	48	1,68
Trocador de calor	0	150	2,17
	9	610	2,79
	18	150	2,18

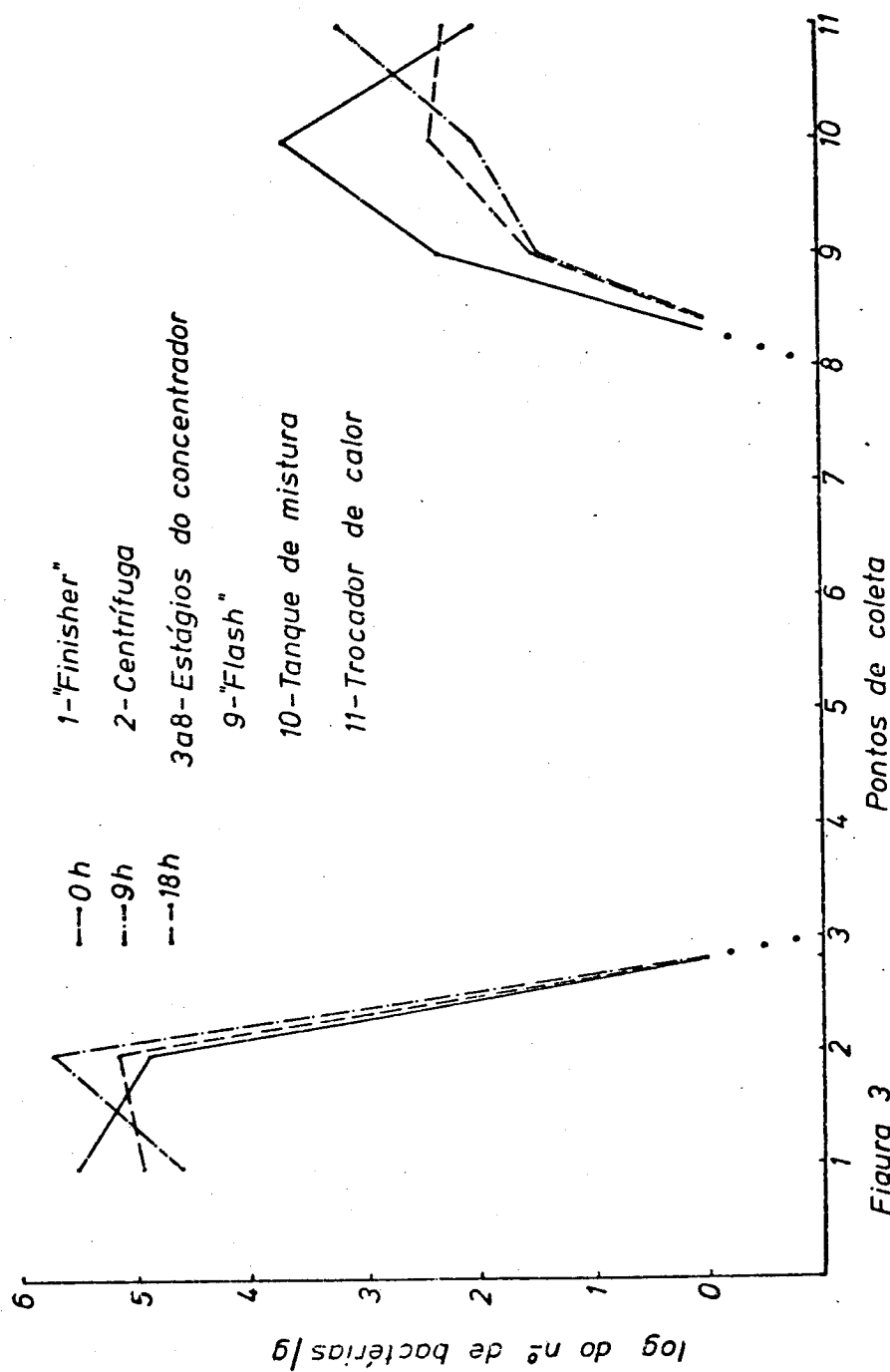


Figura 3
Contagem de bactérias lácticas no suco coletado nos diferentes pontos da
linha de processamento.

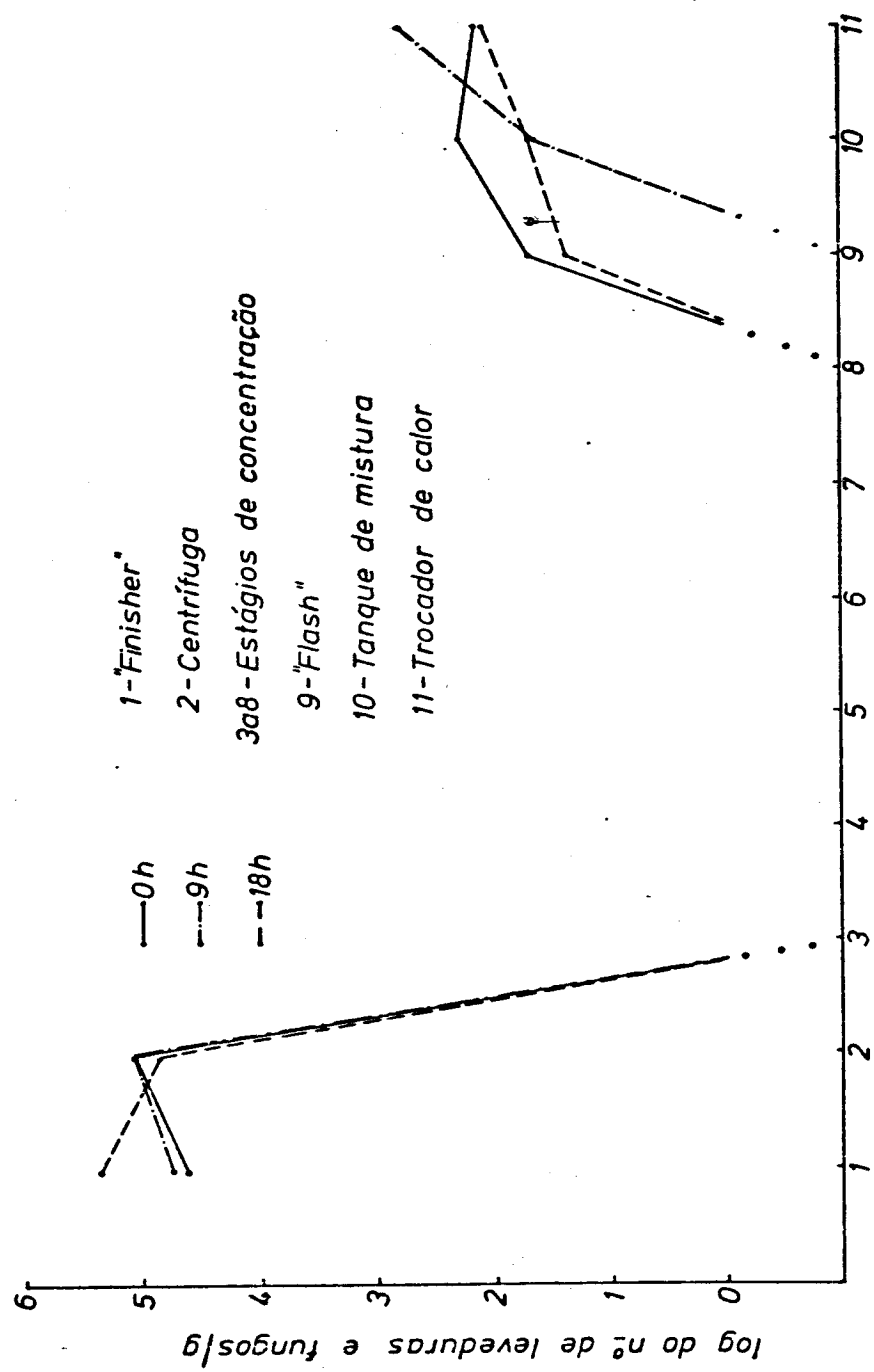


Figura 4
Curva de concentração dos sólidos do suco de laranja durante as etapas de elaboração.

de 69.000/ml indicavam suco produzido em boas condições higiênicas. Por outro lado, o mesmo autor afirma que uma contagem superior a 228.000/ml e índice de diacetil superior a 0,45 ppm denotam higiene de produção pouco adequada. A F.M.C. tolera - um índice de diacetil até 1 ppm (16), valor este acima do dobro do indicado por GARRO E HERNANDEZ (19). VAUGHN e MURDOCK (49) e MURDOCK e HATCHER (33), em trabalho sobre suco cítrico concentrado, afirmaram que pela utilização da pasteurização e boas práticas sanitárias podia-se obter um produto final concentrado com uma população microbiana da ordem de 5.000 a 10.000/ml no produto reconstituído. Nota-se, portanto, divergência no que respeita ao número de bactérias e quantidade de diacetil para a avaliação da qualidade do suco.

A análise dos resultados constantes das Tabelas 1 e 2 denota que, muito embora a pasteurização se revele eficiente, não se pode deixar de considerar que nas fases anteriores, o elevado número de contaminantes durante algumas horas de trabalho poderia ensejar a possibilidade da elaboração de produtos metabólicos no suco, influenciando a qualidade do produto final. As bactérias, fungos e leveduras presentes após a pasteurização são devidos provavelmente, à recontaminação e/ou multiplicação nas tubulações e equipamentos.

Ainda no que respeita aos elevados índices de contaminação do suco (Tabelas 1 e 2) e da possibilidade de elaboração de uma razoável quantidade de metabólitos antes da pasteurização, temos a considerar que o estabelecimento fornecedor do material

objeto do nosso estudo, mantinha um programa de desinfecção -- com intervalo de 18 horas. Todavia, de acordo com trabalhos de GARRO e HERNANDEZ (19) de GENTH (20) e SHARF (42), este intervalo deveria ser bem menor variando de 3 a 5 horas. Nestas condições se evitaria ou se minimizaria proliferação da flora microbiana nos diversos pontos da linha de processamento tais como no "finisher", centrífuga, placas de homogeinizadores, placas do pasteurizador, trocador de calor, resfriamento e entrada do pasteurizador.

Acresce ainda, que a safra da laranja no Brasil Central, ocorre nos meses mais quentes do ano fato que também parece ter certa importância tendo em vista a temperatura ser fator relevante na proliferação microbiana, ponto esse também mencionado por MURDOCK (35).

A análise dos dados da Tabela 1 mostra ainda, que a aparente recontaminação do suco após pasteurização não pode ser considerada muito elevada se compararmos aos padrões relativamente severos propostos por MACAUDA e TODARO (32), que recomendam 50 a 100 germes na contagem global a 37°C e 5 a 20 leveduras e fungos a 25°C por grama do produto. A média aritmética dos dados da Tabela 1 para bactérias lácticas mostra uma contagem global de 1.600/g no tanque de mistura; 600/g no trocador de calor, e para leveduras e fungos 97/g no tanque de mistura e 300/g no trocador de calor. Esses dados embora superiores aos de Magauda e Todaro podem ser considerados satisfatórios denotando não só uma linha eficiente de processamento como

também, uma higiene de produção. Confrontando, ainda, os dados de nosso trabalho e os padrões estabelecidos pelo Governo do Estado de São Paulo (Decreto nº 52.504 de 28 de julho de 1970) e CNNPA (12, 22), verifica-se que os padrões estabelecidos são muito superiores aos achados em nosso trabalho, pois permitem contagem de até 150.000/ml.

4.2. Características das leveduras do suco

Já nos primeiros ensaios com o suco de laranja, foi notado o crescimento de várias colônias com características visuais lembrando leveduras. Foram isoladas 100 colônias caracterizadas como leveduras pela morfologia da colônia e das células, e vinte destas foram testadas a fim de verificar-se sua capacidade de produzir diacetil. O resultado revelou que 25% eram positivas, 20% levemente positivas e o restante (55%) negativas. Este fato parece ser de grande importância para a indústria de sucos por causa da grande resistência destes microrganismos a pH baixo, Brix elevado e temperatura de congelação ; PATRICK e HILL (39) e INGRAN (26).

De acordo com APHA e GARRO e HERNANDEZ (2, 19), contagens elevadas de leveduras indicam possibilidade de fermentação do produto ou resíduos aderentes ao equipamento, constituindo-se, portanto, em uma fonte permanente de contaminação.

4.3. Características das bactérias lácticas do suco

4.3.1. Distribuição dos grupos

Os resultados do estudo preliminar das 400 colônias de bactérias lácticas isoladas nos diferentes pontos da linha de processamento do suco cítrico estão apresentados na Tabela abaixo:

Morfologia	Heterofermentativos	Homofermentativos	Total
Bastonetes	150 (37,5%)	70 (17,5%)	220 (55%)
Cocobacilos	30 (7,5%)	25 (6,25%)	55 (13,5%)
Cocos	80 (20%)	45 (11,25%)	*125 (31,25%)
Total	260 (65%)	140 (35%)	400 (100%)

* Dos 125 cocos, 25 (6,3%) eram em tétrades.

Todas as colônias examinadas apresentaram-se pequenas, puntiformes, esbranquiçadas com reação de catalase e benzidina negativas, Gram positivas e diâmetro da ordem de 0,7 a 0,9 μ . Algumas colônias apresentaram reação de catalase ligeiramente positiva mas todas eram benzidina negativas.

A tabela acima mostra que 65% eram heterofermentativas e 35%

homofermentativas, sendo que, 68,75% se enquadram como lactobacilos (bastonetes e cocobacilos), 31,25% como cocos (Leuconostoc, Streptococcus ou Pediococcus) e 6,3% como tétades. Estes dados concordam com a afirmação de CARR (7) quanto a raridade desses últimos em suco de cidra.

4.3.2. Espécies caracterizadas

Das 400 colônias isoladas, foram selecionadas 30, ao acaso, sendo 5 de cada um dos seguintes grupos morfológicos: bastonetes hetero e homofermentativos, cocobacilos hetero e homofermentativos, cocos hetero e homofermentativos.

Os resultados dos estudos morfológicos das 30 colônias e as determinações do diâmetro e comprimento das células selecionadas junto com a sua classificação conforme o Manual de BERGEY (6) estão apresentados na Tabela 3. O tamanho das células variou de 0,7 a 3,5 μ de comprimento e de 0,7 a 0,9 μ de largura. Para os cocos obteve-se um diâmetro de 0,7 a 0,9 μ . Para a determinação das espécies foram utilizados também os dados de fermentação de açúcares e utilização de amino ácidos e outras reações bioquímicas constantes da Tabela 4.

Através do estudo morfológico e bioquímico constatamos as seguintes espécies: Lactobacillus brevis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus delbrueckii, Leuconostoc dextranicum, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici e Pediococcus halophilus.

TABELA 3 - Estudo morfológico das 30 linhagens selecionadas em onze pontos de coleta.

