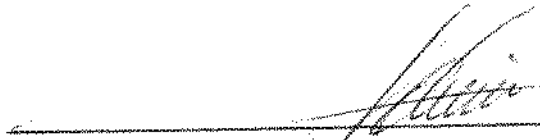


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parecer
Este exemplar corresponde a redação
final da tese defendida por Sandra
Garcia e aprovada pela Comissão Julga-
dora em 10.10.84.
Campinas, 18 de outubro de 1984.


Assinatura do Presidente da Comissão

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CULTURAS LÁTICAS PARA
A FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

por
SANDRA GARCIA
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. José Sâtiro de Oliveira
Orientador

16/84

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

1984

CAMPINAS - S. PAULO

UNICAMP

A meus pais,
irmãos e amigos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Sático de Oliveira pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

À Seção de Leite e Derivados do ITAL, mais especificamente a seus funcionários, pela ajuda durante a execução dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pela bolsa de estudos concedida durante o curso de Pós-graduação.

Ao Laticínio Argenzio por ceder suas instalações para a realização dos testes.

À Cia. Leco de Produtos Alimentícios pelo fornecimento das amostras.

À ABIA pela colaboração nas cópias.

Aos colegas Lúcio Alberto Forti Antunes, Arnaldo Yoshitero Kuaye e Izildinha Moreno pela amizade e incentivo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
Fermentação Lática.....	03
Fermento Lático.....	07
Origem e Habitat dos Microrganismos Láticos.....	08
Características Microbiológicas das Principais Espé-	
cies.....	09
<i>Streptococcaceae</i>	10
<i>Streptococcus</i>	10
<i>Leuconostoc</i>	11
<i>Pediococcus</i>	11
<i>Lactobacillaceae</i>	12
<i>Lactobacillus</i>	12
Isolamento e Seleção das Principais Bactérias Láticas	13
Manutenção das Culturas Láticas.....	25
Avanços Genéticos relacionados com Bactérias Láticas.	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
Amostras.....	32
Culturas.....	32
Meios de Cultura.....	33
Matéria-prima.....	34

	Página
Coagulante.....	34
Cloreto de Cálcio.....	34
Técnicas de Fabricação de Queijos.....	34
Fluxograma do processamento de queijo Minas meia	
cura (teste a nível industrial).....	35
Preparo do fermento.....	36
Determinações Analíticas.....	36
Amostragem dos Queijos.....	36
Acidez.....	36
Umidade.....	37
Gordura.....	37
Proteína.....	37
Cloreto de Sódio.....	37
Índice de Maturação.....	37
Análise Sensorial.....	38
Densidade Ótica.....	38
Atividade Proteolítica.....	38
Teste de Sensibilidade ao Cloreto de Sódio.....	40
Teste de Sensibilidade a Bacteriófagos.....	40
Produção de Substâncias Inibidoras.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
Enriquecimento.....	42
Isolamentos.....	45
Seleção.....	47
Avaliação das Culturas Isoladas Através da Fabricação	
de Queijo.....	51

	Página
Teste a Nível Industrial.....	54
Comportamento Microbiológico.....	61
Efeito da Temperatura de Cozimento na Atividade <u>Acid</u> ficante.....	63
Atividade Proteolítica.....	71
Influência da Concentração de Cloreto de Sódio na <u>Ati</u> vidade Acidificante.....	73
Teste de Sensibilidade a Bacteriófagos.....	73
Teste de Produção de Substâncias Inibidoras.....	75
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Principais grupos de culturas isoladas, de acordo com a amostra de origem.....	50
2. pH de queijo Minas frescal em função da porcentagem de cultura láctica adicionada.....	53
3. pH de queijo Minas meia cura em função da porcentagem de cultura láctica adicionada.....	53
4. Determinação de pH, umidade, gordura, sal em queijo Minas meia cura, logo após a salga e depois de 20 dias de cura.....	56
5. Determinação de proteína total, proteína solúvel e índice de maturação (I.M.) em queijo Minas meia cura, logo após a salga e depois de 20 dias de cura.....	57
6. Grau de aceitação, em uma escala de 1 a 7, para avaliação sensorial de sabor de queijo Minas meia cura.....	59
7. Grau de avaliação, em uma escala de 1 a 7, das características de corpo e textura de queijo Minas meia cura.....	60
8. Atividade acidificante de culturas lácticas em leite desnatado, após 16 horas a 23°C.....	62
9. Atividade acidificante de culturas lácticas em leite desnatado após 5 horas a 30°C.....	62

10. Contagem em placas das culturas após cada hora de crescimento em leite desnatado a 30°C.....	65
11. Efeito da temperatura de incubação na atividade acidificante.....	67
12. Efeito da temperatura de incubação na atividade acidificante.....	69
13. Controle da acidificação utilizando inóculo padronizado e incubação a 30°C por 1,5 h e 38°C por mais de 4 horas.....	70
14. Atividade proteolítica de culturas lácticas, expressa em concentração de tirosina após crescimento em leite a 21°C por 15 horas.....	72
15. Influência da concentração de cloreto de sódio na atividade acidificante de culturas lácticas incubadas a 30°C por 5 horas.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Ficha do teste de preferência - Escala Hedônica de 7 pontos.....	39
2. Medidas de pH e acidez de culturas de <i>S. lactis</i> S-1 e <i>S. cremoris</i> 208 inoculadas em leite à razão de 2% e incubadas a 30°C.....	64
3. Curva de crescimento obtida pela medida da densidade ótica a 410 nm em função do tempo de culturas de <i>S. lactis</i> S-1 e <i>S. cremoris</i> 208.....	66
4. Zonas de inibição provocadas pela cepa <i>S. lactis</i> S-1 sobre a cepa <i>S. cremoris</i> 16.....	76

RESUMO

Com o objetivo de isolar e selecionar culturas lácticas típicas do nosso habitat, foram utilizadas amostras de leite cru, leite pasteurizado e queijos de leite cru ou semi-pasteurizado. De um total de 400 isolados iniciais, 250 foram descartados na primeira fase de seleção, tomando como base as características do coágulo e reações do indicador no leite tornassolado. As 150 culturas restantes reduziram-se a 80 quando selecionadas segundo a velocidade de acidificação em leite. Ao serem submetidas a uma avaliação de características típicas desejadas em um fermento láctico, inclusive sabor e aroma, somente 57 culturas apresentaram um potencial para serem utilizadas industrialmente. Dentre elas, 21 culturas de estreptococos mesófilos, 26 de lactobacilos e 10 de estreptococos termófilos.

Esses isolados foram avaliados como fermento láctico na fabricação de queijos Minas, Prato e Parmesão, sendo que no presente trabalho as experiências concentraram-se no queijo tipo Minas. Em geral, os resultados foram muito promissores, uma vez que as novas culturas mostraram maior atividade acidificante e maior índice de maturação do que culturas comerciais utilizadas como controle.

Vários testes a nível de laboratório foram também realizados visando comparar o comportamento microbiológico dos novos isolados frente a culturas puras de características conhecidas. Os resultados indicaram que as novas culturas apresentaram uma maior atividade fermentativa em termos de acidificação, maior velocidade de multiplicação, maior tolerância ao sal e às variações de temperatura na faixa de 30 a 40°C.

SUMMARY

Raw and pasteurized milk samples and samples of cheese made from raw or semi-pasteurized milk were selected for research into obtaining isolates of typical lactic cultures from natural sources.

On the basis of the coagulum characteristics and litmus milk reaction, 250 out of 400 isolates were discarded in the first step of the selection procedure. A further selection, using the acidification rate of each culture in milk, reduced the remaining 150 isolates to 80. From these cultures only 57 were considered to be potentially good for commercial use as starter cultures in the dairy industry, according to their typical coagulum and flavor characteristics. These new cultures finally selected included 26 lacto bacilli, 21 mesophilic and 10 thermophilic streptococci.