Grupo de organismos	Linhagens	Locais de coleta	Espécie (a)	Morfologia das células		Morfologia das colônias em meio APT-efêlico	
				Diâmetro μ	Comprimento μ	Diâmetro μ	Descrição
BASTONETES HETEROFERMENTATIVOS	F - 9	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,9	2,25	1,5 - 3,0	esbranquiçadas, cinza claro, bordas lisas regulares
	DC-6	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,8	2,34	2,0 - 3,0	cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
	LC-27	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,9	2,25	2,0 - 3,0	esbranquiçadas-amareladas, bordas lisas arredondadas
	F - 46	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,8	3,0	1,5 - 3,0	esbranquiçadas, cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
BASTONETES HOMOFERMENTATIVOS	F - 12	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,8	3,15	1,0 - 1,5	esbranquiçadas-amareladas, bordas lisas arredondadas
	F - 29	"Finisher"	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,9	3,1	2,0 - 3,0	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	E - 5	Evaporador 39 estágio	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,8	2,55	1,5 - 2,8	brancas, semi-transparentes, bordas lisas regulares
	E - 2	Evaporador 49 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,9	3,2	1,0 - 2,0	esbranquiçadas, convexas, bordas lisas regulares
COCOS HETEROFERMENTATIVOS	E - 13	Evaporador 59 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,8	3,5	1,0 - 2,5	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	TR-17	Trocador de calor	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,7	2,5	1,0 - 1,5	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	F - 39	"Finisher"	<i>Leuconostoc dextranum</i>	0,7		1,0 - 3,0	esbranquiçadas, gomosas, bordas arredondadas lisas regulares
	F - 57	"Finisher"	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,8		2,0 - 3,0	esbranquiçadas, gomosas, bordas arredondadas lisas regulares
COCOS HOMOFERMENTATIVOS	DC-55	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc dextranum</i>	0,7		2,1 - 3,0	esbranquiçadas, gomosas, bordas arredondadas lisas regulares
	DC-34	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,8		2,0 - 2,8	esbranquiçadas, gomosas, bordas arredondadas lisas regulares
	TM-8	Tanque de mistura	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,7		2,0 - 3,0	esbranquiçadas, gomosas, bordas arredondadas lisas regulares
	DC-52	Depois da centrifuga	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,9		1,8 - 3,0	esbranquiçadas-amareladas, convexas, bordas lisas arredondadas
COCOS HOMOFERMENTATIVOS	E - 9	Evaporador 59 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0,8		1,5 - 3,0	esbranquiçadas, bordas regulares
	E - 12	Evaporador 69 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0,8		1,5 - 2,5	esbranquiçadas, outras brilhantes com bordas lisas regulares
	E - 14	Evaporador 69 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0,75		1,5 - 2,5	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	TR-15	Trocador de calor	<i>Pediococcus halophilus</i>	0,7		1,0 - 1,5	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
COCORACILOS HETEROFERMENTATIVOS	F - 2	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,8	2,5	1,0 - 2,0	cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
	DC-39	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,9	2,4	2,0 - 3,0	cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
	DC-54	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,9	2,1	2,0 - 2,5	cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
	F - 61	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,7	2,5	1,0 - 2,0	esbranquiçadas-amareladas, bordas lisas arredondadas
COCORACILOS HOMOFERMENTATIVOS	DC-38	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,9	2,5	2,0 - 3,0	cinza claro, convexas, bordas lisas regulares
	DC-53	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,9	3,0	2,1 - 2,8	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	DC-12	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0,7	2,4	2,0 - 2,8	esbranquiçadas, semi-transparentes, bordas lisas regulares
	DC-42	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,8	3,0	2,0 - 2,8	branco-amareladas, bordas lisas regulares
HOMOFERMENTATIVOS	E - 1	Evaporador 19 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,8	3,15	1,0 - 2,0	esbranquiçadas, bordas lisas regulares
	TR-23	Trocador de calor	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,8	3,2	1,0 - 2,5	esbranquiçadas, bordas lisas regulares

(a) Espécie com características próximas às do Manual de Bergey conforme a Tabela 4.

TABELA 4 - Reações bioquímicas das 30 linhagens de bactérias lácticas do suco de laranja.

Todas as culturas foram Gram positivas e catalase e benzidina negativas. As observações foram feitas ao fim de 48 horas com excessão da glicose e ácidos orgânicos que foram feitas durante 15 dias.

Linhagens	Locais de coleta	Espécie ^(a)	Gás da glicose ^(b)	Vermelho de metila ^(c)	Voges Proskauer	Amidalina	Arabinose	Celobiose	Dulcitol	Frutose	Glicose	Galactose	Glicerol	Gluconato	Insulina	Lactose	Maltose	Sorbitol	Manose	Melibiose	Melzitose	Rafinados orgânicos	Ácido málico	Ácido quínico	Ácido succínico
F - 9	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	4	+	+	-	+	-	-	+	+	(+) (s)	-	+	-	+	+	-(s)	-	+	-	+	+	-	-
DC- 6	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	3	+	+	+	+	-	-	+	+	(+) (s)	+	+	(+)	+	+	-(s)	-	+	-	+	+	-	-
DC-27	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
F -46	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	1	+	-	-	+	-	(+)	+	+	+	(+)	+	-	+	+	-(s)	-	+	-	+	+	-	-
F -12	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
F -29	"Finisher"	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	+	+	+	± (v)	+	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E - 5	Evaporador 39 estágio	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	+	+	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E - 2	Evaporador 49 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	+	++	+	+	+	-	+	+	+	(+)	+	(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E -13	Evaporador 59 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	++	++	+	+	+	-	+	+	+	(+)	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TR-17	Trocador de calor	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	+	+	-	-	-	(+)	+	+	± (s)	(+)	-	(+)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F -39	"Finisher"	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	3	+	+	-(v)	-	+(v)	-	+	+	+(v)	-	±	-	+	+	-(v)	+(v)	+(v)	-	+	+	-	-
F -57	"Finisher"	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	+	+	+(v)	+(v)	-(v)	-	+	+	+	-	±	-	± (v)	+	-(v)	+	+(v)	-	+	+	-	-
DC-55	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	2	+	+	± (v)	-	+(v)	-	+	+	+(v)	-	±	-	+	+	-(v)	+(v)	+(v)	-	+	+	-	-
DC-34	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	+	++	+(v)	+(v)	+(v)	(+)	+	+	+	(+)	-	(+)	± (v)	+	-(v)	+	+(v)	-	+	+	-	-
TM- 8	Tanque de mistura	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	+	++	± (v)	+	+(v)	-	+	+	+	-	-	-	± (v)	+	-(v)	+	+(v)	-	+	+	-	-
DC-52	Depois da centrifuga	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	±	+	(+)	-	-	+	±	-	+	+	-	-
E - 9	Evaporador 59 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0	++	++	-	+	+	-	+	+	+	-	±	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-
E -12	Evaporador 69 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0	+	+	±	+	+	(+)	+	+	+	-	±	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-
E -14	Evaporador 69 estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	±	+	+	-	-
TR-15	Trocador de calor	<i>Pediococcus halophilus</i>	0	+	+	(+)	+	+	-	+	+	+	-	±	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
F - 2	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	3	(+)	(+)	-	+	-	(+)	+	+	+(s)	+	+	(+)	+(s)	+	+(s)	-	+	-	+	+	-	-
DC-39	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	2	+	+	-	+	-	-	+	+	+(s)	-	+	-	± (s)	+	± (s)	-	+	-	+	+	-	-
DC-54	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	2	(+)	(+)	-	+	-	-	+	+	± (s)	-	+	-	± (s)	+	± (s)	-	+	-	+	+	-	-
F -61	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	++	+	+	-	+	-	+	+	+	(+)	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
DC-38	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	2	++	++	-	+	-	-	+	+	± (s)	-	+	-	± (s)	+	± (s)	-	+	-	+	+	-	-
DC-53	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	++	+	+	+(v)	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
DC-12	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	++	+	-	-	-	-	+	+	± (s)	(+)	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DC-42	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	(+)	(+)	+	+(v)	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E - 1	Evaporador 49 estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	+	+	+	± (v)	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
TR-23	Trocador de calor	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	+	+	+	± (v)	+	(+)	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(a) Espécies determinados de acordo com o Manual de Bergey (6).

(b) Produção de gás variando de intensidade: 0 = não houve produção de gás; 1 = leve produção de gás; 2 = coluna de gás até a metade do tubo; 3 = coluna alcançando mais da metade do tubo; 4 = coluna alcançando a parte superior do tubo.

(c) + = positiva; (+) = levemente positiva; - = negativa.

(s) Reação lenta.

(v) Reação que poderia ser variável segundo o Manual de Bergey (6).

Como mostra a Tabela 3, as características das colônias destas bactérias apresentaram variações de espécie para espécie. O tipo mais comum de colônia apresentava um diâmetro de 1 a 3 mm, de cor esbranquiçada, de superfície lisa, algumas com pigmentação amarela ou cinza claro, circulares com superfície plana, elevada com o centro mais branco quando comparado com as bordas que, às vezes, pareciam brancas translúcidas, e irregulares. As bordas variavam de regulares a irregulares.

No meio APT-sólido ocorreu a predominância das colônias brancas com bordas lisas regulares similares aquelas descritas no Manual de BERGEY (6). Em agar-sacarose, as colônias de Leuconostoc dextranicum apresentaram uma gomosidade menos intensa do que a maioria das colônias de Leuconostoc mesenteroides.

4.4. Testes bioquímicos

As provas bioquímicas referentes as 30 linhagens estudadas, encontram-se na Tabela 4.

4.4.1. Prova de vermelho de metila

Esta reação foi claramente positiva para quase todas as linhagens, excetuando-se as de número 52 (Pediococcus acidilactici) da centrífuga; 2 (Lactobacillus brevis) do "finisher"; 54 (Lactobacillus brevis) da centrífuga; e 42 (Lactobacillus plantarum) da centrífuga que foram apenas levemente positivas.

4.4.2. Voges Proskauer

A reação de Voges Proskauer foi positiva para quase todas as linhagens sendo levemente positiva para as do número 2 (Lactobacillus brevis) do "finisher"; 54 (Lactobacillus brevis) da centrífuga; 42 (Lactobacillus plantarum) da centrífuga e negativa para o número 46 (Lactobacillus brevis) do "finisher". Estes resultados do Lactobacillus brevis estão de acordo com o Manual de BERGEY (6), trabalhos de BERRY et al. (4), JUVEN (27) BARRETO citado por PATRICK e HILL (39).

4.4.3. Fermentação de carboidratos

A fermentação dos carboidratos foi bastante variável, com intensidades diferentes para as várias linhagens, conforme se pode verificar na Tabela 4. A sacarose e a frutose foram fermentadas por todas as linhagens, ao passo que, para outros açúcares estudados, houve fermentação para alguns e não para outros. Os resultados destes testes serviram de base para a classificação em espécies obedecendo às normas do Manual de BERGEY (6).

4.4.4. Produção do manitol

Os melhores resultados da produção do manitol foram obtidos utilizando os solventes (n-butanol: etanol: água) e (n-butanol: piridina: água) na cromatografia ascendente em papel e usando como revelador o nitrato de prata, hidróxido de potássio e água. To

das as linhagens heterofermentativas produziram manitol a partir da frutose, em contraste com as homofermentativas, que não produziram o manitol.

4.4.5. Redução de nitratos a nitritos

A redução do nitrato foi negativa para quase todas as linhagens, excetuando-se as do número 17 (Lactobacillus delbrueckii) do trocador de calor; 39 (Leuconostoc dextranicum) do "finisher"; 55 (Leuconostoc dextranicum) da centrífuga, e 9 (Pediococcus halophilus) do 5º estágio do concentrador.

4.4.6. Produção da amônia

A produção da amônia a partir da l-arginina foi positiva para a maioria das linhagens em bastonetes e cocobacilos heterofermentativos, e negativa para a maioria dos homofermentativos, resultado este que concorda com o Manual de BERGEY (6). No caso dos cocos, a maioria foi negativa para os heterofermentativos e negativa para os homofermentativos. Segundo GOMES-RUIZ (21), quase todas as heterofermentativas formam amônia a partir da arginina, o que não aconteceu com as linhagens por nós estudadas no caso dos cocos.

4.4.7. Tolerância a cloreto de sódio

Quase todas as linhagens cresceram bem em meio contendo cloreto de sódio a 5%, excetuando-se as do número 3 (Lactobacillus

delbrueckii) do 5º estágio do concentrador; 17 (Lactobacillus delbrueckii) do trocador de calor que cresceram pouco, e as dos números 12 e 61 (Lactobacillus acidophilus) do "finisher" que não cresceram no meio.

4.4.8. Desdobramento da esculina

Esta hidrólise foi positiva para 11 linhagens e negativa para 9 linhagens de bactérias em bastonetes. No caso de cocos todos foram negativos.

4.4.9. Metabolismo dos ácidos orgânicos

A fermentação dos ácidos orgânicos foi negativa para quase todas as linhagens excetuando-se a do número 17 (Lactobacillus delbrueckii) do trocador de calor, que foi positiva para os ácidos cítrico, málico e quínico.

4.5. Determinação do pH mínimo de crescimento das bactérias lácticas

O pH mínimo de crescimento para as 30 linhagens estudadas variou de menos de 2,5 até 3,0 com predominância de pH 3,0. A intensidade de crescimento foi representada medindo-se a absorvância dos tubos inoculados e os seus valores estão apresentados na Tabela 6 e Apêndice 2 (Tabelas de nºs 7 a 18).

TABELA 6 - Valores de pH mínimo de crescimento das 30 linhagens de bactérias lácticas i soladas da linha de processamento do suco cítrico.

Linhagens	Locais de coleta	Espécie	pH mínimo
F - 9	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,0
DC- 6	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	<2,5
DC-27	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<2,5
F -46	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,0
F -12	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<2,5
F -29	"Finisher"	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0
E - 5	Evaporador 3º estágio	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3,0
E - 2	Evaporador 4º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<2,5
E -13	Evaporador 5º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0
TR-17	Trocador de calor	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<2,5
F -39	"Finisher"	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	3,0
F -57	"Finisher"	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3,0
DC-55	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	3,0
DC-34	Depois da centrifuga	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3,0
TM- 8	Tanque de mistura	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3,0
DC-52	Depois da centrifuga	<i>Pedococcus acidilactici</i>	<2,5
E - 9	Evaporador 5º estágio	<i>Pedococcus halophilus</i>	<2,5
E -12	Evaporador 6º estágio	<i>Pedococcus halophilus</i>	<2,5
E -14	Evaporador 6º estágio	<i>Pedococcus halophilus</i>	<2,5
TR-15	Trocador de calor	<i>Pedococcus halophilus</i>	<2,5
F - 2	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	<2,5
DC-39	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,0
DC-54	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,0
F -61	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,0
DC-38	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	3,5
DC-53	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<2,5
DC-12	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3,0
DC-42	Depois da centrifuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0
E - 1	Evaporador 1º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<2,5
TR-23	Trocador de calor	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<2,5

4.6. Determinação dos ácidos totais e voláteis

Damos a seguir o quadro mostrando o resultado da percentagem de ácidos voláteis.

Linhagens	Locais de coleta	Espécie	%
F - 9	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	30,0
DC- 6	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	25,0
DC-27	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20,0
F -46	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	10,0
F -12	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	20,0
F -39	"Finisher"	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	25,0
F -57	"Finisher"	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	22,5
DC-55	Depois da centrífuga	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	20,0
DC-34	Depois da centrífuga	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	23,5
TM- 8	Tanque de mistura	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	20,0
F - 2	"Finisher"	<i>Lactobacillus brevis</i>	24,5
DC-39	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	18,0
DC-54	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	19,0
F -61	"Finisher"	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	18,0
DC-38	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus brevis</i>	14,0
DC-53	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	9,0
DC-12	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7,0
DC-42	Depois da centrífuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8,0
E - 1	Evaporador 4º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8,0
TR-23	Trocador de calor	<i>Lactobacillus plantarum</i>	7,5
F -29	"Finisher"	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8,0
E - 5	Evaporador 3º estágio	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7,5
E - 2	Evaporador 4º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	7,0
E -13	Evaporador 5º estágio	<i>Lactobacillus plantarum</i>	6,8
TR-17	Trocador de calor	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	7,0
DC-52	Depois da centrífuga	<i>Pediococcus acidilactici</i>	7,0
E - 9	Evaporador 5º estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	6,5
E -12	Evaporador 6º estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	6,8
E -14	Evaporador 6º estágio	<i>Pediococcus halophilus</i>	6,5
TR-15	Trocador de calor	<i>Pediococcus halophilus</i>	6,8

4.7. Confirmação das características hetero e homofermentativas

Os resultados dos testes mostraram uma percentagem superior a 10% de ácidos voláteis para as linhagens F-9; DC-6; DC-27; - F-46; F-12; F-39; F-57; DC-55; DC-34; TM-8; F-2; DC-39; DC-54; F-61; DC-38 e uma percentagem inferior para as demais. Esses limites foram recomendados por CARR (7), para diferenciar as bactérias lácticas em homo e heterofermentativas. Tais resultados confirmam os testes preliminares de avaliação de produção do CO_2 de glicose e produção de manitol a partir de frutose (ver Tabela 4).

4.8. Crescimento em diferentes temperaturas

Pelo uso de incubador de temperatura gradiente ajustado no intervalo 20° a 60°C com espaços de 1° a 2°C , determinou-se a temperatura ótima e máxima para o desenvolvimento de 12 das 30 linhagens estudadas. Os resultados obtidos evidenciaram uma temperatura ótima localizada na faixa de 29° a $37,4^\circ\text{C}$ e uma máxima compreendida numa faixa de 40° a $44,5^\circ\text{C}$ (Tabela 5). Os valores da temperatura característica (μ) variaram de 3,8 a 14,9 kcal/mol. As figuras dos gráficos de Arrhenius para essas linhagens estão apresentadas no Apêndice 1 (Figuras de 5 a 16).