The new isolates were tested as starter cultures in the manufacture of Minas, Prato and Parmesan cheeses. However most of the experiments were done with the Minas type cheese. In general, the results indicated that the new starter cultures were more active in their acid production and curing development capacity than the imported commercial starter cultures used as control.

Several laboratory tests were performed to compare the new isolates with known pure starter cultures. The results indicated that the isolates, besides having a higher acidification rate, showed higher multiplication rate and higher tolerance to salt and to temperature variations in the range of 30 to 40°C.

INTRODUÇÃO

A fermentação é um dos processos mais antigos de preservação de alimentos utilizado pelo homem. No caso do leite, a aplicação do processo fermentativo para a obtenção do queijo é, sem dúvida, a mais importante e difundida entre nós. Sem a atuação das culturas ou fermentos lácticos na produção de sabor, aroma e transformações bioquímicas durante o processo de cura, o queijo se restringiria a um produto insípido e não seria possível a existência de tantas variedades como as atualmente conhecidas.

As bactérias lácticas são contaminantes naturais do leite cru, chegando até ele por meio de utensílios, ambiente e animais, sendo o seu habitat natural as plantas e vegetais em geral. Empiricamente, na fabricação de queijos utiliza-se leite cru que já contém uma microflora natural, e a seleção dos microrganismos lácticos desejados ocorre pela maior capacidade destes de crescerem ou sobreviverem durante as etapas de fabricação. Esse procedimento, entretanto, oferece riscos de falhas, podendo acarretar perdas, efeitos indesejáveis, etc, que afetam a qualidade e uniformidade do produto final.

Com o advento da pasteurização, visando destruir a flora patogênica, surgiu a necessidade de reposição da microflora láctica que é também eliminada pelo tratamento térmico. Para essa reposição adiciona-se culturas ou fermentos lácticos selecionados, cujo comportamento e ação no leite são bem conhecidos. O estudo das bactérias lácticas vem sofrendo grandes avanços nos últimos anos, sendo possível encontrar variedades específicas para cada ação desejada no produto final. Em geral, as indústrias nacionais obtêm, de laboratórios comerciais, os fermentos sob a forma liofilizada, os

quais, na maioria dos casos são importados. Nesse aspecto, é importante considerar a sensibilidade dessas culturas importadas frente aos contaminantes do nosso meio, uma vez que não estão em seu habitat natural.

O presente trabalho propõe o isolamento e seleção de culturas lácticas provenientes do nosso habitat, buscando pesquisar a utilização dos novos isolados em substituição aos fermentos importados normalmente utilizados na fabricação dos principais queijos produzidos pela indústria nacional.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fermentação Lática

A fermentação lática representou, certamente, a primeira forma de preservação do leite, transformando-o em um produto com sabor e aroma agradáveis (4, 12, 112). Assim, o homem descobriu que depois de passado algum tempo que era extraído do animal, o leite, se mantido à temperatura ambiente, tornava-se ácido e posteriormente não sofria outras mudanças indesejáveis, podendo ser conservado por vários dias (19, 40).

Do simples leite fermentado, cujo produto de maior difusão atualmente é o iogurte, nasceram posteriormente os queijos e com estes uma das indústrias de transformação mais importantes: a indústria queijeira (12).

O uso de fermentos na fabricação de queijos é tão antigo quanto a prática de preservação do leite, pois, mesmo antes da identificação das bactérias láticas, os queijeiros já se utilizavam de um soro ou leite acidificado para ser empregado como fermento (12, 27, 55, 102). Assim, a flora normalmente presente no leite juntamente com os contaminantes normais dos utensílios empregados no manuseio do leite e preparo do queijo, garantiam um suprimento de "fermento natural" (20, 46). Ainda hoje é comum o emprego de leite ou soro previamente acidificado para garantir a fermentação lática (1, 12, 25, 46, 55, 105).

A fermentação lática é também utilizada na produção de conservas vegetais, a exemplo de pickles e chucrute. Os açúcares existentes nos tecidos vegetais são fermentados e o ácido produzido, além de conferir sabor ao produto, preserva-o da deterioração

por outros microrganismos (40, 112).

Na formação de ácido promovida por uma fermentação, podem estar envolvidos diversos microrganismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. Aqueles cujo metabolismo é mais rápido e que melhor se adaptam ao meio, iniciam a fermentação e produzem metabólitos que modificam as condições do meio ambiente dando origem a uma sucessão de gêneros e espécies (8).

Normalmente, na coagulação ácida do leite provocada por uma fermentação láctica, estão envolvidas espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, que são referidas como bactérias lácticas (12, 47, 102, 111, 114). Os estreptococos lácticos produzem um coágulo ácido em leite cru mantido à temperatura ambiente (20, 24) e a mesma reação é provocada pelo *Streptococcus thermophilus*, porém à uma temperatura mais elevada, aproximadamente 45°C. Bastonetes homofermentativos produtores de ácido láctico podem provocar a coagulação ácida do leite, porém, são suplantados por outros microrganismos quando em população mista (40).

Algumas bactérias são capazes de produzir ácido láctico como principal produto da fermentação, porém, outras, além deste produzem compostos que conferem odores e sabores indesejáveis, que são o resultado da degradação parcial de proteínas e lipídeos, como no caso do *Streptococcus liquefaciens*, *Bacillus coagulans* e bactérias coliformes (40). A fermentação com produção de gás pode ser devida ao desenvolvimento de bactérias coliformes, leveduras fermentadoras de lactose, ou certas espécies de *Clostridium* (19, 40).

Os microrganismos, durante a ação no leite, provocam várias alterações, sendo a principal delas a metabolização da lactose produzindo ácido láctico. Nas bactérias lácticas homofermentativas, o ácido láctico é o principal produto, enquanto que nas heterofer-

mentativas ocorre também a produção de etanol, ácido acético e CO_2 (102, 111).

A compreensão de como ocorre o metabolismo dos carboidratos nos estreptococos lácticos sofreu um grande avanço nos últimos anos (66). A partir da descoberta do sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferase (PEP-PTS), identificado originalmente em Escherichia coli (12), foi demonstrado que durante o transporte até o citoplasma, a lactose e, talvez a galactose e glucose são fosforiladas através desse sistema, onde o PEP funciona como doador de fósforo. A galactose pode ser também fosforilada por uma outra via e convertida em glucose-6-fosfato obtida pela via lactose PEP-PTS é posteriormente metabolizada através da via tagatose-6-fosfato (12, 24, 66).

O sistema PEP-PTS é uma via fundamental para a utilização rápida da lactose e, juntamente com a via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnes, constituem o processo mais eficiente para a fermentação da lactose por parte dos fermentos lácticos (12).

Além de um carboidrato fermentescível, as bactérias lácticas necessitam de vários aminoácidos e vitaminas (25). Os gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, por exemplo, são altamente influenciados pela presença de substâncias proteicas solúveis facilmente assimiláveis (12, 66, 103). O leite contém além de teores relativamente altos de várias proteínas, baixas concentrações de aminoácidos livres (0,01%) e peptídeos (78), cujo teor é maior em leite pasteurizado ou autoclavado (12, 66, 108). Os aminoácidos inicialmente presentes no leite são uma fonte de nitrogênio importante para o crescimento a baixa concentração celu

lar, porém à medida que esta aumenta, as proteínas do leite tornam-se a fonte mais importante (28, 78). Portanto, algum crescimento de bactérias lácticas pode ocorrer sem que ocorra proteólise, porém para que a coagulação se processe rapidamente, a proteólise é essencial (23, 25, 66). Os estreptococos lácticos não são dotados de igual atividade proteolítica e isso pode limitar a capacidade das culturas obterem a quantidade de nitrogênio necessária ao crescimento máximo (108).

Os estreptococos contêm proteinases ácidas e neutras ligadas à parede celular que degradam a caseína a peptídeos, assegurando o suprimento destes durante a fase de crescimento (24, 66, 102). Os peptídeos podem entrar na célula bacteriana e serem hidrolisados intracelularmente pelas peptidases (66). O *S. lactis* pode também hidrolisar, extracelularmente, peptídeos a aminoácidos através de peptidases ligadas à parede celular (102).

Dentre as cepas de uma mesma espécie é possível detectar as que crescem regularmente em leite e as que atingem apenas 10 a 25% do nível máximo de crescimento alcançado pelas outras. Estas últimas são ditas de desenvolvimento lento em leite ("slow"), pois o coagulam em 48 horas a 21°C, enquanto que as outras cepas são de desenvolvimento rápido ("fast") e coagulam o leite em 18 horas a 21°C (12, 23, 25, 119). As cepas de crescimento lento caracterizam-se por uma atividade proteolítica insuficiente, porém, se fornecidos os peptídeos necessários, estas se comportam como as cepas de desenvolvimento rápido (23, 118). O desenvolvimento lento é devido à falta ou perda da atividade de enzimas ligadas à parede celular para degradar as proteínas a peptídeos. Tais cepas são denominadas proteinase negativas (Prt^-) enquanto as que apresentam estas enzimas são denominadas proteinase positivas (Prt^+) (64, 66, 77). Nas culturas de fermentos lácticos, tanto nas selecionadas quanto nas naturais, aparecem espontaneamente mutantes Prt^- na proporção de 2%

(12,23,24,25,66,102), podendo tal percentual chegar a 50% e como resposta a acidificação se torna insuficiente, com efeitos negativos ao processamento (12).

Fermento Lático

Com o desenvolvimento da indústria queijeira e a prática da pasteurização, tornou-se necessária a adição de culturas selecionadas a fim de repor a flora láctica destruída pelo tratamento térmico (46). Portanto, a pasteurização do leite para o preparo do produto e, posteriormente, a produção em larga escala, obrigaram à utilização de culturas selecionadas cujo desempenho e ação no leite são constantes ao longo do tempo, refletindo na qualidade final do produto (25, 66, 96, 99, 102, 109). Surgiu assim a necessidade de um maior conhecimento da função dos fermentos e vários estudos foram conduzidos no sentido de conhecer as suas propriedades, para poder isolá-los, selecioná-los e tipificá-los suprimindo a necessidade da indústria (46, 102). Esse trabalho tem sido realizado por órgãos governamentais, universidades e laboratórios comerciais (24, 46, 114).

Os fermentos ou culturas lácticas mesófilas (temperatura ótima na faixa de 20 a 30°C) são largamente empregadas na indústria queijeira e são divididas em três categorias de cepas ou linhagens: simples, múltiplas e mistas (19, 24, 29, 46). Teoricamente, um fermento de linhagem simples é constituído por um único tipo ou cepa de organismo, esse tipo de fermento é raramente usado na prática. As linhagens simples podem ser combinadas dando origem a culturas ou fermentos múltiplos, essa combinação é feita visando prevenir contra o ataque por bacteriófagos, contornar a intolerância ao sal, ou o efeito da temperatura de cozimento, permitindo ainda otimizar a taxa de produção de ácido utilizando linhagens rápidas e/ou lentas (65, 114). Os fermentos de linhagens múltiplas são consti-

tuídos por um número determinado de linhagens puras e, portanto, podem ser utilizadas por um período mais longo (70). O fermento de linhagens mistas é uma combinação de linhagens envolvendo espécies diferentes, como por exemplo: *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* e/ou *L. dextranicum*, etc, e cuja composição é indefinida (29, 65, 102).

As culturas lácticas termófilas (temperatura ótima na faixa de 37 a 45°C) são utilizadas na fabricação de iogurte, leite acidófilo e queijos de massa cozida (1, 19, 29, 46). Exemplos desses microrganismos são espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, que produzem ácido láctico rapidamente a temperaturas elevadas. A taxa de produção de ácido pode ser significativamente aumentada se existir uma relação simbiótica entre os microrganismos, como no caso da associação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (4, 102, 113).

Finalmente, uma atividade conjunta de bactérias lácticas mesófilas; termófilas e leveduras pode produzir uma fermentação láctico-alcoólica no leite dando origem a produtos fermentados como Kefir e Kumiss (102, 113). Nesse sentido, os microrganismos na indústria de laticínios podem ser manipulados e combinados de forma a dar origem a diferentes produtos fermentados (114).

Origem e habitat dos microrganismos lácticos

As bactérias lácticas compreendem um vasto grupo de microrganismos, com grande difusão na natureza e que podem crescer sob diferentes condições ambientais (12). São encontradas mais frequentemente em vegetais, no leite, no trato digestivo e mucosas de mamíferos (34, 87, 103). Podem também ser encontradas no solo e na água, mas somente por meio da

contaminação por animais e/ou plantas. A própria presença no leite se deve a contaminações provenientes do meio durante a ordenha e manuseio do leite (87).

Dentre as bactérias láticas, o grupo de maior importância é o dos estreptococos láticos. O *S. lactis* tem sido isolado de várias fontes, enquanto que o habitat natural do *S. cremoris* permanece desconhecido (66), existindo a hipótese de que esteja presente juntamente com o *S. lactis*, porém em números menores, não sendo, portanto, encontrado devido às diluições na técnica de isolamento (66, 100). O *S. lactis* tem sido encontrado mais frequentemente em leite cru, enquanto que o *S. cremoris* em fermentos mistos, talvez devido ao fato desta espécie ser mais resistente ao ataque de bacteriófagos (29, 66). O *S. thermophilus* é típico de leite e derivados e somente acidentalmente isolado de outros nichos ecológicos (1, 56).

Características Microbiológicas das Principais Espécies

De um modo geral, todos os microrganismos láticos caracterizam-se pela capacidade de retirar a energia necessária ao seu desenvolvimento por meio de um metabolismo fermentativo, e por não serem microrganismos putrefativos, pois são pouco proteolíticos e fracamente lipolíticos (12, 102).

Produzem ácido lático a partir de um ou mais carboidratos. São cocos e bastonetes Gram positivos, imóveis, não esporulados, catalase negativos ou variável, anaeróbios facultativos, muito exigentes do ponto de vista nutricional e não apresentam pigmentos (12, 16, 28, 47, 87, 93, 103, 111, 112).

O grupo láctico reúne mais de 50 espécies mesófilas e termófilas, das quais 36 pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, 6 do gênero *Streptococcus*, 6 do gênero *Leuconostoc* e 8 do gênero *Pediococcus* (12). De acordo com a classificação dada na 8.^a edição do "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (16), as bactérias lácticas são divididas nas famílias *Streptococcaceae* e *Lactobacillaceae*.

Streptococcaceae

Streptococcus - Esse gênero é muito complexo e contém várias espécies diferenciadas em diversos grupos. Empregando-se o critério de Lancefield, os estreptococos podem ser diferenciados em grupos sorológicos que refletem as diferentes antigenicidades (47, 103). Anteriormente, os estreptococos eram separados em 4 grupos (viridans, piogenes, láctico e enterococos) segundo os critérios de Sherman, de acordo com as características fisiológicas. Porém, com o aparecimento de novas espécies com características intermediárias, esse critério tornou-se inadequado, todavia ainda é útil em alguns casos (16). Recentemente o gênero *Streptococcus* foi rearranjado em 4 grupos: piogênicos, orais, fecais e lácticos incluindo neste último grupo o *S. thermophilus* anteriormente incluído no grupo viridans (89).