BELA 5 - Características das 12 linhagens de bactérias lácticas quanto a temperatura de incubação.

linhagens	Caracterização	Temperatura ótima °C	Temperatura máxima de crescimento °C	Temperatura característica kcal/mol
DC-12	Cocobacilo homofermentativo	34,7	40	12,8
DC-53	Cocobacilo homofermentativo	32,1	40	6,9
F -61	Cocobacilo heterofermentativo	31,4	40	8,2
F - 2	Cocobacilo heterofermentativo	30,4	39	10,6
TR-15	Coco homofermentativo	29,0	40	3,8
DC-52	Coco homofermentativo	37,4	44,5	12,6
F -57	Coco heterofermentativo	32,0	44,5	6,7
F -39	Coco heterofermentativo	32,2	40	4,9
TR-17	Bastonete homofermentativo	36,3	44,5	14,9
F -29	Bastonete homofermentativo	29,1	39	8,0
DC- 6	Bastonete heterofermentativo	35,0	44,5	13,7
F -12	Bastonete heterofermentativo	36,7	44,5	10,9

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo nos foi possível tirar as conclusões que se seguem:

1. A média logarítmica máxima de contagem de bactérias lácticas por grama do suco cítrico foi de 5,51 no "finisher" e de 5,70 na centrífuga; e aquela de leveduras, foi de 5,40 no "finisher" e 5,07 na centrífuga.
2. A pasteurização destruiu virtualmente todos os microrga -
nismos presentes no suco de laranja.
3. A média logarítmica máxima de contaminação do suco cítrico por bactéria láctica no produto acabado foi de 3,65 no tanque de mistura e 3,20 no trocador de calor; e aquela por fungos e leveduras foi de 2,30 no tanque de mistura e 2,79 no trocador de calor.
4. A maioria das leveduras presentes (55%) no suco não produziu diacetil.
5. A maioria das bactérias lácticas presentes no suco foi heterofermentativa (65%) e com predominância de células em bastonetes (55%).
6. Foram detectadas 8 espécies de bactérias lácticas dentre os gêneros Lactobacillus, Leuconostoc e Pediococcus. Não foi detectada nenhuma espécie de Streptococcus.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. "Chemistry and technology of citrus, citrus products, and sub-products". Agri - cultural Handbook 98, USDA, Washington, p. 45-48, 1962.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "Recommended methods for the microbiological examination of foods". APHA, New York, 1958.
3. BARKAI, R.R. and AHAROMI, Y. The sensititivity of food spoilage yeasts to acetaldehyde vapors. J. Food Sci. 41(3): 717-718, 1976.
4. BERRY, M.J., WITTER, J.D. and FOLLINAZZO, J.F. Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice and concentrate. Food Technol. 10(6): 553-555, 1956.
5. BEECH, F.W. Microbiological control and cider making: 11 Long Ashton Agr. Hort. Res. Sta. Univ. Bristol. Annu Rep. 239-245. Illus. 1966 Apud: Biol. Absts. 50 (13): 6869, 1969.
6. BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. "Bergey's manual of de terminative bacteriology". 8^a Ed. Williams and Wilkins Baltimore, Md. p. 490-515 e 576-590, 1974.
7. CARR, J.G. Tetrad-forming Cocci in ciders. J. Appl. Bac teriol. 33(1): 371-379, 1970.

8. CARR, J.G. Occurrence and activity of some lactic acid bacteria from apple juice, ciders and berries. J.Inst. Brewing 63: 436, 1957.
9. CARR, J.G. Homofermentative Lactobacilli of ciders including Lactobacillus mali nov. spec. J. Appl. Bacteriol. 33(1): 768-774, 1970.
10. COSTER, D.R.A. Spore-formers in concentrated citrus juice. Voeding en Techniek, 2(27): 708, 1968. Apud: Food Sci. Technol. Absts. 1(1): 39, 1969.
11. COSTER, D.R.A. and MAK, C. Bacteriological examination of citrus juice. Voeding en Techniek, 3(14): 310-311, 1969. Apud: Food Sci. Technol. Absts. 1(7): 793, 1969.
12. CNNPA - COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução nº 34 de setembro de 1977. Sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas (d). D.O.U. de 07/11/1977.
13. CRANSTON, P.M. and CALVER, J.H. Quantitative fluorescence microscopy of yeasts in beverages. Food Technol. Australia 26(1): 15-17, 1974.
14. DIFCO SUPPLEMENTARY LITERATURE. Difco Laboratories, Detroit, Md. p. 203, 1972.
15. DJIEN, K.S., SAHTOE, J. and PILMIK, W. Combined effects of heat treatment and preservatives on yeasts in fruit

- juices III. Sodium benzoate in orange juice, Confructa 19(6): 306-309, 1974. Apud: Food Sci. and Technol. Absts. 8(5): 63, 1976:
16. F.M.C. CORPORATION. Procedures for analyses of citrus juices. F.M.C. Corporation, Lakeland, Florida, p. 23, 1964.
17. FOSTER, M.E., NELSON, F.E., SPECK, M.L., DOESTSCH, R.N. and OLSON, J.C. "Dairy microbiology". Prentice-Hall, Englewood Cliffs, p. 16-19, 1957.
18. GARRO, R. and HERNANDEZ, E. Elimination interferences in the determination of diacetyl in orange juice. Rev. - Inst. Agroquímica y Technol. Alimentos 14(1): 144-149 , 1974.
19. GARRO, R. and HERNANDEZ, R. Control de la contamination microbiológica de los zumos de naranja durante su fabricación. Rev. Inst. Agroquímica y Technol. Alimentos. 14(3): 416-429, 1974.
20. GENTH, H. Is hygiene necessary in the beverage Industry? Flüssiges Obst. 43(9): 351-354, 1976. Apud: Food Sci. Technol. Absts. 9(5): 73-74, 1977.
21. GOMEZ-RUIZ, J. "Microbiologia de alimentos". Tese (Titular) apresentada a Facultad de Farmacia, Univ. Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, p. 256-269, 1974.

22. GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Normas especiais relativas a alimentos e bebidas. Decreto nº 52.504 de 28 de julho de 1970.
23. HARRIGAN, W.I. and McCANCE, M.E. "Laboratory methods in microbiology". Academic Press, London, p. 34, 262 e 305, 1968.
24. HAUSLER Jr., W.J. Standard methods for the examination of dairy products. 13^a Ed. APHA, Washington, D.C. - 1974.
25. HOUGH, L. Application of paper partition chromatography to the separation of polyhydric alcohols. Nature, London 165: 400, 1950.
26. INGRAN, M. Fermentation of concentrated orange juice. Food manufacture 24: 77-81 e 121-124, 1949.
27. JUVEN, B.J. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. J. Milk Food Technol. 39(12): 819-822, 1976.
28. KREBS, K.G., HEUSSER, D. and WIMMER, H. Spray reagents . In Stahl, E., Ed. "Thin-layer chromatography" 2^a Ed. Springer-Verlag, New York, N.Y. p. 889, 1969.
29. KOCOT, M. Viruses in Food Medycina Weterynaryjna 27(3): 171-1373, 1971. Apud: Food Sci. Technol. Absts. 6(4): 14, 1974.

30. LAMANNA, C. and MALLETT, M.F. Basic Bacteriology. 3^a
Ed. Williams and Wilkins, Baltimores, Md. p. 777-778,
1965.
31. LEWIS, B.A. and SMITH, F. Sugars and derivatives. In
STAHL, E., Ed. "Thin layer chromatography" 2^a Ed. -
Springer-Verlag, New York, N.Y. p. 834, 1969.
32. MAGAUDA, P.L. and TODARO, F. Standards microbiologici
di qualità per il controllo della produzione dei
succhi di agrumi. Congresso Internazionale di Agrumi
coltura, l., Murcia, 29 Apr. - 10 Maggio 1973. Essen
ze-Derivati Agrumari 43(4): 337-370, 1973.
33. MURDOCK, D.I. and HATCHER Jr., W.S. Growth of the mi-
croorganisms in chilled orange juice. J. Milk Food
Technol. 38(8): 393-396, 1975.
34. MURDOCK, D.I. Review of time check data showing bacte-
rial contamination in processing frozen orange concen-
trated. Proc. Florida State Hort. Soc. 82: 251-254 ,
1969.
35. MURDOCK, D.I. Sanitation problems in the production of
frozen citrus concentrate. J. Milk Food Technol. 31
(8): 245-250, 1969.
36. MURDOCK, D.I. and HATCHER Jr., W.S. Plate loop method
for determining total viable counts of orange juice.
J. Milk Food Technol. 39(7): 470-473, 1976.

37. OWEN, W.L. Microbiology of sugar manufacture and refining In SPENCER, G.L. e MEAD, G.P. "A manual for cane sugar manufactures and the chemists". 9th Ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. p. 307-308, 1963.
38. PATON; A.M. and JONES, S.M. The observation and enumeration of microorganisms in fluids using membrane filtration and incident fluorescence microscopy. J. Appl. Bacteriol. 38(2): 199-200, 1975.
39. PATRICK, R. and HILL, E.C. "Microbiology of citrus fruit processing". Agricultural Experiment Station, Bull. 618, p. 1-56. University of Florida, Gainesville, Fla. 1969.
40. PITT, J.I. Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. Food Technol. Australia 26(6): 238-239 e 241, 1974.
41. PUTT, H.M.C., JONG, J., SAND, F.E.M.J. and GRINSVEN, A. M.VAN. Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks. J. Appl. Bacteriol. 40(2) : 135-152, 1976.
42. SHARF, J.M. "Recommende Methods for the microbiological examination of Foods". 2^a Ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1966.
43. SKERMAN, V.B.D. "Abstracts of microbiological methods". Wiley Interscience, New York, N.Y., p. 37, 1969.

44. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. "Manual of micro - biological methods". McGraw Hill, New York, N.Y., p. 16, 1957.
45. SVORCOVA, L. Propagation of psychrophilic and mucoid microorganism in sweetened non-alcoholic beverages. Kvasny Prumysl 20(2): 35-41, 1974. Apud: Food Sci. and Technol. Absts. 6(12): 72, 1974.
46. TAYLON, M.I. and ACHANZAR, D. Catalase test and an aid to the identification of enterobacteriaceae. Appl. Microbiol. 24: 58-61, 1962.
47. TURTURA, G.C. and SAMAJA, T. Alterations caused by yeasts in soft drinks based on natural flavouring agents, and the possibility of their prevention. Industria delle Bevande 4(6): 75-79, 1975.
48. UNDERKOFER, L.A. and HICKEY, R.J. "Industrial fermentations". Chemical Publishing, New York, N.Y. v. 2, p. 423, 459 e 460, 1954.
49. VAUGHN, R.H. and MURDOCK, D.I. Sanitary significance of microorganisms in frozen citrus products. Am. J. Public Health 46(7): 886-894, 1956.
50. WEBEROVA, M., POLSTER, M. and HUNKOVA, M. Inhibitory effect of Persteril and Dekapex on Leuconostoc mesenteroides in sweetened mineral waters. Prumysl Potravin 23(9): 270-271, 1972. Apud: Food Sci. and Technol

Absts. 5(1): 75, 1973.

51. WEISSMAN, S. and RAPS, R. Control of microbial spoilage of frozen concentrated orange juice conference. Proceeding 4th Intern. Congress of Food Sci. and Technol. 4b: 45-47, 1974. Apud: Food Sci. and Technol. Absts. 7(4): 61, 1975.
52. WILSON, G.S. and MILLES, A.A. Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 3^a Ed. Edward and Arnold, London, p. 750, 1948.
53. ZANGELMI, A.C.B., SGARBIERI, V.C., MENESES, T.J.B. e GAR^URUTTI, R. Comportamento do suco de laranja (variedade baianinha) quando industrializado. Rev. Bras. de Tecnol. 2, 31-39, 1971.