Dentre os estreptococos de interesse para a indústria de laticínios temos o *S. lactis*, o *S. lactis subsp diacetylactis*, o *S. cremoris* e o *S. thermophilus* (28). As células do *S. lactis* são encontradas em pares ou em cadeias curtas e pertencem ao grupo sorológico N de Lancefield como citado por FOSTER et alii (40) e algumas linhagens produzem o antibiótico nisina (16, 102). O *S. lactis subsp diacetylactis* difere do *S. lactis* somente pela capacidade de fermentar citrato, produzindo CO₂, acetoina e diacetil (16, 47). O *S. cremoris* pode

formar cadeias longas em leite conforme citado no Bergey's Manual (16), também pertence ao grupo N de Lancefield e se diferencia do *S. lactis* pela não produção de amônia a partir da arginina, não crescimento a pH 9,2 nem a 4% de NaCl (47). O *S. thermophilus* não é agrupado sorologicamente por falta de identificação do grupo antigênico, por isso tem sido identificado por meio de testes fisiológicos (16). Apesar do nome, não é um microrganismo termófilo no senso microbiológico, pois seu ótimo de temperatura está na faixa de 40 a 45°C podendo crescer a 50°C, mas não a 53°C. É sensível a concentrações de 2% de sal (1, 40, 56, 88). É importante para a produção de iogurte e queijos de massa cozida (113).

Leuconostoc - O nome deste gênero vem da semelhança morfológica com algas do gênero *Nostoc* (87). São células esféricas ocorrendo em pares ou cadeias e podem ser considerados como estreptococos heterofermentativos. Não são muito ativos em leite e raramente promovem a coagulação, são mesofílicos típicos e não crescem a 45°C, fermentam glucose, galactose e lactose (16). São encontrados principalmente em vegetais, podendo também ser isolados de leite e derivados, originalmente eram denominados *Betacoccus* (40, 87). A espécie de maior importância para a indústria laticínista é o *Leuconostoc cremoris*, devido à sua capacidade de produzir compostos aromáticos a partir da fermentação do citrato (102).

Pediococcus - Este gênero compreende microrganismos Gram positivos que tem tendência a formar tétrades devido à divisão celular ortogonal. São homofermentativos, produzem ácido lático DL e são microaerófilos (12, 47). O intervalo de temperatura máxima de crescimento varia de acordo com a espécie. Esse gênero é geralmente associado à fermentação de vegetais e à alterações

em bebidas alcoólicas, como a cerveja (12, 87).

Lactobacillaceae

Lactobacillus - De acordo com BRIGGS (14) foram divididos por Orla Jensen em três grupos: *Streptobacterium*, *Thermobacterium* e *Betabacterium*. O primeiro grupo compreende espécies homofermentativas, capazes de crescer a 15°C mas, geralmente, não a 45°C, tendo como ótimo a faixa de 28 a 32°C. São comumente encontrados em vegetais e leite e derivados. As principais espécies são: *L. casei* var *casei*, muito comum em queijos de massa semi-cozida e o *L. plantarum* muito difuso em forragens ensiladas e vegetais fermentados (87, 100). No grupo *Thermobacterium* encontram-se espécies homofermentativas capazes de crescer a 45°C mas não a 15°C e ótimo de temperatura entre 37 e 45°C. Esse grupo inclui espécies de grande aplicação prática, tais como: *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. lactis* (presente em queijos de massa dura), *L. bulgaricus* (presente em iogurte), *L. acidophilus* (considerado como o único lactobacilo capaz de multiplicar-se no intestino humano e por isso empregado na preparação de leite acidófilo), *L. delbrueckii* (empregado na preparação industrial de ácido láctico) e *L. leichmannii* (produção de vegetais fermentados). O grupo *Betabacterium* compreende espécies heterofermentativas com ótimo de temperatura em torno de 30°C. Podem ser encontradas em vegetais, forragens ensiladas e em derivados de leite. O *L. fermentum*, por exemplo, produz microolhaduras indesejáveis em queijo Grana (1). Esse grupo contém várias espécies, porém não são importantes em leite e derivados (103, 113).

Isolamento e Seleção das Principais Bactérias Láticas

Por volta de 1890 surgiu o interesse, por parte de alguns microbiologistas, em estudar os leites acidificados. Assim, foram isolados e caracterizados alguns microrganismos presentes nesses produtos e foram feitos estudos para se determinar quais eram os grupos mais frequentes e importantes, bem como as mudanças por eles provocadas. Tais pesquisadores contribuíram com muita informação sobre as bactérias láticas e o seu papel na conversão do leite em produtos fermentados (40).

O *Streptococcus lactis* conforme citado por COLLINS (27), foi descrito pela primeira vez por Lister em 1873 e por ele denominado *Bacterium lactis*. Fez o estudo diluindo leite acidificado, inoculando-o em leite fervido e fazendo a incubação em recipientes estéreis até a coagulação. O exame microscópico revelou ser este o microrganismo predominante e portanto causador da acidificação natural do leite (40). Em 1919, Orla Jensen (citado por COLLINS, 1962) encontrou em leite acidificado um estreptococo láctico que diferia ligeiramente do *S. lactis*. Esse microrganismo, denominado *S. cremoris*, apresentava cadeias mais longas que as do *S. lactis*, não crescia a 40°C, não produzia amônia a partir de peptona ou arginina e não fermentava maltose, sendo menos tolerante a uma série de outros tratamentos.

Orla Jensen, conforme citado por BRIGGS (14), foi também o primeiro a estudar a família *Lactobacillaceae*. Foi a partir de seus resultados que surgiu a subdivisão dos lactobacilos em três grupos, baseando-se na rotação óptica do ácido láctico por eles produzida, na fermentação de diferentes açúcares e na quantidade de ácido produzida ao se desenvolverem em leite (1, 14, 56, 93).

Nos vários trabalhos sobre isolamento de bactérias láti-

cas encontrados na literatura o procedimento utilizado é muito similar. Geralmente se inicia por um enriquecimento que pode ser feito em caldo (52), leite (52, 58, 88), leite adicionado de fatores estimulantes ao crescimento como extrato de levedura (58) e indicadores (60) como o tornassol (litmus milk), para verificar a acidificação do meio. Dependendo do grupo de microrganismos a ser isolado, são fornecidas determinadas condições de pH e temperatura. Assim, para os lactobacilos, o enriquecimento pode ser feito mediante a acidificação do meio uma vez que esse grupo de microrganismos suporta uma acidez mais elevada (16, 40, 47). Para *Streptococcus thermophilus* é comum utilizar um prévio tratamento térmico da amostra a fim de inativar parte da microflora não desejada e assim favorecer a espécie em questão (56, 88, 105).

Após o processo de enriquecimento, o cultivo enriquecido é então diluído, plaqueado e incubado em faixas de temperatura que variam em conformidade com as condições ótimas do grupo de microrganismos que se deseja isolar. O uso ou não de atmosfera controlada em relação ao oxigênio livre tem sido discutido por vários autores. KING & KOBURGER (60) tentaram o isolamento em recipiente com elevada tensão de CO_2 , porém esse procedimento não favoreceu os estreptococos lácticos. Igual resultado foi obtido por CHAMBA *et alii* (18), porém REDDY *et alii* (94), em experimentos com culturas mistas de *S. lactis*, *S. cremoris* e *S. diacetylactis*, obtiveram bons resultados ao utilizarem o método de superfície em ágar diferencial e incubação em recipiente parcialmente livre de O_2 . Essa técnica possibilitou resultados satisfatórios em 48 horas de incubação, sendo que o tamanho das colônias foi maior em comparação com o plaqueamento em profundidade e incubação aeróbica. BRIGGS (14) utilizou, para o isolamento de lactobacilos, uma atmosfera de 90% de H_2 e 10% de CO_2 (V/V). OTTOGALLI & GALLI (88) para isolamento de *S. thermo-*

philus, além da atmosfera anaeróbica, utilizaram em trabalhos rotineiros uma dupla camada de ágar para limitar a difusão de O_2 no meio.

Uma vez obtido o crescimento de colônias nas placas após o período de incubação, a etapa seguinte é a transferência de colônias para um meio líquido apropriado, como por exemplo o leite tornassolado (52). Após o período de incubação à temperatura adequada, o meio é observado quanto a redução do indicador, acidificação, produção de gás, proteólise e dessoria (107). Se as características de crescimento no leite tornassolado, coloração de Gram, não formação de esporos, morfologia e teste de catalase forem típicos de bactérias lácticas, as culturas são então submetidas a outros tipos de testes (47, 58, 81).

Os meios de cultura utilizados no plaqueamento de bactérias lácticas devem satisfazer os requisitos nutricionais complexos desse grupo (20, 24, 102, 111, 115) e por isso normalmente contêm produtos biológicos como fonte de fatores de crescimento, como por exemplo meios à base de fígado, leite, extrato de carne ou extrato de levedura (44). São citados na literatura vários meios para bactérias lácticas, porém tais meios são utilizados com diferentes propósitos (26, 37, 38, 42, 66, 67, 79, 80, 84, 88, 94, 97, 101, 115). Meios específicos para o isolamento a partir de determinadas fontes, ou para o isolamento de determinados grupos ou espécies, têm sido desenvolvidos, porém são poucos os que suportam o desenvolvimento de uma ampla variedade de microrganismos lácticos (4, 37, 111). Assim, para a enumeração diferencial a partir de iogurte foi desenvolvido o ágar de LEE (67) e para a contagem a partir de culturas mistas de estreptococos foram desenvolvidos meios diferenciais baseados nas características bioquímicas das espécies (80, 94). COX (29) alerta para o fato de que esses meios devem ser usados com cau

tela uma vez que podem existir diferenças de sensibilidade entre as linhagens. Tais meios não são tipicamente seletivos e portanto devem ser usados apenas com culturas puras, pois caso contrário resultados errôneos poderão ser obtidos (4, 80).

A escolha do meio apropriado para um certo microrganismo ou grupo de microrganismos pode depender da porcentagem esperada desse microrganismo na amostra, pois o procedimento é diverso caso haja uma microflora muito variada (4, 88). Muitos meios propiciam o desenvolvimento das bactérias lácticas mas não são seletivos, podendo portanto ocorrer o crescimento de outros grupos bacterianos (4, 20, 44), por serem muito ricos e conterem diversos fatores de crescimento.

Em estudos envolvendo o isolamento de estreptococos lácticos a partir de várias fontes, foi observado que muitos dos meios propostos para bactérias lácticas não promoviam o crescimento de linhagens mais exigentes. Por outro lado, meios que propiciavam o seu desenvolvimento apresentavam desvantagens do ponto de vista do preparo e opacidade do ágar. Foi então proposto um meio denominado ágar láctico de Elliker (37), que em estudos comparativos mostrou-se superior aos demais meios testados e propiciou o desenvolvimento de estreptococos lácticos e da maioria de outras bactérias lácticas encontradas em produtos lácteos (79), e também apropriado para contagens em silagens e outros materiais que apresentavam fermentação láctica. Entretanto, CHAZAUD (20) utilizando ágar láctico, considerado o mais seletivo para essas bactérias, encontrou que apenas 50% da microflora de leite isolada nesse meio era constituída de estreptococos lácticos.

Um meio diferencial usado para o isolamento de *Streptococcus* sp a partir de leite acidificado é o ágar lactato vermelho neu

tro (Neutral Red Chalk Lactose Agar). Esse meio pode tornar-se seletivo através da adição de acetato de tálio na proporção de 0,05% ou 500 ppm como concentração final. Tal composto inibe o desenvolvivimento de coliformes e isso é particularmente útil quando se deseja isolar estreptococos a partir de leite cru, após um enriquecicimento através de acidificação (18, 47).

CHAMBA et alii (18) utilizaram três meios de cultura para a contagem de bactérias acidificantes em 147 amostras de leite cru: Plate Count Agar com bromocresol púrpura (BCP) a 0,025 g/L, ágar látícico de Elliker com BCP e ágar lático de Elliker com BCP adicionado de 0,1% de acetato de tálio. Somente neste último houve um crescimento rápido das bactérias acidificantes, ocorrendo o aparecimento de poucas colônias de microrganismos não acidificantes. Nos outros dois meios a distinção das colônias formadoras de ácido foi difícil.

Devido à sua natureza homofermentativa, os estreptocococos láticos requerem meios tamponados para crescimento satisfatório, pois a concentração de íons torna-se fator limitante ao crescicimento (66). Normalmente, para efeito tampão, utiliza-se fosfato inorgânico, porém, tal composto, devido à sua habilidade sequestrante sobre metais alcalino-terrosos, não pode ser usado em ensaios com bacteriófagos pois ocorre precipitação de cálcio necessário à adsorção de fagos (99, 115). Assim, foi desenvolvido o meio M-16 (modificação do meio Rogosa SL) que suporta o crescimento de estreptococos usados na fabricação de queijo Cheddar e que contém um extrato de proteína vegetal (fitona ou peptona de soja) e não contém fosfato, recaindo a capacidade tamponante sobre a peptona e o acetato (115). Como a capacidade tamponante deste

meio era limitada, foi desenvolvido posteriormente o complexo meio M-17 incorporado de glicerofosfato que apresentou melhora considerável em comparação com meios não tamponados, sendo útil para o crescimento de uma ampla variedade de estreptococos lácticos e seus fagos (66).

Para o enriquecimento, isolamento e cultivo de lactobacilos, muitos meios foram propostos. O ágar acetato de tálio de Sharpe (4) baseado no meio melhorado de Briggs (14), é particularmente bom para o desenvolvimento de lactobacilos do subgênero *Thermobacterium*, porém não inibe estreptococos lácticos, sendo necessário o exame microscópico para diferenciá-los (34). Um outro meio bastante utilizado para o isolamento de lactobacilos é o ágar de Rogosa (97) que contém um alto teor de acetato e um pH relativamente baixo, tornando-o seletivo e particularmente útil no isolamento e contagem de lactobacilos em amostras cuja microflora apresenta outros grupos microbianos, tais como enterobactérias, esporulados, etc, (47). Deve-se ressaltar que contribui também para a seletividade a incubação em anaerobiose, atmosfera com 95% de H_2 e 5% de CO_2 ou, então, uma sobrecamada de meio para se obter condições de microaerobiose. Mesmo assim, dificilmente se consegue uma seletividade total, pois há ocorrência dos gêneros *Leuconostoc* e *Pediococcus* (44). O Agar Rogosa foi modificado por Mabbitt e Zielinska (47) introduzindo, como fonte de peptídeos, leite desnatado previamente digerido por tripsina, tornando-o útil no isolamento de lactobacilos dos subgêneros *Streptobacterium* e *Betabacterium*. Esse meio é indicado principalmente para o isolamento de lactobacilos de materiais que os contenham em baixos números, tais como leite fresco e queijos recentemente fabricados (34).

Para superar a variabilidade apresentada pelos meios à

base de extratos vegetais e possibilitar o desenvolvimento de espécies de *Lactobacillus* de difícil cultivo, foi desenvolvido o meio MRS, iniciais dos nomes dos autores De Man, Rogosa e Sharpe (33). Esse meio é considerado praticamente completo em nutrientes requeridos pelas bactérias lácticas, de modo que suporta o crescimento de qualquer cepa de *Lactobacillus*, entretanto possibilita também o desenvolvimento de vários outros microrganismos além dos lácticos, pois não é seletivo e nesse sentido o seu uso é aconselhável para o cultivo de linhagens previamente isoladas ou para enumeração de microrganismos em produtos onde os mesmos encontram-se em predominância (34, 44).

Outro meio largamente utilizado é o ágar APT (All Purpose Medium with Tween), desenvolvido por EVANS & NIVEN (38) para o cultivo de lactobacilos heterofermentativos e outros microrganismos que necessitem de um alto conteúdo de tiamina para o seu desenvolvimento. Também não é um meio específico para bactérias lácticas, pois sua composição garante um largo espectro de desenvolvimento bacteriano como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, coliformes, etc (44).

As bactérias lácticas tem sido amplamente estudadas devido à sua importância na produção comercial de produtos fermentados (4). As espécies mais empregadas na produção de queijos, por exemplo, são o *S. lactis* e o *S. cremoris*, sendo este último preferido em queijo tipo Cheddar por não causar defeitos como amargor e sabor de fruta (117). Entretanto, em leite cru, o *S. cremoris* é encontrado em número bem reduzido quando comparado com o *S. lactis* (66).