7. APÊNDICES

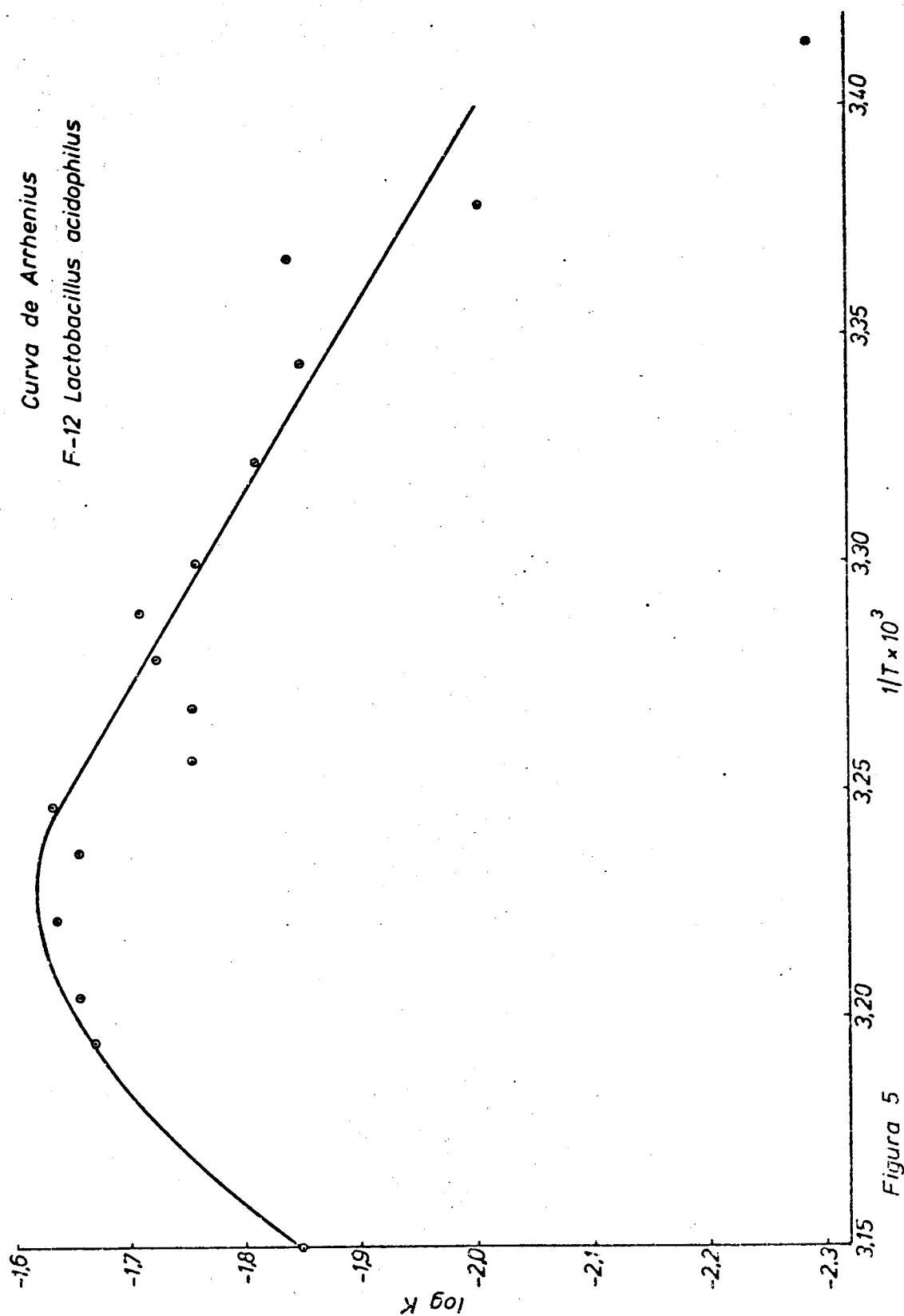


Figura 5

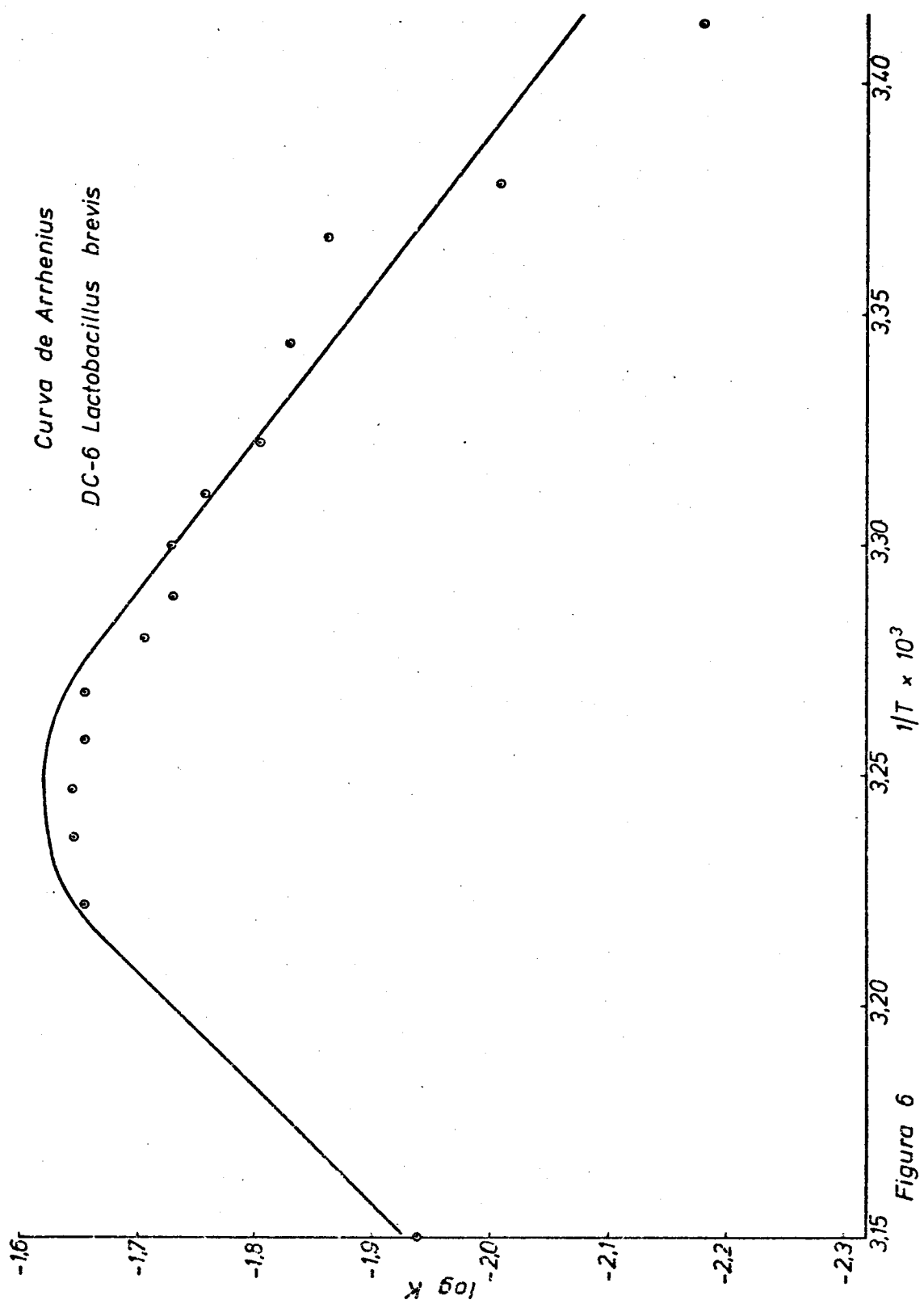


Figura 6

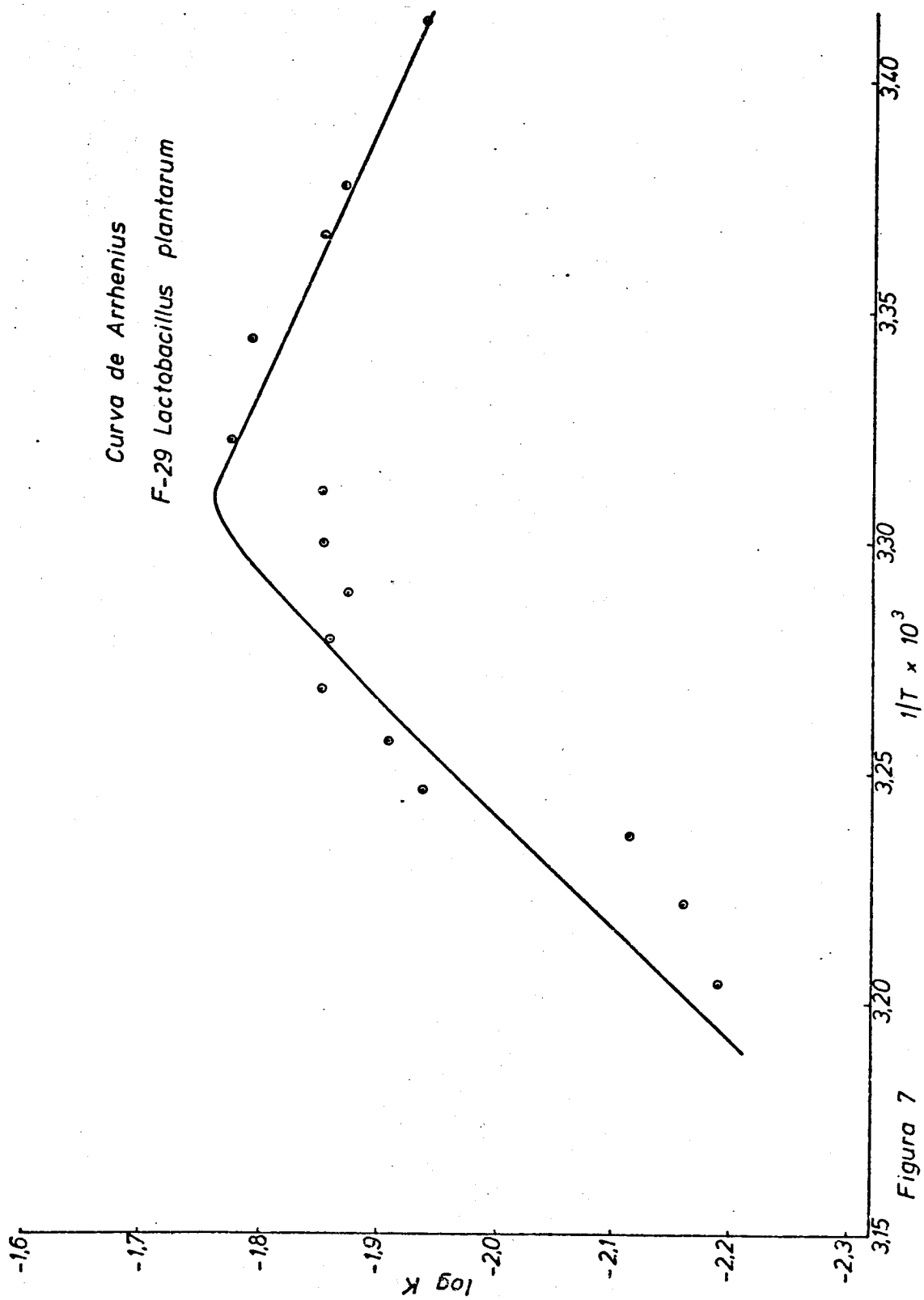


Figura 7

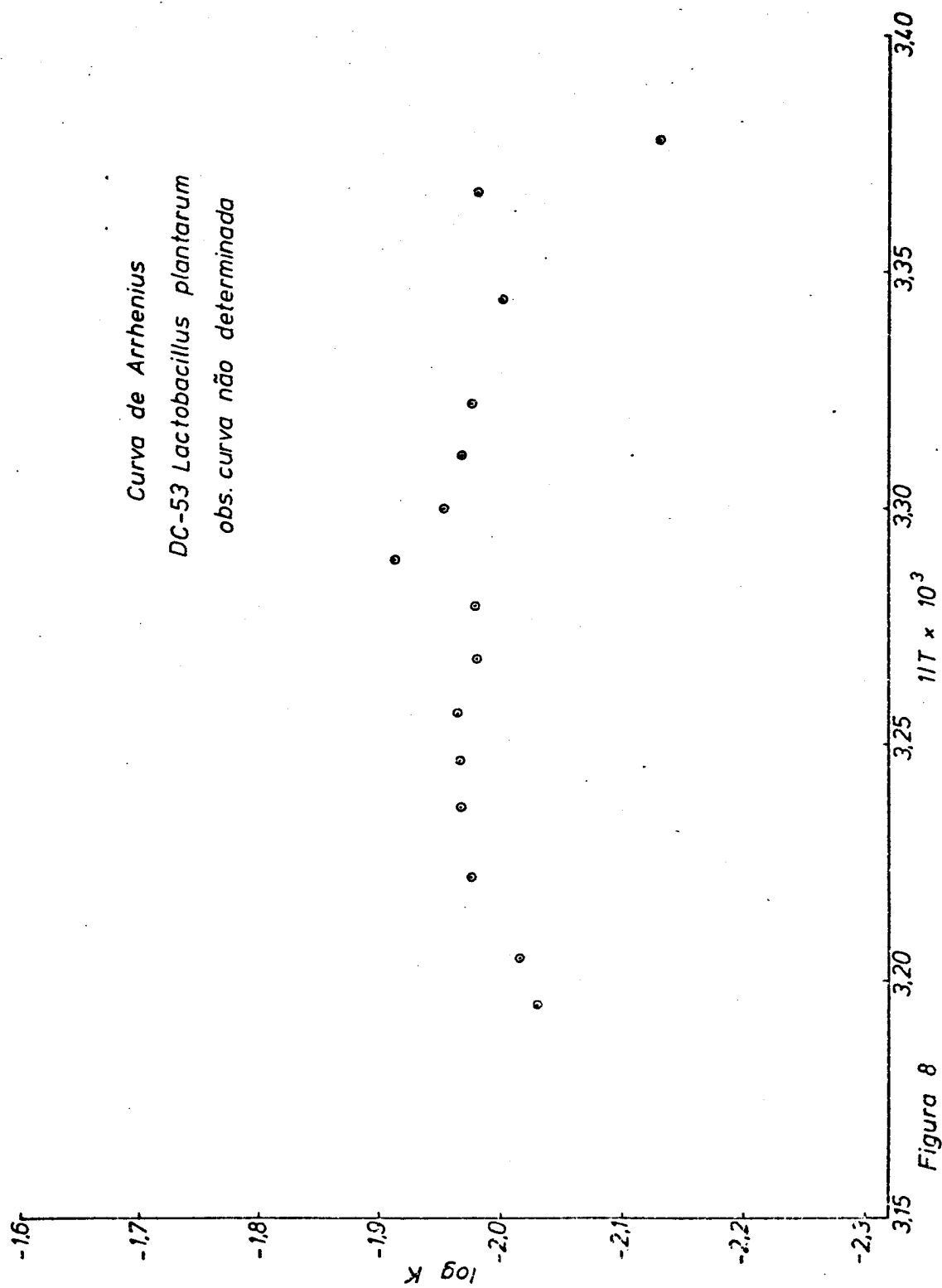


Figura 8

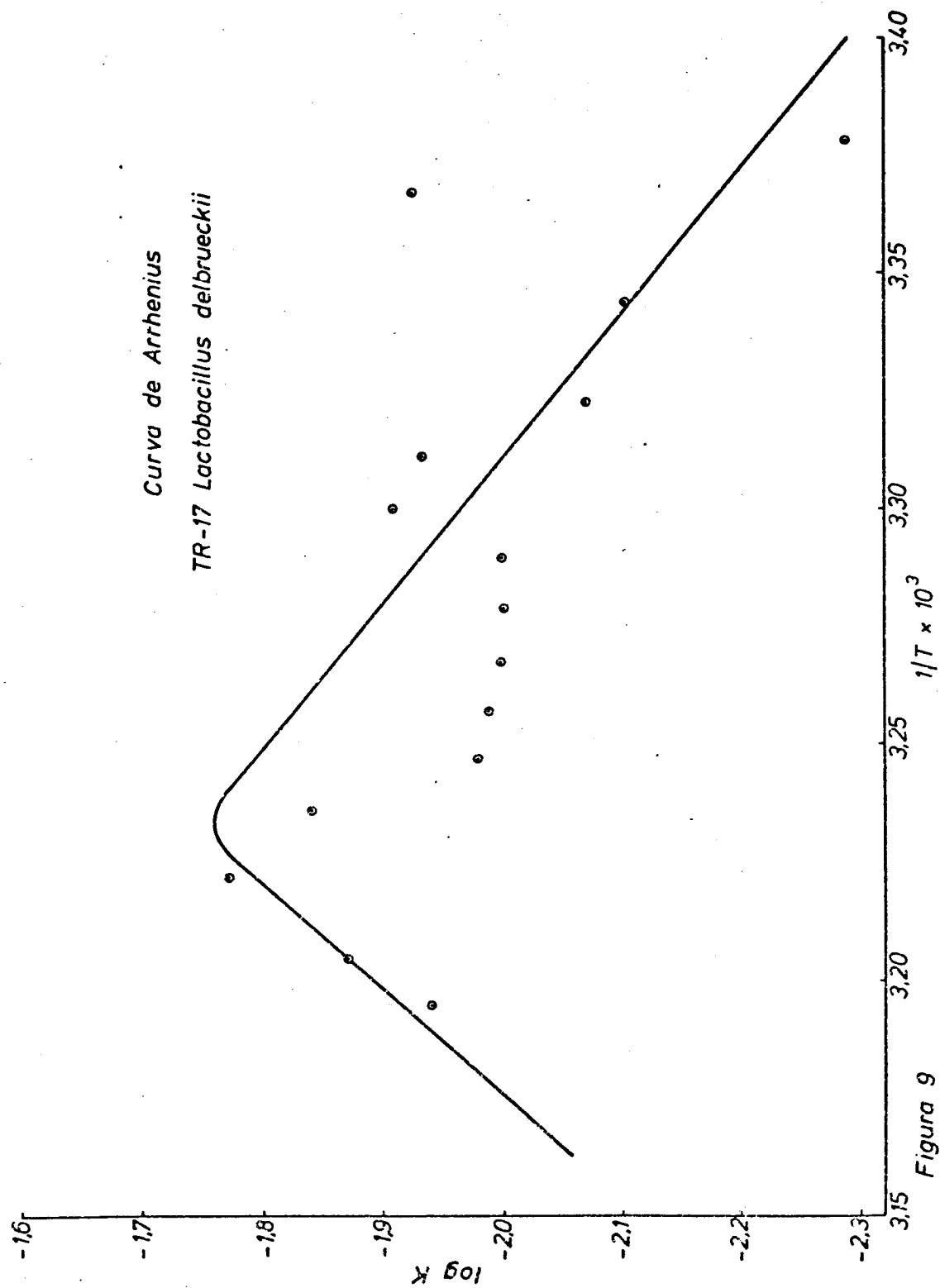


Figura 9

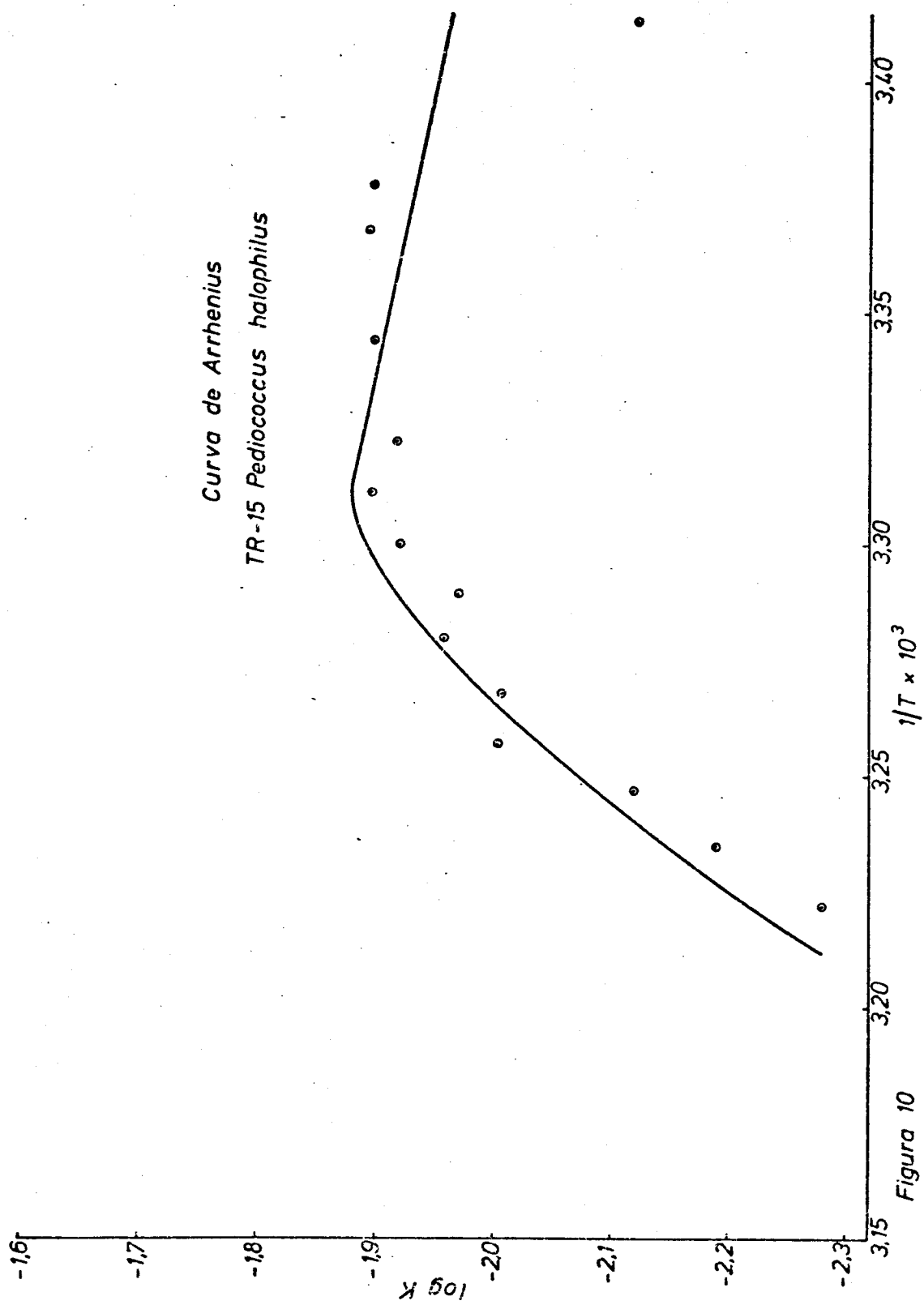


Figura 10

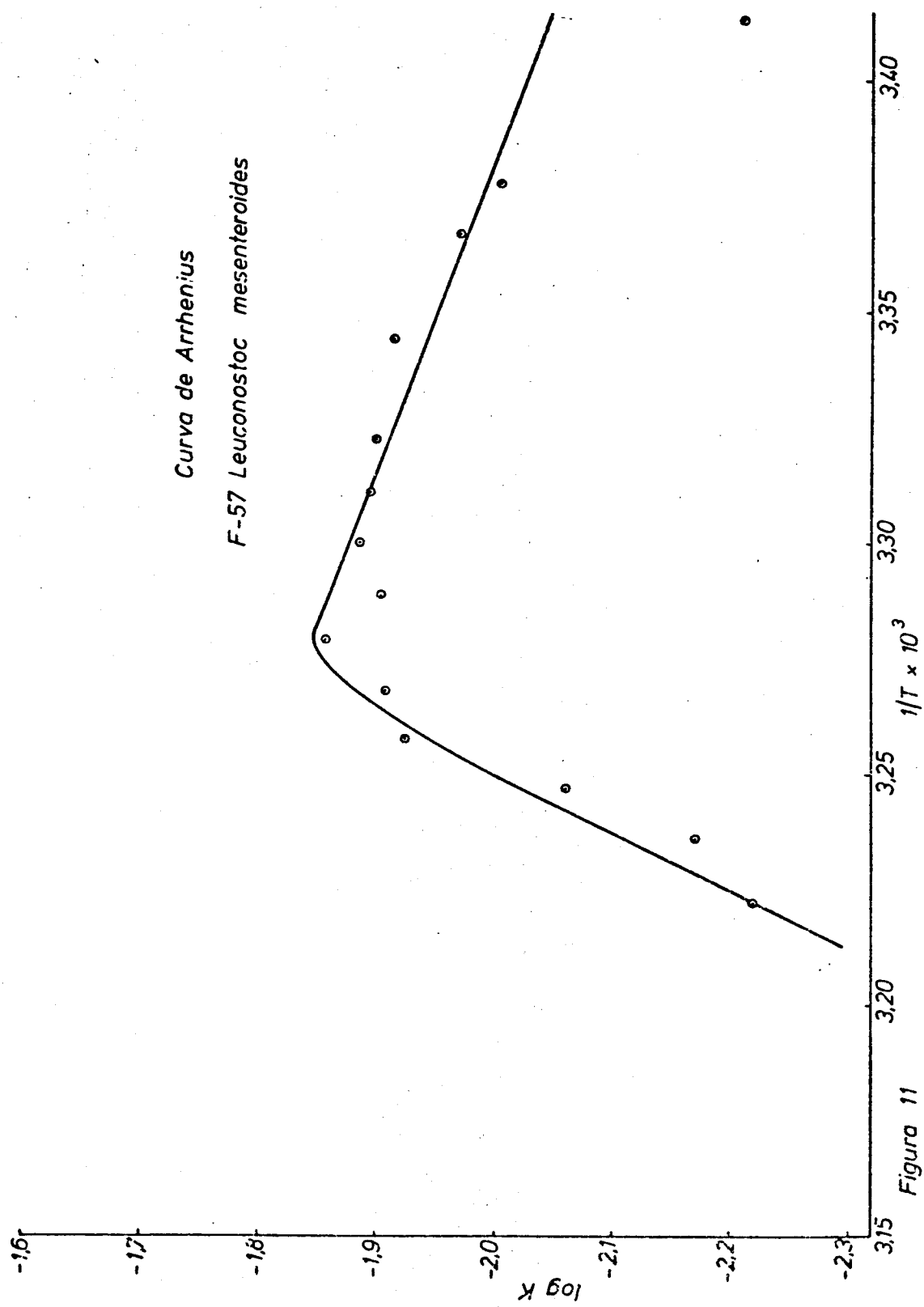


Figura 11

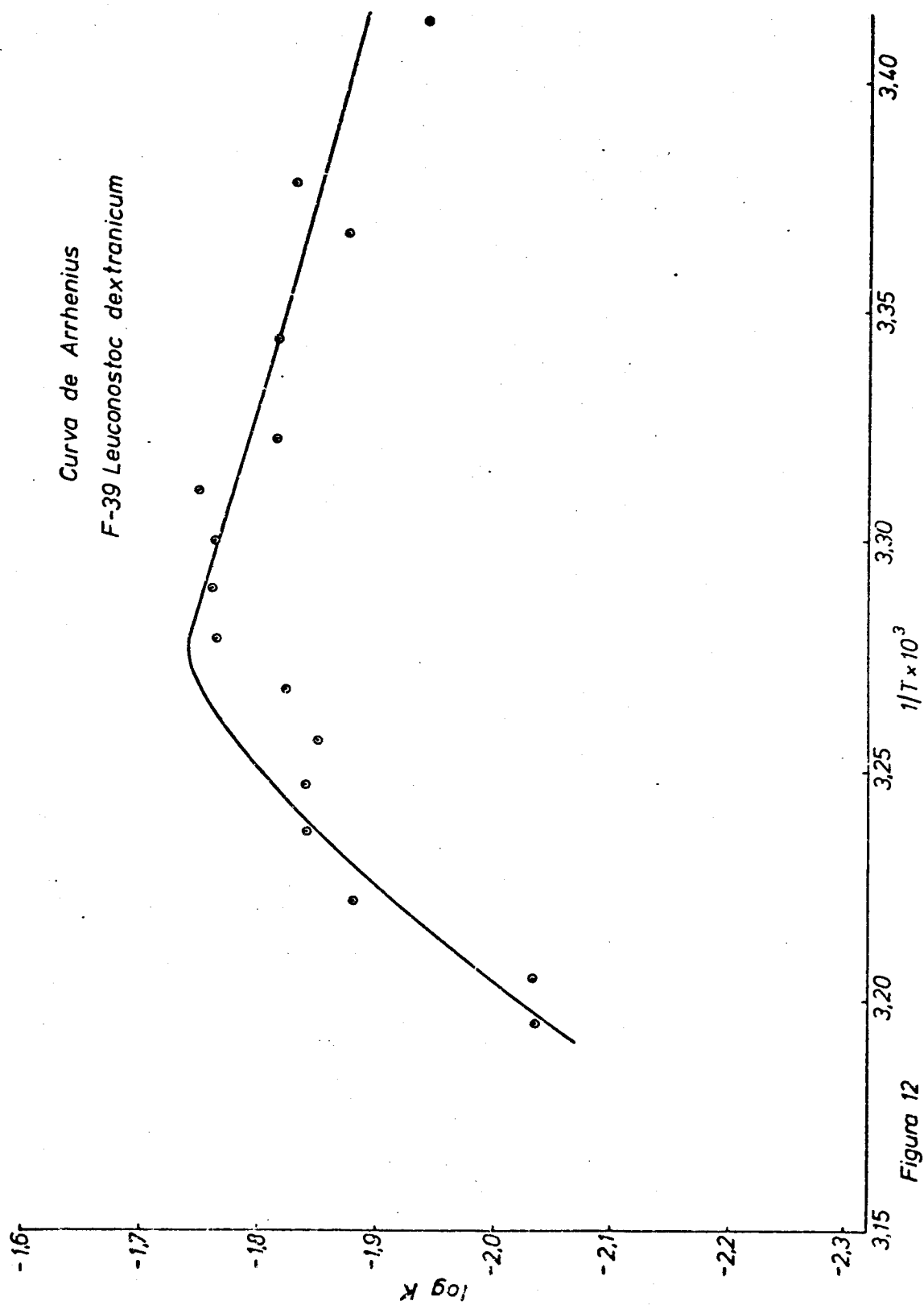


Figura 12

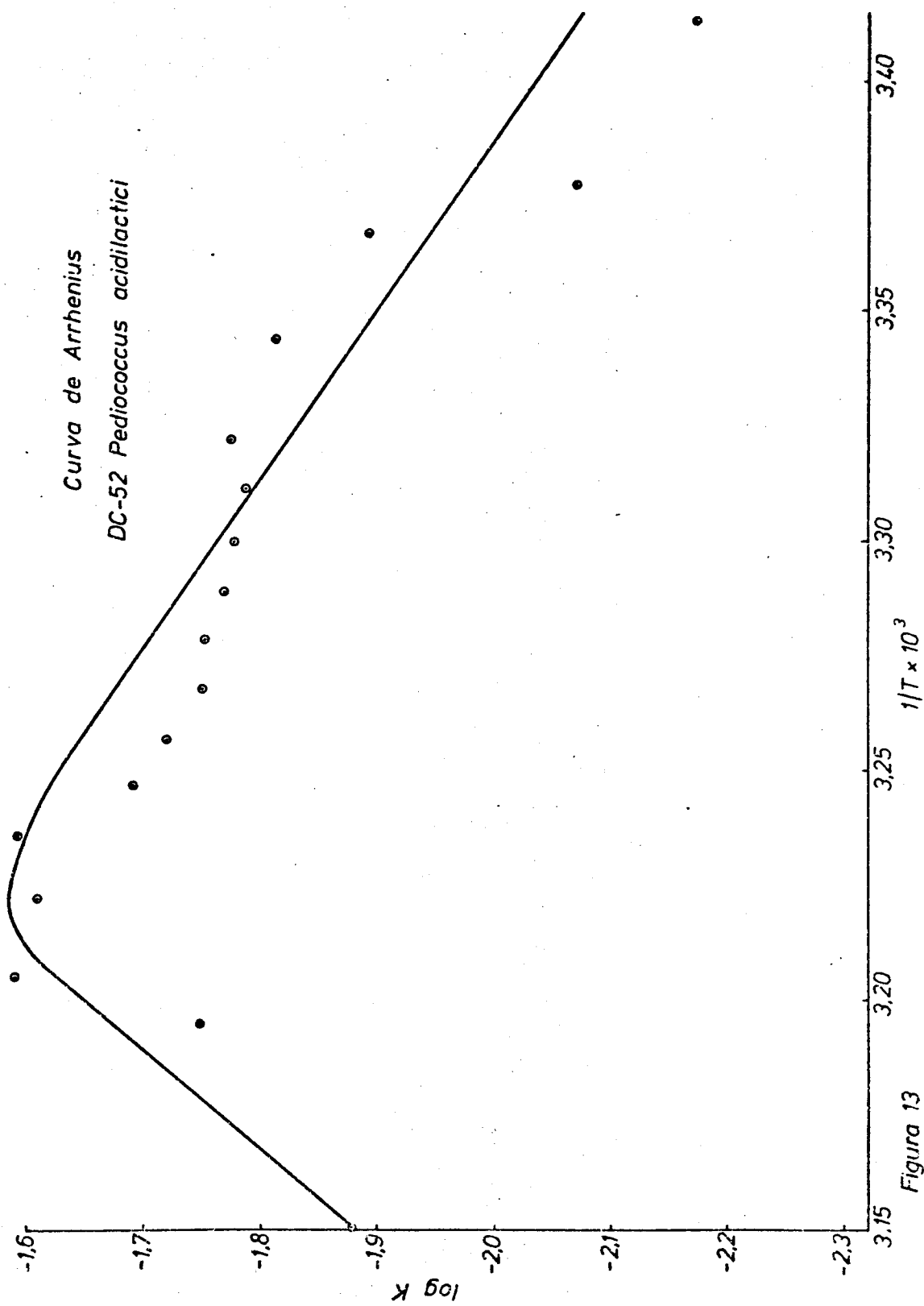


Figura 13

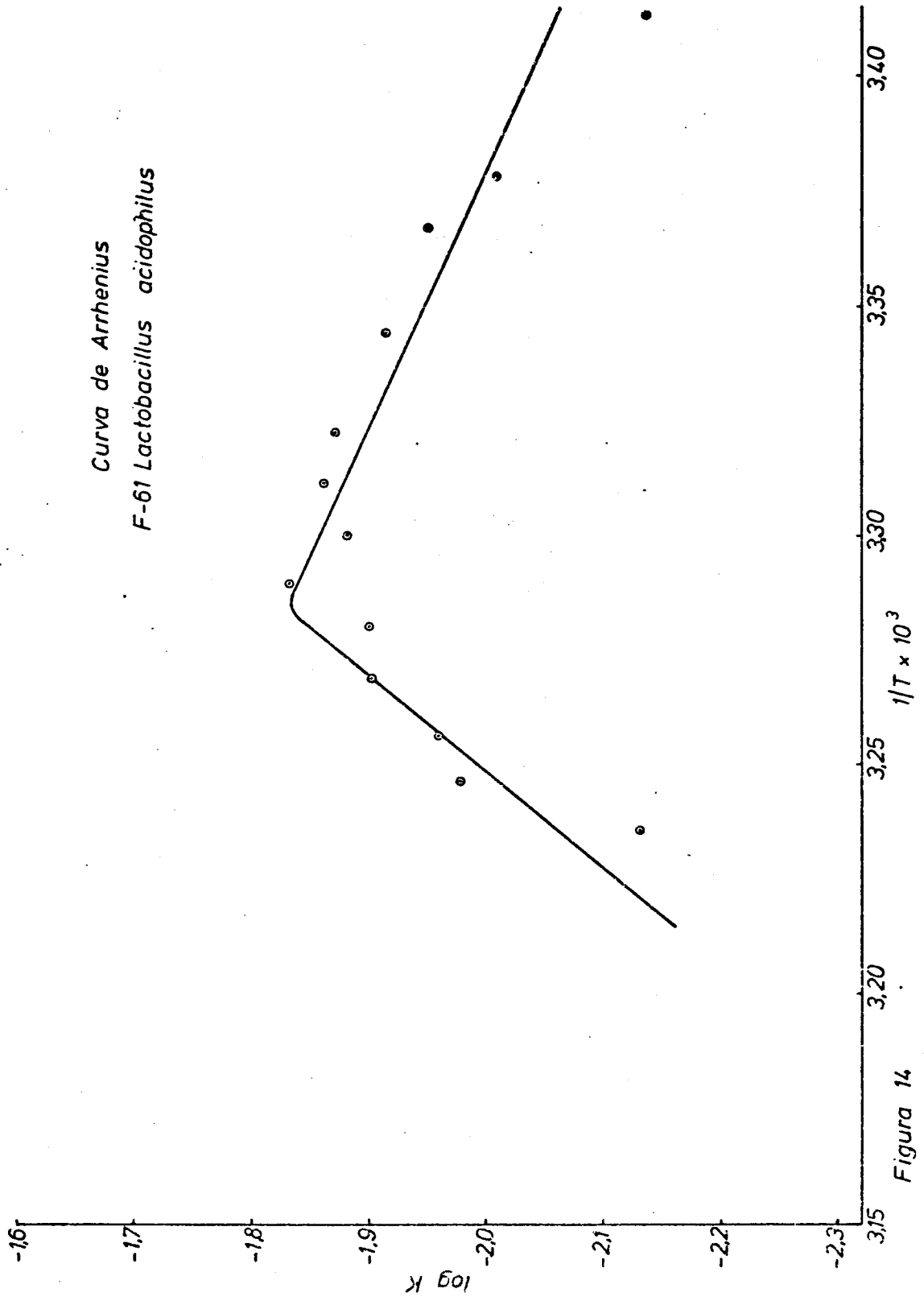


Figura 14

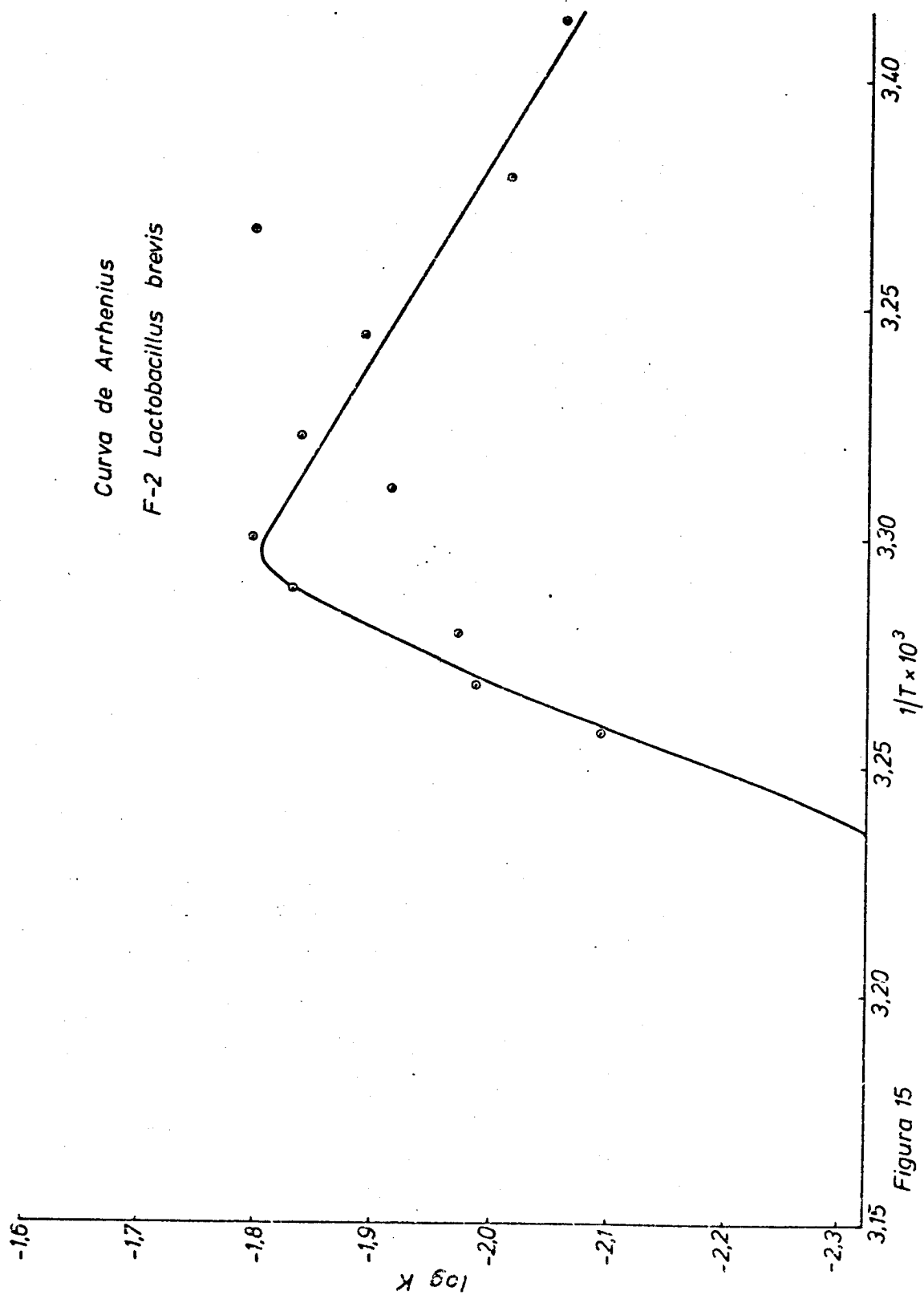


Figura 15

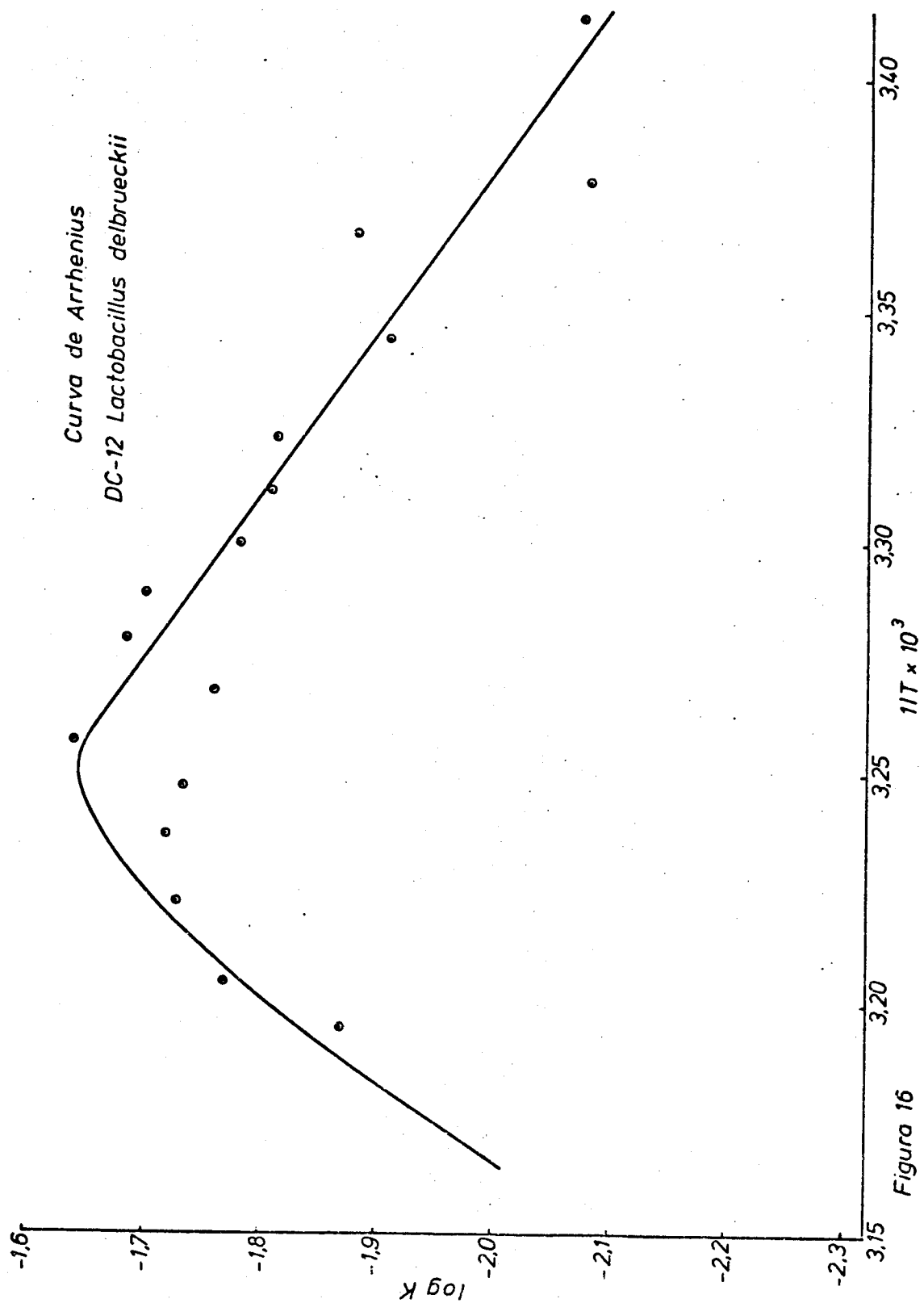


Figura 16

TABELA 7 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 2,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	
F-12	0,05	0,07	0,08	0,09	0,08	0,14	0,19	0,22	0,30	0,28	+
F-9	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,00	-
F-2	0,09	0,12	0,13	0,13	0,15	0,18	0,26	0,31	0,39	0,45	++
F-61	0,03	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06	0,09	0,06	-
F-14	0,05	0,06	0,11	0,12	0,15	0,19	0,38	0,42	0,52	0,62	++
F-46	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	-
F-39	0,04	0,06	0,07	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,06	-
F-29	0,03	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,03	0,06	0,03	-
TR-17	0,02	0,06	0,07	0,06	0,04	0,09	0,15	0,17	0,22	0,30	+
E-5	0,02	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06	0,08	0,08	0,10	0,08	-
E-12	0,08	0,12	0,14	0,14	0,18	0,23	0,38	0,43	0,54	0,58	++
E-9	0,08	0,11	0,14	0,14	0,16	0,18	0,27	0,30	0,37	0,41	+