O *S. lactis* tem sido isolado de várias fontes, tais como vegetais congelados, queijos, leite cru e sorvete (60), porém o

seu isolamento a partir de fontes naturais é pouco citado na literatura. Em geral o isolamento é feito a partir de produtos fermentados por culturas láticas e nesse caso as culturas isoladas podem não ser selvagens ou naturais, mas sim derivadas de fermentos selecionados adicionados no processo de fabricação (65).

JENSEN & EDMONDSON (58) obtiveram o isolamento de lactobacilos a partir de leite cru e creme ácido, considerando estas fontes as melhores para o isolamento desses microrganismos.

NELSON et alii (81) encontraram que de 3.000 culturas isoladas de 59 amostras de leite cru comercial, 238 (7,9%) foram agrupadas como sendo estreptococos do grupo lático, porém essa porcentagem pode ser enganosa pois em 54,2% das amostras, ou seja, trinta e duas, não foram encontrados estreptococos do grupo lático, e em 9 amostras o número excedeu a 1.000/mL. CHOMAKOV (21) estudou as bactérias láticas presentes em leite cru e pasteurizado destinado à produção de queijo branco curado na forma de pickles (white pickled cheese), utilizando para o isolamento o meio de Rogosa (97) e o de Mabbit e Zielinska (47). Das 36 linhagens isoladas de leite cru, 31 eram *L. casei*, uma *L. plantarum*, duas *L. cellobiosus* e duas não foram identificadas. Das 9 culturas isoladas do leite pasteurizado, 7 eram *L. casei*, uma *L. brevis* e uma permaneceu não identificada.

A necessidade do isolamento de novas linhagens de estreptococos láticos para a produção de queijos foi enfatizada por SANDINE et alii (100).

Existem vários critérios de seleção de cepas para a composição de um fermento lático para queijos, tendo-se como requisitos básicos a capacidade de produção de ácido lático e a promoção de transformações desejáveis durante o processamento e a cura (29, 46, 50). Outros parâmetros para a seleção podem ser estabelecidos

em função do processo de fabricação, sendo esse princípio bastante desenvolvido na Nova Zelândia, por exemplo (50, 65). Segundo COX (29), corre-se grande risco ao se empregar na manufatura de queijos, culturas recém isoladas sem uma prévia avaliação experimental, pois cepas altamente acidificantes podem provocar problemas de textura e sabor no produto final.

HEAP & LAWRENCE (48) citam algumas das características normalmente utilizadas na seleção de culturas lácticas, tais como: taxa de produção de ácido a 22°C e a 40°C, não produção de substâncias inibidoras e resistência a bacteriófagos.

Um fator muito importante na seleção de uma cultura é a sua habilidade em produzir certa quantidade de ácido durante o processo de fabricação. Nesse sentido várias tentativas tem sido feitas na busca de um teste de atividade que prediga a produção de ácido no tanque de processamento, tendo em vista a dificuldade prática para se testar todas as cepas isoladas através da fabricação de queijos (50). São encontrados na literatura vários métodos para a avaliação da atividade de um fermento (5, 45, 50, 106, 110), porém é difícil simular, no laboratório, as condições reais de fabricação (50) e há somente uma correlação geral entre um teste conduzido sob condições padronizadas e a atividade na indústria (27, 66). Em geral, espera-se que a velocidade na produção de ácido nas condições do teste seja semelhante também na massa do queijo (55). É importante levar em conta o tipo de tratamento térmico sofrido pelo leite, já que substâncias inibidoras e estimulantes podem ser destruídas ou formadas durante o aquecimento (6, 55, 108). Geralmente recomenda-se para o teste de atividade, a temperatura de 30°C por estar próxima da temperatura em que a produção de ácido é normalmente maior (29, 55). Esse valor é adequado quando as temperaturas de cozimento são inferiores a 35°C, porém em queijos onde a tem

peratura excede esse valor durante a fabricação, é desejável utilizar no teste condições de temperatura de acordo com aquela empregada na prática, pois segundo BABEL (6) e DUTTA et alii (36), as bactérias lácticas diferem grandemente na sua resistência às temperaturas de cozimento.

Outros autores recomendam que, além da taxa de acidificação, uma prova organoléptica e uma avaliação da consistência do coágulo sejam utilizadas na seleção (62). LEGG (68) utilizou linhagens simples para a produção de vários tipos de queijos, fazendo a seleção baseando-se no pH atingido após um dia de fabricação e no sabor final do queijo após a maturação e COX (29) recomenda para a seleção de culturas uma boa performance tanto durante a fabricação como no final da maturação. Para uma seleção mais criteriosa, além dos requisitos acima mencionados, alguns investigadores recomendam a avaliação do teor de peptídeos amargos formados durante o crescimento em leite (9). KLIMOVSKII et alii (61) encontraram que o amargor apresentado pelas culturas estava, em geral, relacionado com o conteúdo de peptídeos amargos expressos em porcentagem de alanina, chegando inclusive a estabelecerem valores classificando as cepas estudadas como produtoras ou não de amargor. MARCOS et alii (74) assinalaram a importância da determinação da atividade proteolítica para a seleção de fermentos para a indústria.

VEDAMUTHU et alii (117), após vários ensaios, selecionaram três fermentos comerciais mistos para queijo tipo Cheddar, sendo que dois destes fermentos produziam queijos com textura aberta e um aroma adocicado lembrando frutas (fruity fermented flavour), enquanto que o outro produzia queijos com as características desejadas. Os experimentos permitiram concluir que nenhuma diferença significativa nas taxas de degradação de açúcar e proteínas foi encontrada entre as três culturas, porém as culturas associadas à

produção de queijos defeituosos apresentavam uma maior taxa de sobrevivência ao processo de fabricação. Além disso, estas culturas apresentavam cepas de *S. lactis* e *S. diacetylactis* altamente produtoras de compostos carbonílicos, ao passo que o fermento normal apresentava cepas de *S. cremoris* fracamente produtoras desses compostos. Observaram, ainda, que espécies de estreptococos lácticos que produziam de 19 a 20 ppm de compostos carbonílicos, geralmente davam problemas de aroma de fruta em queijos. Sugeriram então, ser este mais um critério na seleção de cepas para a produção de queijos de boa qualidade.

BABEL (6) assinala a conscientização por parte dos fabricantes de queijo de que as bactérias lácticas, além das propriedades acidificantes, apresentam diferenças no grau de sobrevivência às temperaturas de cozimento da massa e na velocidade de produção de ácido após a salga, afirmando ainda que diferentes culturas produzem queijos com corpo, textura e sabor diferentes.

DILANYAN et alii (35) sugeriram que a seleção de cepas deve ser feita não só com base na intensidade de produção de ácido e formação de aroma, mas também na habilidade em acumular aminoácidos característicos daquele tipo de queijo em particular.

BOTTAZZI et alii (11) estudaram a microflora de soro fermento de várias regiões da Itália e correlacionaram as características dos principais grupos de bactérias com a qualidade dos queijos. Puderam assim estabelecer parâmetros tecnológicos para a avaliação de soro fermento para queijo parmesão. Um trabalho semelhante foi realizado por MARTLEY & LAWRENCE (76), os quais concluíram que para o queijo Cheddar apresentar boas características de sabor e aroma o fermento láctico deve apresentar os seguintes requisitos: baixa sobrevivência e baixa atividade proteolítica quando cultivado em leite desnatado pasteurizado contendo de 4 a 5% de NaCl, pH

5,0 e a 13°C; baixa taxa de divisão celular à temperatura normal de cocção do queijo Cheddar (37,5 a 38,5°C), resultando assim em uma baixa população na massa. Outros autores (17, 82, 91) estudaram a microflora de queijos produzidos a partir de leite cru e que apresentavam boa qualidade, e a partir de tais informações compuseram um fermento contendo as principais bactérias encontradas nesse produto.