TR-15	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,13	0,15	0,18	0,20	+
DC-52	0,06	0,09	0,10	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,13	+
E-13	0,08	0,10	0,10	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07	-
E-2	0,01	0,03	0,06	0,06	0,07	0,10	0,14	0,15	0,16	0,16	+
TM-8	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,05	0,04	0,10	0,11	-
DC-55	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,05	-
F-57	0,03	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	-
DC-34	0,05	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	-
DC-6	0,08	0,10	0,12	0,11	0,12	0,19	0,29	0,30	0,35	0,35	+
DC-39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-
DC-27	0,03	0,06	0,08	0,09	0,09	0,10	0,18	0,19	0,22	0,21	+
DC-38	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	0,14	0,12	0,13	0,11	+
DC-53	0,02	0,06	0,08	0,08	0,08	0,14	0,29	0,29	0,34	0,40	+
DC-12	0,02	0,07	0,07	0,07	0,08	0,10	0,12	0,13	0,15	0,10	+
DC-42	0,04	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	-
TR-23	0,08	0,12	0,13	0,14	0,15	0,18	0,30	0,35	0,45	0,48	++
E-1	0,14	0,18	0,20	0,22	0,23	0,24	0,40	0,40	0,54	0,52	++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 8 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 3,0.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	
F-12	0,10	0,10	0,10	0,13	0,18	0,22	0,32	0,35	0,40	0,58	++
F-9	0,02	0,02	0,08	0,10	0,20	0,30	0,48	0,70	0,80	0,75	++
F-2	0,15	0,16	0,18	0,24	0,28	0,45	0,66	0,75	0,83	0,90	+++
F-61	0,01	0,03	0,04	0,045	0,07	0,09	0,15	0,28	0,54	0,75	++