SOZZI (105) estudando a microflora de fermentos naturais, isolou cepas rápidas de *S. thermophilus* capazes de coagular o leite em 3 horas a 40°C e sugeriu que esta característica poderia ser usada para isolamento e classificação dessa espécie.

LAWRENCE et alii (65) ressaltaram a constante necessidade de isolamento e seleção de novas cepas para substituir aquelas que apresentam problemas durante o seu manuseio industrial, como por exemplo a sensibilidade a bacteriófagos. Esses autores descreveram um procedimento através do qual pode-se saber se determinada cepa é adequada para compor um fermento múltiplo destinado à fabricação de Cheddar. Os primeiros testes desse procedimento referem-se a propriedades fisiológicas das linhagens, enquanto que os outros estão relacionados com a sensibilidade ao ataque por bacteriófagos. Nesses testes as culturas são avaliadas quanto a aparência da colônia em meio BCP (19), habilidade de coagular leite reconstituído estéril a 22°C em 18 horas, atividade em um teste simulando as condições de fabricação de queijo, contagem de células viáveis após esse teste, sensibilidade à temperatura, sensibilidade ao sal, tolerância a antibióticos, sobrevivência em soros industriais contendo fagos, determinação da relação fago-hospedeiro, adsorção de fagos e indução de fagos por luz ultra violeta. Posteriormente, as linhagens que passaram por essa seleção são testadas quanto à compatibilidade com outras cepas para comporem fermentos múltiplos,

são realizados testes a nível industrial em pequena escala e só em tão liberadas para uso industrial (65).

Manutenção das Culturas Láticas

Seja qual for a forma escolhida para a manutenção das culturas ou fermentos láticos, esta não deve alterar a atividade dos mesmos (66). Os estreptococos láticos normalmente produzem quantidade de ácido suficiente para abaixar o pH do meio a valores inferiores a 5,0, e a partir deste valor as condições são inadequadas para que haja multiplicação celular, embora possa ainda haver metabolismo de carboidratos (13, 66). É conhecido o fato de que as culturas perdem a atividade com uma incubação prolongada em leite (29, 50, 65, 98) e segundo LAWRENCE et alii (66), embora seja o leite o melhor meio de cultura para a manutenção, há necessidade de se limitar o conteúdo de lactose e a concentração de íons hidrogênio na fase estacionária da cultura. Portanto, meios de cultura tamponados e com teor reduzido de lactose seriam mais apropriados à manutenção (29, 66, 72, 116).

Na prática, as culturas selecionadas precisam ser preservadas a fim de que se tenha sempre à mão um inóculo para se recorrer em casos de contaminação ou falha, além disso o inóculo repicado sucessivamente pode dar origem a linhagens mutantes com características e comportamento diferentes do fermento original (64, 116). Segundo TAMIME (114) as culturas para queijo podem ser repicadas até 50 vezes sem o risco de surgirem problemas com mutantes, enquanto que as culturas de iogurte não devem ser repicadas mais do que 15 a 20 vezes.

Dependendo da necessidade e das condições, as culturas láticas podem ser armazenadas ou estocadas na forma líquida, con-

centrada ou desidratada (71). A forma líquida é a mais popular e amplamente utilizada na indústria, simplesmente refrigerada ou congelada (114). As culturas são preservadas em pequenas quantidades e para alcançar o volume requerido de fermento industrial é necessário um sistema progressivo de repicagens até alcançar o volume desejado (71, 72, 114).

As culturas líquidas podem ser preservadas por meio de congelamento na presença de agentes criogênicos (43, 116) para manter a atividade, em temperaturas facilmente obtidas em congeladores comerciais (-20°C a -40°C) (43, 114). O congelamento em nitrogênio líquido a -196°C , tem sido considerado o melhor método de preservação sendo, todavia, um processo caro (102, 114). O aumento da concentração celular antes do congelamento tem recebido considerável atenção nos últimos anos (43, 71, 72). LLOYD & PONT (73) concluíram que os processos descontínuos de crescimento são mais adequados à concentração de fermentos do que os processos contínuos e os melhores rendimentos (aproximadamente 10^{10} UFC/mL) foram obtidos com incubação a $30 - 32^{\circ}\text{C}$ e pH mantido entre 6,0 e 6,3 utilizando como neutralizante o NH_4OH (116). Existem diferentes sistemas para a concentração de células, sendo que o emprego de separadores ou centrífugas pode causar dano físico às células. A simples neutralização do meio de cultura ainda deixa a ação inibitória da água oxigenada e do lactato formados durante a fermentação (43). Com o emprego da técnica de difusão (ultrafiltração) desenvolvido por OSBORNE (85), utilizando uma membrana pela qual difundem o lactato e outros metabólitos formados, é possível um maior grau de concentração (10^{11} UFC/mL).

O desenvolvimento da técnica de concentração antes do congelamento dos fermentos tornou possível a inoculação direta do leite para a fabricação de queijos e iogurte, dispensando assim as

etapas intermediárias no preparo do fermento (24, 43, 71, 102).

Os fermentos podem ainda ser encontrados sob a forma desidratada. Vários processos de secagem foram desenvolvidos para eliminar o trabalho envolvido nas repicagens periódicas para a manutenção de culturas líquidas e facilitar na distribuição (102, 114). Atualmente o mais utilizado é a liofilização, pois apresenta taxas de sobrevivência mais altas, porém, mesmo com o uso de agentes crioprotetores, as culturas tendem a apresentar uma fase prolongada de adaptação (102) e por isso são mais utilizadas como inóculo para o preparo da cultura-mãe. Para a inoculação direta são necessárias grandes quantidades de fermento e um período de incubação maior, porém se forem utilizadas culturas concentradas antes de serem liofilizadas a inoculação direta torna-se viável (71, 102, 103).

Além do aspecto de manutenção vários fatores podem influenciar no desempenho de uma cultura (24, 55, 64, 65, 99) e os principais são: substâncias inibidoras no leite, variabilidade das culturas e inibição por bacteriófagos.

Para a cura da mastite e outras doenças que atacam o gado são utilizados vários antibióticos o que resulta na ocorrência destes no leite (19, 29, 46, 65, 99). O grau de inibição de uma cultura láctica em leite contendo antibióticos está relacionado com o tipo de antibiótico, com a sua concentração e sensibilidade da cultura (5). REINBOLD & REDDY (95) em um teste utilizando 30 antibióticos e diferentes agentes antimicrobianos, concluíram que os estreptococos lácticos, bem como as culturas de iogurte, eram sensíveis a todos os antibióticos testados. Embora o desenvolvimento de mutantes resistentes seja possível, tentativas para desenvolvê-los tem se mostrado infrutíferas, pois a resistência a drogas por parte dos estreptococos lácticos vem acompanhada pela perda de capacidade de produzir ácido rapidamente, tornando estas cepas inviáveis

para o uso industrial (99).

Dentre os testes para a detecção de antibióticos, aquele que utiliza esporos de *Bacillus stearothermophilus* tem se mostrado o mais sensível. A aplicação deste teste ajuda na identificação de lotes suspeitos de conterem substâncias inibidoras (99). A sensibilidade de fermentos termófilos à penicilina é maior do que a dos mesófilos, por isso o *S. thermophilus* tem sido usado com microrganismo-teste na detecção de antibióticos (29).

Além de antibióticos, resíduos de detergentes alcalinos, materiais à base de cloro, iodo e composto de amônio quaternário podem afetar a atividade do fermento (5, 114). A contaminação com tais compostos é devida a falhas humanas ou problemas no ciclo automático de limpeza, sendo necessário, portanto, que a operação de enxague seja efetuada cuidadosamente para que a remoção de produtos químicos seja eficiente (114).