E-14	0,04	0,09	0,12	0,16	0,20	0,34	0,57	0,64	0,80	0,80	++
F-46	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,13	0,15	0,46	0,85	0,85	+++
F-39	0,01	0,02	0,04	0,05	0,08	0,10	0,17	0,35	0,62	0,90	+++
F-29	0,05	0,07	0,07	0,08	0,12	0,11	0,13	0,20	0,50	0,75	++
TR-17	0,03	0,04	0,09	0,14	0,20	0,60	0,74	0,75	0,75	0,70	++
E-5	0,01	0,01	0,02	0,03	0,07	0,14	0,66	0,70	0,70	0,62	++
E-12	0,05	0,07	0,10	0,13	0,20	0,35	0,61	0,66	0,75	0,85	+++
E-9	0,10	0,14	0,17	0,21	0,28	0,45	0,69	0,75	0,78	0,90	+++
TR-15	0,05	0,07	0,09	0,11	0,16	0,22	0,51	0,60	0,64	0,70	++
DC-52	0,05	0,06	0,09	0,11	0,17	0,26	0,49	0,58	0,64	0,68	++
E-13	0,01	0,02	0,05	0,06	0,11	0,15	0,17	0,26	0,46	0,70	++
E-2	0,05	0,08	0,10	0,12	0,18	0,32	0,55	0,62	0,70	0,80	++
TM-8	0,01	0,03	0,03	0,05	0,07	0,10	0,23	0,38	0,60	0,80	++
DC-55	0,01	0,01	0,03	0,04	0,09	0,09	0,27	0,41	0,52	0,64	++
F-57	0,02	0,04	0,04	0,06	0,11	0,08	0,03	0,11	0,12	0,14	+
DC-34	0,01	0,02	0,04	0,06	0,10	0,25	0,35	0,36	0,40	0,50	++
DC-6	0,09	0,10	0,11	0,12	0,16	0,22	0,31	0,33	0,35	0,38	++
DC-39	0,00	0,05	0,10	0,20	0,32	0,40	0,57	0,64	0,85	0,85	+++
DC-54	0,01	0,09	0,12	0,15	0,29	0,35	0,40	0,58	0,64	0,70	++
DC-27	0,07	0,09	0,10	0,12	0,15	0,19	0,24	0,25	0,28	0,30	+
DC-38	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	-
DC-53	0,00	0,05	0,09	0,10	0,21	0,37	0,43	0,47	0,60	0,66	++
DC-12	0,00	0,07	0,09	0,15	0,28	0,35	0,73	0,75	0,75	0,70	++
DC-42	0,05	0,10	0,18	0,20	0,31	0,45	0,51	0,75	0,80	0,76	++
TR-23	0,00	0,02	0,03	0,06	0,11	0,27	0,54	0,62	0,50	0,43	++
E-1	0,00	0,03	0,06	0,08	0,10	0,17	0,23	0,32	0,40	0,43	+

*Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 9 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 3,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,10	0,16	0,22	0,30	0,36	0,70	0,84	0,90	0,95	0,95	++	++
F-9	0,02	0,05	0,08	0,15	0,22	0,70	0,73	0,74	0,75	0,80	++	++
F-2	0,15	0,24	0,31	0,42	0,50	0,85	0,97	0,98	1,00	1,00	+++	+++
F-61	0,09	0,08	0,13	0,16	0,19	0,62	0,71	0,73	0,73	0,75	++	++
E-14	0,10	0,13	0,23	0,30	0,34	0,64	0,87	0,88	0,90	0,85	+++	+++
F-46	0,02	0,05	0,06	0,07	0,09	0,73	0,83	0,85	0,80	0,70	+++	+++
F-39	0,05	0,08	0,08	0,12	0,14	0,67	0,77	0,80	0,80	0,80	++	++
F-29	0,10	0,10	0,11	0,13	0,14	0,47	0,76	0,76	0,80	0,75	++	++
TR-17	0,06	0,10	0,23	0,36	0,42	0,76	0,77	0,80	0,80	0,90	+++	+++
E-5	0,02	0,05	0,06	0,10	0,14	0,62	0,70	0,73	0,70	0,70	++	++
E-12	0,10	0,15	0,22	0,30	0,34	0,70	0,89	1,00	1,00	1,00	+++	+++
E-9	0,14	0,22	0,34	0,48	0,54	0,78	0,97	1,00	1,00	1,00	+++	+++
TR-15	0,09	0,12	0,16	0,22	0,25	0,62	0,75	0,80	0,85	0,90	+++	+++
DC-52	0,15	0,19	0,25	0,33	0,40	0,73	0,97	1,00	0,95	0,90	+++	+++
E-13	0,00	0,02	0,05	0,11	0,15	0,78	0,81	0,80	0,75	0,75	++	++
E-2	0,11	0,15	0,15	0,18	0,18	0,25	0,38	0,41	0,48	0,54	++	++
TM-8	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,74	0,87	0,85	0,85	0,80	+++	+++
DC-55	0,04	0,05	0,05	0,05	0,06	0,29	0,78	0,80	0,87	0,80	+++	+++
F-57	0,02	0,08	0,09	0,08	0,08	0,12	0,13	0,12	0,12	0,12	+	+
DC-34	0,05	0,10	0,15	0,21	0,25	0,58	0,74	0,75	0,75	0,72	++	++
DC-6	0,14	0,23	0,23	0,27	0,31	0,66	0,90	0,92	0,95	0,85	+++	+++
DC-39	0,00	0,06	0,08	0,09	0,10	0,33	0,85	0,85	0,80	0,70	+++	+++
DC-54	0,03	0,13	0,23	0,36	0,40	0,52	0,90	0,85	0,75	0,70	+++	+++
DC-27	0,12	0,17	0,22	0,25	0,25	0,58	0,70	0,73	0,75	0,75	++	++
DC-38	0,12	0,13	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,16	0,16	0,16	+	+
DC-53	0,07	0,18	0,20	0,25	0,30	0,66	0,96	1,00	0,95	0,95	+++	+++
DC-12	0,07	0,13	0,19	0,25	0,27	0,66	0,77	0,75	0,75	0,75	++	++
DC-42	0,00	0,02	0,20	0,47	0,60	0,71	0,77	0,75	0,75	0,62	++	++
TR-23	0,13	0,23	0,25	0,30	0,32	0,60	0,95	0,95	1,00	1,00	+++	+++
E-1	0,08	0,18	0,17	0,21	0,23	0,60	0,88	0,90	0,90	0,90	+++	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 10 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 4,0.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,05	0,18	0,35	0,52	0,64	0,85	0,97	1,00	1,00	1,00	+++	+++
F-9	0,00	0,10	0,29	0,48	0,60	0,62	0,73	0,85	0,85	0,70	+++	+++
F-2	0,09	0,28	0,50	0,66	0,75	0,92	1,00	1,10	1,10	0,85	+++	+++
F-61	0,02	0,07	0,18	0,28	0,40	0,55	0,65	0,75	0,70	0,62	++	++
E-14	0,00	0,12	0,27	0,38	0,52	0,72	0,79	0,85	0,80	0,80	+++	+++
F-46	0,00	0,04	0,04	0,10	0,20	0,70	0,77	0,80	0,75	0,70	++	++
F-39	0,05	0,10	0,20	0,30	0,45	0,56	0,70	0,84	0,75	0,73	++	++
F-29	0,01	0,08	0,10	0,12	0,15	0,48	0,84	0,90	0,80	0,80	+++	+++
TR-17	0,05	0,15	0,29	0,38	0,49	0,86	0,90	1,00	0,95	0,90	+++	+++
E-5	0,00	0,02	0,16	0,26	0,40	0,63	0,68	0,73	0,66	0,60	++	++
E-12	0,02	0,10	0,21	0,33	0,48	0,75	0,90	0,90	0,85	0,85	+++	+++
E-9	0,05	0,15	0,20	0,26	0,33	0,56	0,81	0,90	0,80	0,75	+++	+++
TR-15	0,04	0,10	0,20	0,30	0,50	0,87	1,05	1,20	1,00	0,85	+++	+++
DC-52	0,06	0,14	0,27	0,38	0,49	0,64	0,77	0,83	0,75	0,66	++	++
E-13	0,03	0,10	0,13	0,22	0,38	0,85	0,87	0,91	0,80	0,80	+++	+++
E-2	0,07	0,15	0,26	0,35	0,54	0,78	1,05	1,20	0,90	0,95	+++	+++
TM-8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,88	1,00	1,00	0,95	0,90	+++	+++
DC-55	0,00	0,05	0,04	0,11	0,19	0,75	0,85	0,85	0,76	0,75	+++	+++
F-57	0,04	0,08	0,12	0,21	0,33	0,52	0,62	0,75	0,70	0,70	++	++
DC-34	0,03	0,12	0,22	0,33	0,47	0,80	0,95	1,00	0,90	0,90	+++	+++
DC-6	0,03	0,16	0,24	0,31	0,42	0,69	0,95	1,00	0,90	0,95	+++	+++
DC-39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,80	0,80	0,82	0,75	0,70	++	++
DC-54	0,00	0,05	0,09	0,15	0,20	0,37	0,84	0,85	0,85	0,90	+++	+++
DC-27	0,05	0,19	0,25	0,36	0,47	0,81	1,00	1,20	1,00	1,00	+++	+++
DC-38	0,00	0,05	0,03	0,04	0,04	0,06	0,15	0,26	0,28	0,30	+	+
DC-53	0,05	0,21	0,30	0,44	0,48	0,69	0,97	0,93	0,90	0,83	+++	+++
DC-12	0,00	0,18	0,25	0,34	0,38	0,60	0,80	0,90	0,85	0,85	+++	+++
DC-42	0,00	0,03	0,04	0,08	0,15	0,64	0,82	0,81	0,80	0,80	++	++
TR-23	0,08	0,23	0,30	0,39	0,50	0,76	0,86	0,91	0,95	0,90	+++	+++
E-1	0,07	0,26	0,35	0,52	0,60	0,80	0,97	1,00	1,00	1,00	+++	+++

* Critério para avaliar o crescimento:-

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 11 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 4,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	
F-12	0,03	0,16	0,46	0,64	0,75	0,78	0,90	0,95	0,95	0,95	+++
F-9	0,00	0,20	0,36	0,62	0,70	0,76	0,80	0,76	0,76	0,76	++
F-2	0,08	0,25	0,60	0,70	0,85	0,77	0,98	0,90	0,95	0,95	+++
F-61	0,04	0,08	0,38	0,50	0,56	0,64	0,68	0,75	0,75	0,75	++
E-14	0,06	0,15	0,42	0,58	0,73	0,80	0,93	0,90	0,85	0,85	+++
F-46	0,00	0,00	0,08	0,20	0,42	0,76	0,81	0,85	0,85	0,90	+++
F-39	0,00	0,03	0,35	0,49	0,60	0,64	0,65	0,70	0,70	0,70	++
F-29	0,01	0,06	0,19	0,34	0,40	0,45	0,45	0,54	0,54	0,54	++
TR-17	0,11	0,15	0,44	0,51	0,55	0,75	0,89	0,95	0,85	0,75	+++
E-5	0,00	0,02	0,17	0,24	0,40	0,66	0,73	0,76	0,76	0,80	++
E-12	0,05	0,10	0,35	0,52	0,68	0,80	0,80	0,80	0,70	0,60	++
E-9	0,03	0,09	0,32	0,51	0,70	0,78	0,95	0,95	0,90	0,70	+++
TR-15	0,03	0,05	0,23	0,47	0,85	0,85	0,90	0,90	0,95	0,95	+++
DC-52	0,04	0,11	0,38	0,56	0,72	0,80	0,89	0,89	0,90	0,85	+++
E-13	0,04	0,04	0,18	0,35	0,58	0,80	0,90	1,00	0,95	0,95	+++
E-2	0,02	0,08	0,24	0,43	0,64	0,81	0,87	0,90	0,95	0,95	+++
TM-8	0,00	0,00	0,04	0,13	0,37	0,77	0,85	0,85	0,85	0,90	+++
DC-55	0,00	0,05	0,10	0,30	0,52	0,75	0,84	0,90	0,90	0,90	+++
F-57	0,00	0,10	0,28	0,40	0,50	0,56	0,56	0,58	0,60	0,60	++
DC-34	0,00	0,04	0,20	0,17	0,38	0,66	0,95	1,00	1,00	1,00	+++
DC-6	0,02	0,15	0,25	0,38	0,50	0,76	0,88	0,90	1,00	1,00	+++
DC-39	0,00	0,00	0,03	0,04	0,14	0,68	0,74	0,77	0,75	0,75	++
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,03	0,14	0,60	0,66	0,70	0,73	0,75	++
DC-27	0,03	0,20	0,34	0,51	0,62	0,84	0,98	1,00	1,00	1,00	+++
DC-38	0,00	0,00	0,02	0,04	0,06	0,40	0,72	0,80	0,80	0,84	++
DC-53	0,09	0,27	0,43	0,58	0,66	0,83	0,95	1,00	1,00	1,00	+++
DC-12	0,00	0,14	0,25	0,30	0,38	0,66	0,90	1,00	0,85	0,83	+++
DC-42	0,00	0,00	0,02	0,09	0,27	0,73	0,85	1,00	0,95	0,90	+++
TR-23	0,00	0,20	0,34	0,52	0,64	0,78	0,91	0,95	0,90	0,85	+++
E-1	0,01	0,20	0,32	0,52	0,62	0,80	1,00	1,00	0,90	0,74	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 12 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 5,0.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,11	0,25	0,66	0,80	0,82	0,80	0,95	0,95	0,75	0,70	+++	
F-9	0,00	0,11	0,66	0,73	0,76	0,78	0,90	0,95	0,85	0,80	+++	
F-2	0,12	0,25	0,66	0,78	0,84	0,84	1,00	1,00	1,00	0,90	+++	
F-61	0,08	0,22	0,64	0,70	0,71	0,71	0,85	0,90	0,90	0,90	+++	
E-14	0,10	0,22	0,60	0,70	0,81	0,80	0,86	0,85	0,75	0,70	+++	
F-46	0,00	0,02	0,15	0,32	0,46	0,84	0,85	0,85	0,80	0,73	+++	
F-39	0,00	0,08	0,56	0,66	0,66	0,70	0,79	0,80	0,90	0,66	+++	
F-29	0,00	0,11	0,44	0,45	0,46	0,46	0,54	0,58	0,60	0,60	++	
TR-17	0,05	0,11	0,18	0,24	0,28	0,75	0,85	0,85	0,85	0,90	+++	
E-5	0,05	0,06	0,16	0,24	0,36	0,82	0,85	0,90	0,85	0,85	+++	
E-12	0,07	0,14	0,50	0,66	0,78	0,87	0,90	1,00	1,00	1,00	+++	
E-9	0,14	0,22	0,60	0,75	0,85	0,80	0,97	1,00	1,00	1,00	+++	
TR-15	0,05	0,08	0,47	0,85	0,90	0,90	0,98	1,00	0,90	0,90	+++	
DC-52	0,13	0,23	0,60	0,75	0,86	0,93	1,05	1,30	1,10	1,10	+++	
E-13	0,00	0,04	0,24	0,40	0,50	0,75	0,93	0,90	0,95	0,95	+++	
E-2	0,09	0,15	0,40	0,56	0,71	0,79	0,94	0,95	0,95	0,95	+++	
TM-8	0,05	0,02	0,13	0,33	0,56	0,58	0,70	0,75	0,70	0,70	++	
DC-55	0,00	0,00	0,14	0,37	0,60	0,73	0,80	0,31	0,80	0,60	++	
F-57	0,04	0,07	0,52	0,70	0,73	0,75	0,78	0,80	0,85	0,90	+++	
DC-34	0,07	0,10	0,39	0,60	0,75	0,90	1,05	1,00	1,00	1,10	+++	
DC-6	0,10	0,28	0,40	0,55	0,70	0,85	0,98	1,00	0,95	0,90	+++	
DC-39	0,00	0,00	0,02	0,13	0,25	0,80	0,84	0,85	0,75	0,64	+++	
DC-54	0,00	0,02	0,03	0,12	0,23	0,82	0,74	0,66	0,66	0,54	++	
DC-27	0,03	0,17	0,19	0,25	0,40	0,81	0,95	0,95	0,95	1,00	+++	
DC-38	0,02	0,05	0,06	0,10	0,13	0,58	0,75	0,80	0,70	0,60	++	
DC-53	0,08	0,32	0,48	0,70	0,80	0,90	1,05	1,20	1,00	0,75	+++	
DC-12	0,00	0,16	0,20	0,26	0,29	0,78	1,00	1,00	0,95	0,90	+++	
DC-42	0,01	0,05	0,05	0,17	0,32	0,75	0,89	0,95	0,90	0,90	+++	
TR-23	0,01	0,26	0,45	0,70	0,80	0,92	1,05	1,20	1,10	1,00	+++	
E-1	0,06	0,31	0,47	0,70	0,80	0,90	1,05	1,20	1,00	1,00	+++	

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 13 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 5,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	
F -12	0,13	0,33	0,55	0,72	0,82	0,85	0,98	1,00	0,90	0,80	+++
F - 9	0,00	0,02	0,20	0,66	0,71	0,80	0,87	0,95	0,80	0,64	+++
F - 2	0,07	0,27	0,64	0,80	0,90	0,93	0,97	1,20	1,00	0,80	+++
F -61	0,00	0,18	0,60	0,66	0,66	0,62	0,68	0,74	0,64	0,52	++
E -14	0,13	0,33	0,68	0,80	0,92	0,94	1,05	1,00	1,00	0,80	+++
F -46	0,00	0,04	0,15	0,27	0,45	0,76	0,69	0,71	0,56	0,34	++
F -39	0,05	0,21	0,68	0,75	0,76	0,77	0,86	0,90	0,80	0,62	+++
F -29	0,05	0,25	0,58	0,56	0,56	0,45	0,46	0,43	0,36	0,15	++
TR-17	0,07	0,14	0,23	0,27	0,40	0,80	0,86	0,95	0,75	0,64	+++
E - 5	0,06	0,14	0,25	0,27	0,43	0,76	0,77	0,83	0,75	0,56	++
E -12	0,05	0,18	0,47	0,64	0,78	0,79	0,95	0,94	0,80	0,68	+++
E - 9	0,08	0,23	0,56	0,75	0,90	0,83	1,05	1,20	0,95	0,62	+++
TR-15	0,05	0,15	0,53	0,83	0,92	0,91	1,03	1,00	1,00	0,80	+++
DC-52	0,09	0,22	0,50	0,71	0,88	0,88	0,98	1,20	0,95	0,75	+++
E -13	0,05	0,12	0,33	0,50	0,68	0,88	0,95	1,00	0,85	0,70	+++
E - 2	0,08	0,18	0,43	0,54	0,77	0,83	0,91	1,00	0,90	0,75	+++
TM- 8	0,00	0,02	0,17	0,47	0,66	0,73	0,77	0,80	0,70	0,52	++
DC-55	0,00	0,04	0,23	0,58	0,72	0,75	0,77	0,83	0,70	0,54	++
F -57	0,02	0,12	0,64	0,75	0,76	0,76	0,80	0,90	0,76	0,60	+++
DC-34	0,04	0,13	0,37	0,56	0,66	0,81	0,97	1,20	0,62	0,54	+++
DC- 6	0,09	0,25	0,39	0,58	0,70	0,81	0,94	0,95	0,90	0,60	+++
DC-39	0,02	0,08	0,08	0,18	0,30	0,73	0,75	0,75	0,60	0,33	++
DC-54	0,00	0,00	0,02	0,13	0,25	0,73	0,75	0,77	0,54	0,31	++
DC-27	0,05	0,24	0,35	0,48	0,60	0,80	0,97	1,00	0,85	0,75	+++
DC-38	0,04	0,11	0,13	0,20	0,26	0,71	0,85	0,90	0,75	0,64	+++
DC-53	0,10	0,35	0,50	0,72	0,85	0,86	1,10	1,20	1,00	0,85	+++
DC-12	0,02	0,15	0,17	0,19	0,23	0,64	0,96	1,20	0,95	0,77	+++
DC-42	0,00	0,03	0,06	0,21	0,37	0,68	0,75	0,90	0,80	0,54	+++
TR-23	0,06	0,33	0,50	0,75	0,86	0,91	0,95	1,00	0,90	0,76	+++
E - 1	0,07	0,30	0,47	0,71	0,83	0,90	1,05	1,00	0,95	0,62	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 14 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 6,0.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	
F-12	0,03	0,17	0,66	0,77	0,75	0,70	0,90	0,90	0,80	0,80	+++
F-9	0,00	0,07	0,75	0,80	0,85	0,80	0,90	0,95	0,90	0,90	+++
F-2	0,01	0,12	0,51	0,72	0,80	0,82	0,91	0,93	0,90	1,00	+++
F-61	0,00	0,06	0,73	0,76	0,76	0,80	0,85	0,95	0,90	0,90	+++
E-14	0,05	0,16	0,47	0,62	0,70	0,75	0,77	0,75	0,70	0,70	++
F-46	0,00	0,00	0,04	0,12	0,22	0,56	0,57	0,50	0,50	0,50	++
F-39	0,00	0,07	0,60	0,71	0,73	0,75	0,77	0,90	0,85	0,80	+++
F-29	0,00	0,08	0,54	0,54	0,56	0,45	0,44	0,50	0,50	0,54	++
TR-17	0,00	0,04	0,15	0,18	0,25	0,66	0,92	0,95	0,95	0,75	+++
E-5	0,02	0,05	0,10	0,14	0,20	0,50	0,71	0,64	0,62	0,56	++
E-12	0,00	0,06	0,36	0,60	0,73	0,78	0,87	1,00	0,90	0,90	+++
E-9	0,00	0,04	0,37	0,58	0,70	0,75	0,90	0,90	0,90	0,66	+++
TR-15	0,00	0,02	0,52	0,88	0,82	0,90	0,98	0,95	0,95	0,85	+++
DC-52	0,00	0,04	0,34	0,54	0,67	0,72	0,85	0,87	0,85	0,85	+++
E-13	0,00	0,04	0,21	0,33	0,41	0,62	0,68	0,66	0,70	0,70	++
E-2	0,02	0,07	0,34	0,54	0,60	0,70	0,90	0,95	0,90	0,86	+++
TM-8	0,00	0,00	0,09	0,39	0,60	0,70	0,73	0,80	0,80	0,80	++
DC-55	0,00	0,00	0,16	0,47	0,74	0,73	0,78	0,80	0,85	0,70	+++
F-57	0,00	0,00	0,64	0,73	0,80	0,85	0,90	0,90	0,90	0,82	+++
DC-34	0,00	0,00	0,25	0,44	0,66	0,75	0,85	0,90	0,90	0,75	+++
DC-6	0,03	0,17	0,20	0,27	0,33	0,66	0,81	0,85	0,80	0,80	+++
DC-39	0,00	0,00	0,02	0,09	0,17	0,66	0,60	0,58	0,52	0,46	++
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,04	0,11	0,60	0,60	0,64	0,60	0,56	++
DC-27	0,05	0,18	0,25	0,36	0,54	0,75	0,91	0,92	0,92	0,95	+++
DC-38	0,00	0,04	0,08	0,15	0,23	0,64	0,79	0,85	0,85	0,80	+++
DC-53	0,04	0,29	0,46	0,64	0,78	0,70	0,85	0,90	0,80	0,85	+++
DC-12	0,00	0,07	0,09	0,11	0,12	0,20	0,91	0,95	0,95	0,85	+++
DC-42	0,00	0,00	0,00	0,04	0,11	0,56	0,56	0,56	0,54	0,48	++
TR-23	0,03	0,27	0,40	0,64	0,75	0,81	0,92	1,00	1,00	1,00	+++
E-1	0,01	0,25	0,40	0,64	0,75	0,85	0,86	0,95	0,95	0,95	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 15 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 6,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,08	0,20	0,60	0,82	1,00	1,05	1,15	1,20	1,20	1,00	+++	+++
F-9	0,00	0,03	0,64	0,77	0,80	0,73	0,83	0,85	0,85	0,80	+++	+++
F-2	0,06	0,17	0,47	0,66	0,78	0,82	0,92	1,00	1,00	1,00	+++	+++
F-61	0,05	0,19	0,70	0,83	0,94	1,05	1,05	1,20	1,10	1,10	+++	+++
E-14	0,10	0,19	0,40	0,54	0,66	0,84	0,92	1,10	1,00	1,00	+++	+++
F-46	0,00	0,00	0,05	0,04	0,08	0,22	0,35	0,40	0,42	0,56	++	++
F-39	0,00	0,30	0,58	0,72	0,80	0,74	0,85	1,00	0,90	0,70	+++	+++
F-29	0,00	0,10	0,29	0,33	0,37	0,53	0,54	0,52	0,46	0,45	++	++
TR-17	0,00	0,03	0,12	0,15	0,19	0,71	0,92	1,00	1,00	1,00	+++	+++
E-5	0,00	0,00	0,05	0,07	0,09	0,16	0,30	0,40	0,45	0,45	++	++
E-12	0,05	0,10	0,34	0,46	0,61	0,86	0,97	1,10	1,00	1,00	+++	+++
E-9	0,07	0,12	0,37	0,52	0,72	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00	+++	+++
TR-15	0,00	0,00	0,21	0,36	0,60	1,00	0,98	1,10	1,00	1,00	+++	+++
DC-52	0,03	0,08	0,37	0,51	0,70	0,85	0,70	0,90	0,80	0,75	+++	+++
E-13	0,03	0,02	0,11	0,13	0,17	0,62	0,93	1,00	1,00	1,00	+++	+++
E-2	0,08	0,10	0,28	0,33	0,44	0,85	0,98	1,10	1,00	1,10	+++	+++
TM-8	0,00	0,00	0,06	0,15	0,26	0,95	0,95	0,95	0,90	0,65	+++	+++
DC-55	0,00	0,01	0,05	0,12	0,25	0,90	0,93	1,00	0,95	0,95	+++	+++
F-57	0,00	0,04	0,32	0,52	0,70	1,10	1,10	1,10	1,10	1,00	+++	+++
DC-34	0,02	0,08	0,22	0,32	0,46	0,78	0,95	0,95	1,00	0,95	+++	+++
DC-6	0,09	0,24	0,31	0,36	0,46	0,77	0,93	1,00	1,00	1,00	+++	+++
DC-39	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04	0,16	0,31	0,36	0,40	0,50	++	++
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,17	0,31	0,36	0,40	0,45	++	++
DC-27	0,00	0,09	0,17	0,30	0,42	0,65	0,83	0,95	0,90	0,80	+++	+++
DC-38	0,00	0,01	0,06	0,09	0,14	0,55	0,59	0,64	0,64	0,64	++	++
DC-53	0,00	0,24	0,36	0,58	0,70	0,78	0,91	1,00	0,95	0,95	+++	+++
DC-12	0,00	0,00	0,02	0,03	0,05	0,15	0,94	1,00	1,00	1,00	+++	+++
DC-42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,36	0,63	0,66	0,64	0,64	++	++
TR-23	0,00	0,22	0,36	0,56	0,70	0,90	0,97	1,00	1,00	1,00	+++	+++
E-1	0,00	0,17	0,30	0,51	0,66	0,80	0,95	1,00	1,00	1,10	+++	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 16 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 7,0.

Incubação (h)	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123	Intensidade de crescimento
linhagens											
F-12	0,03	0,19	0,54	0,79	0,83	1,00	1,00	1,10	1,00	0,95	+++
F-9	0,00	0,08	0,56	0,70	0,75	0,81	0,84	0,80	0,80	0,80	++
F-2	0,09	0,28	0,58	0,76	0,85	0,85	1,05	1,00	1,00	1,10	+++
F-61	0,03	0,22	0,64	0,72	0,75	0,76	0,93	0,85	0,90	0,96	+++
E-14	0,07	0,25	0,41	0,61	0,76	0,90	1,00	0,95	0,95	0,93	+++
F-46	0,00	0,00	0,02	0,07	0,10	0,30	0,51	0,46	0,46	0,50	++
F-39	0,00	0,03	0,08	0,10	0,20	0,35	0,89	1,00	0,90	0,75	+++
F-29	0,00	0,23	0,63	0,64	0,64	0,46	0,38	0,36	0,31	0,30	++
TR-17	0,05	0,08	0,10	0,14	0,16	0,61	0,84	1,00	0,90	0,90	+++
E-5	0,01	0,04	0,07	0,09	0,11	0,30	0,54	0,64	0,60	0,58	++
E-12	0,08	0,18	0,40	0,60	0,73	0,70	0,79	0,90	0,85	0,80	+++
E-9	0,06	0,15	0,35	0,52	0,72	0,85	0,95	1,00	1,00	0,90	+++
TR-15	0,02	0,09	0,44	0,80	0,87	0,83	0,95	1,10	1,10	0,95	+++
DC-52	0,05	0,13	0,36	0,54	0,72	0,85	0,98	1,00	0,85	0,90	+++
E-13	0,00	0,07	0,13	0,17	0,23	0,78	0,89	1,00	0,95	1,00	+++
E-2	0,08	0,15	0,30	0,46	0,60	0,84	0,99	1,00	1,00	1,00	+++
TM-8	0,00	0,05	0,12	0,21	0,42	0,94	0,92	0,95	0,95	0,90	+++
DC-55	0,04	0,05	0,13	0,30	0,60	0,90	0,93	0,93	0,90	0,95	+++
F-57	0,00	0,05	0,50	0,66	0,73	0,76	0,80	0,80	0,95	0,80	+++
DC-34	0,01	0,09	0,21	0,41	0,68	0,90	0,97	1,00	1,00	0,95	+++
DC-6	0,07	0,24	0,30	0,43	0,62	0,81	0,93	0,92	0,95	0,90	+++
DC-39	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,25	0,46	0,45	0,50	0,49	++
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,28	0,46	0,41	0,42	0,38	++
DC-27	0,04	0,19	0,23	0,33	0,46	0,80	0,95	0,95	1,00	0,95	+++
DC-38	0,00	0,06	0,13	0,25	0,40	0,85	0,96	0,95	0,95	1,00	+++
DC-53	0,00	0,21	0,31	0,46	0,58	0,77	0,91	1,00	0,95	1,00	+++
DC-12	0,00	0,03	0,04	0,07	0,08	0,15	0,95	1,00	0,95	1,00	+++
DC-42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,26	0,42	0,42	0,46	0,48	++
TR-23	0,00	0,24	0,35	0,50	0,62	0,81	1,00	1,10	0,95	1,00	+++
E-1	0,00	0,20	0,30	0,45	0,60	0,85	1,05	1,00	0,95	1,00	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

TABELA 17 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 7,5.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,06	0,14	0,30	0,45	0,60	0,81	0,95	1,00	1,10	1,10	+++	+++
F-9	0,00	0,00	0,35	0,56	0,60	0,78	0,80	0,85	0,90	0,83	+++	+++
F-2	0,09	0,15	0,26	0,34	0,41	0,70	0,83	0,90	0,90	0,90	+++	+++
F-61	0,03	0,14	0,35	0,50	0,64	1,20	0,96	1,00	1,10	1,10	+++	+++
E-14	0,09	0,18	0,37	0,46	0,59	0,72	0,77	0,80	0,90	0,90	+++	+++
F-46	0,00	0,00	0,03	0,04	0,04	0,13	0,27	0,32	0,40	0,42	+	+
F-39	0,04	0,21	0,53	0,73	0,85	1,15	1,15	1,20	1,30	1,20	+++	+++
F-29	0,05	0,10	0,18	0,22	0,24	0,40	0,46	0,45	0,40	0,38	++	++
TR-17	0,07	0,08	0,14	0,14	0,15	0,40	0,90	0,90	0,95	0,90	+++	+++
E-5	0,04	0,06	0,10	0,09	0,10	0,15	0,28	0,31	0,36	0,40	+	+
E-12	0,08	0,15	0,30	0,38	0,48	0,64	0,66	0,75	0,70	0,80	++	++
E-9	0,06	0,12	0,26	0,33	0,42	0,72	0,82	0,90	0,92	0,95	+++	+++
TR-15	0,01	0,04	0,13	0,19	0,29	0,77	0,91	1,00	1,10	1,10	+++	+++
DC-52	0,05	0,12	0,24	0,30	0,40	0,69	0,78	0,85	0,85	0,90	+++	+++
E-13	0,04	0,07	0,09	0,11	0,12	0,37	0,65	0,80	0,75	0,80	++	++
E-2	0,10	0,13	0,21	0,23	0,24	0,47	0,68	0,85	0,85	0,86	+++	+++
TM-8	0,00	0,00	0,04	0,08	0,12	0,49	0,66	0,70	0,75	0,80	++	++
DC-55	0,00	0,00	0,02	0,03	0,07	0,75	0,73	0,76	0,75	0,80	++	++
F-57	0,01	0,07	0,32	0,48	0,66	1,10	0,95	1,00	1,20	1,10	+++	+++
DC-34	0,07	0,10	0,18	0,22	0,25	0,54	0,72	0,80	0,85	0,85	+++	+++
DC-6	0,00	0,04	0,13	0,22	0,23	0,50	0,60	0,70	0,75	0,70	++	++
DC-39	0,00	0,00	0,00	0,03	0,08	0,12	0,27	0,29	0,30	0,32	+	+
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,01	0,08	0,10	0,25	0,30	0,35	0,38	+	+
DC-27	0,00	0,02	0,06	0,14	0,12	0,56	0,64	1,10	0,62	0,70	+++	+++
DC-38	0,02	0,13	0,23	0,40	0,49	0,95	0,97	1,10	1,10	1,10	+++	+++
DC-53	0,00	0,15	0,24	0,38	0,46	0,66	0,96	0,90	0,90	0,90	+++	+++
DC-12	0,00	0,00	0,01	0,02	0,05	0,07	0,76	0,66	0,80	0,85	+++	+++
DC-42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,20	0,22	0,26	+	+
TR-23	0,00	0,11	0,21	0,33	0,43	0,77	0,85	0,95	0,90	0,95	+++	+++
E-1	0,00	0,09	0,19	0,33	0,40	0,72	0,79	0,90	0,85	0,90	+++	+++

* Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++

TABELA 18 - Avaliação do crescimento* das 30 linhagens de bactérias lácticas pela absorvância a 600 nm em meio ajustado a pH 8,0.

Linhagens	Incubação (h)										Intensidade de crescimento	
	0	3	4	6	8	24	55	74	96	123		
F-12	0,00	0,30	0,50	0,68	0,90	0,96	1,00	1,20	1,10	1,00	+++	
F-9	0,00	0,60	0,85	1,00	1,10	1,20	1,20	1,40	1,30	1,40	+++	
F-2	0,07	0,19	0,22	0,28	0,33	0,62	0,62	0,75	0,80	0,80	++	
F-61	0,06	0,18	0,29	0,40	0,54	0,97	0,85	0,90	1,10	1,00	+++	
E-14	0,11	0,21	0,31	0,39	0,46	0,64	0,70	0,80	0,80	0,85	+++	
F-46	0,01	0,04	0,04	0,05	0,05	0,15	0,29	0,36	0,40	0,43	+	
F-39	0,04	0,12	0,21	0,31	0,40	0,71	0,68	0,80	0,85	0,90	+++	
F-29	0,03	0,10	0,11	0,13	0,15	0,22	0,29	0,29	0,25	0,21	+	
TR-17	0,07	0,11	0,11	0,11	0,11	0,28	0,70	0,75	0,56	0,73	++	
E-5	0,07	0,09	0,10	0,08	0,08	0,10	0,17	0,23	0,30	0,31	+	
E-12	0,09	0,18	0,29	0,35	0,42	0,64	0,73	0,85	0,86	0,85	+++	
E-9	0,09	0,16	0,27	0,35	0,46	0,64	0,79	0,85	0,90	0,90	+++	
TR-15	0,17	0,23	0,32	0,38	0,49	0,72	0,76	0,90	0,80	0,90	+++	
DC-52	0,05	0,12	0,20	0,27	0,37	0,60	0,75	0,76	0,85	0,85	+++	
E-13	0,04	0,07	0,07	0,08	0,10	0,20	0,48	0,60	0,54	0,50	++	
E-2	0,05	0,10	0,13	0,16	0,20	0,46	0,49	0,64	0,70	0,70	++	
TM-8	0,02	0,04	0,06	0,08	0,11	0,31	0,50	0,46	0,50	0,60	++	
DC-55	0,01	0,02	0,01	0,03	0,04	0,50	0,75	0,75	0,80	0,80	++	
F-57	0,04	0,09	0,21	0,30	0,41	0,83	0,85	0,90	1,00	1,00	+++	
DC-34	0,06	0,12	0,16	0,20	0,25	0,60	0,64	0,50	0,80	0,90	+++	
DC-6	0,07	0,19	0,20	0,22	0,26	0,40	0,56	0,64	0,70	0,75	++	
DC-39	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,07	0,21	0,28	0,33	0,46	++	
DC-54	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,07	0,19	0,25	0,30	0,35	+	
DC-27	0,09	0,17	0,20	0,20	0,21	0,45	0,50	0,52	0,70	0,70	++	
DC-38	0,02	0,18	0,23	0,32	0,41	0,78	0,86	0,90	0,90	1,00	+++	
DC-53	0,00	0,37	0,48	0,60	0,70	1,00	1,10	1,20	1,20	1,20	+++	
DC-12	0,00	0,11	0,13	0,14	0,15	0,27	0,48	1,00	1,10	1,10	+++	
DC-42	0,00	0,00	0,03	0,04	0,05	0,20	0,37	0,47	0,50	0,60	++	
TR-23	0,09	0,29	0,37	0,48	0,58	0,83	0,76	0,85	0,95	1,00	+++	
E-1	0,00	0,28	0,38	0,50	0,60	0,90	1,00	1,20	1,00	1,10	+++	

*Critério para avaliar o crescimento:

0 - 0,11 ausência de crescimento = -
 0,12 - 0,43 crescimento moderado = +
 0,44 - 0,84 crescimento acentuado = ++
 0,85 - 1,40 crescimento abundante = +++