O leite contém sistemas inibidores naturais que são ativos contra os estreptococos lácticos: o sistema H_2O_2 -tiocianato-lactoperoxidase e aqueles devido às aglutininas bacterianas, anticorpos naturais e lacteninas (19, 29, 66). O colostro, o leite de retenção e o leite mastítico apresentam um alto conteúdo de aglutininas não específicas, as quais podem causar o agrupamento e sedimentação das células mais sensíveis (99), porém a ação inibidora desses anticorpos é de menor importância uma vez que são inativados durante o aquecimento e homogeneização no tratamento do leite para o preparo do fermento (19, 29, 66, 114).

Com relação a variabilidade, os estreptococos lácticos são instáveis na produção de ácido (99) e linhagens lentas, que perderam a capacidade de produção de proteinases necessárias à obtenção de nitrogênio para o crescimento e produção de ácido, são frequen

temente encontradas (23, 66, 102, 115). Outro fator que pode concorrer para a diminuição da taxa de acidificação é a perda da capacidade de fermentação da lactose (64, 99, 102). Têm sido isoladas variantes que diferem na capacidade de produção de ácido, isto é, nos genes que controlam o transporte de lactose (lac) e síntese de proteínase (prt) bem como na sensibilidade a diferentes bacteriófagos (64). Mutantes fago-resistentes surgem espontaneamente nas culturas, porém, poucos tem sido isolados que possuam a atividade acidificante semelhante à linhagem original (64).

Deve-se estar atento às mudanças que podem ocorrer durante repicagens sucessivas de uma cultura, a fim de se evitar a utilização de um fermento cujas características já foram alteradas (29,64). Daí a necessidade de se renovar periodicamente o inóculo, partindo-se de um inóculo em estoque (114).

Um dos maiores problemas na indústria de transformação do leite tem sido a inibição das culturas lácticas por bacteriófagos ou fagos, que atacam e destroem as células causando a falha na produção de ácido (24, 29, 30, 65, 99). Dentre os microrganismos lácticos, os estreptococos e os lactobacilos são os mais vulneráveis ao ataque de bacteriófagos (114).

A ocorrência de bacteriófagos em culturas lácticas foi citada pela primeira vez por Whitehead e Cox e desde então vem sendo muito estudados (29, 64, 65, 66, 114). Foram encontrados fagos em soros industriais, em leite cru (51, 65) e demonstrada a lisogenia em estreptococos lácticos, o que sugere que a indução de fagos a partir desses fermentos poderia ser uma fonte de infecção nas indústrias (24, 48). Segundo LAWRENCE (64), uma situação de não existência de fagos na indústria é praticamente impossível de ser atingida. O importante são as medidas que visam evitar a proliferação e aumento dos níveis fágicos, sendo a principal delas o uso de linha

gens não hospedeiras-potenciais para os fagos presentes e não relacionadas entre si com respeito à sensibilidade a bacteriófagos(65). Por isso LAWRENCE (64) recomenda o uso contínuo de uma cultura múltipla ou de uma cultura mista ao invés da rotação de culturas mistas de composição indefinida.

Avanços Genéticos relacionados com Bactérias Láticas

A frequência do aparecimento espontâneo de variantes Prt, Lac e também Nis (nisina) negativos, bem como a natureza irreversível de tais alterações, indicam a existência de determinantes genéticos extracromossômicos (plasmídeos) (12, 66). Um plasmídeo pode ser definido como um replicon estávelmente hereditário que se encontra em um estado extracromossômico. São pequenas moléculas de DNA circular que tem a capacidade de conferir à célula hospedeira uma função genética conhecida (12, 31).

Muitas das propriedades das bactérias láticas parecem estar relacionadas com plasmídeos e McKay e colaboradores, como citado por DAVIES et alii (32), foram os primeiros a sugerirem uma associação entre o metabolismo da lactose e os genes extracromossômicos em *S. lactis* C₂.

O metabolismo da lactose é um processo com muitas etapas e portanto é improvável que todos os genes envolvidos sejam codificados por plasmídeos (32). Outra propriedade importante das bactérias láticas que parece ser codificada por plasmídeos é a produção de enzimas proteolíticas, porém dados precisos ainda não foram obtidos (32, 64). Uma perda simultânea das atividades sobre lactose e proteína sugere que estes caracteres estejam ligados e possam estar situados no mesmo plasmídeo (32).

Dos quatro métodos potenciais de transferência de genes,

foram descritos três para estreptococos lácticos: transdução, conjugação e fusão de protoplasto (32). Portanto, por meio da troca de material genético, linhagens de fermentos poderiam ser manipuladas geneticamente (99). A possibilidade de transferir, de uma célula bacteriana a outra, novos caracteres estáveis abre novas perspectivas de uma futura aplicação prática (12, 102).

MATERIAIS E MÉTODOS

Durante o decorrer do presente trabalho foram empregados os materiais normalmente encontrados em um laboratório de microbiologia de alimentos.

Amostras

Amostras de leite cru tipo B foram colhidas, em tubos de ensaio estéreis com tampa rosqueável, de latões ou de carretas recebidas por usina de processamento de leite em Campinas - SP. Após a coleta, as amostras eram transportadas e mantidas sob refrigeração, por um período máximo de 4 horas, até o início dos ensaios.

As amostras de leite pasteurizado tipo B e Especial, utilizadas no presente trabalho, foram adquiridas no comércio de Campinas.

Os queijos utilizados para o isolamento eram produtos de boa qualidade e fabricados por processos empíricos, sem a utilização de fermentos comerciais e, portanto, resultado de uma fermentação promovida por fermentos selecionados no nosso próprio meio.

Culturas

Para fins comparativos foram empregadas culturas comerciais do tipo BD (fermento misto composto de cepas de *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. diacetilactis* e *Leuconostoc cremoris* da Christian Hansen) e culturas puras de *S. lactis* e *S. cremoris* provenientes de laboratórios especializados ou coleções de culturas lácticas.

Meios de Cultura

Os meios de cultura empregados foram preparados segundo a indicação do fabricante ou, para o caso dos meios formulados, segundo recomendações do autor.

- Ágar padrão (Standard Plate Count Agar - Difco)
- Ágar suco de tomate (Tomato Juice Agar - Difco)
- Ágar APT (All Purpose Medium with Tween - Difco)
- Ágar M-17 (115)
- Ágar M-16 modificado pela adição de 0,4% de cloridrato de L-argi
nina e 0,1% de solução 5% de bromocresol púrpura (ágar BCP)
pH 6,8 (19, 65, 80)
- Leite tornassolado (Litmus milk - Difco)
- Caldo M-17 (M-17 Broth acc. to TERZAGHI - MERCK)
- Leite desnatado reconstituído - assepticamente, 10 g de leite em
pó desnatado (Molico, Nestlé) eram transferidas para um erlenmeyer previa-
mente esterilizado e dissolvidas em 91 g de água destilada esté-
ril pré-aquecida a 40°C. O erlenmeyer contendo o leite era colo-
cado em banho de água fervente por 10 minutos e posteriormente
resfriado a temperatura ambiente, o leite colocado em tubos de
ensaio estéreis nas quantidades requeridas em cada teste.
- Pré-fermentado para enriquecimento - Um litro de leite tipo B era
aquecido até a ebulição, resfriado até 45°C, inoculado com 2,5%
de uma cultura de iogurte ativa (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*)
e distribuído em tubos em quantidades de 10 mL. A seguir, os tu-
bos eram incubados a 45°C até que se desenvolvesse acidez sufi-
ciente para abaixar o pH a 5,5. Após essa acidificação eram ime-
diatamente autoclavados a 121°C/10 minutos. O aspecto, após a es-
terilização, era o de um leite coagulado com ligeira dessoragem.

Matéria-prima

Na fabricação dos queijos foi utilizado leite cru possuindo acidez média de 17°D (pH 6,6) e teor de gordura de 3,5%.

Coagulante

Nos ensaios a nível de planta piloto, para o queijo Minas frescal foi utilizado como coagulante do leite, coalho líquido (HA-LA, Christian Hansen) na proporção indicada no rótulo e para o queijo Minas meia cura, coalho em pó da mesma marca, sendo ambos diluídos em água destilada antes da adição no leite.

Cloreto de Cálcio

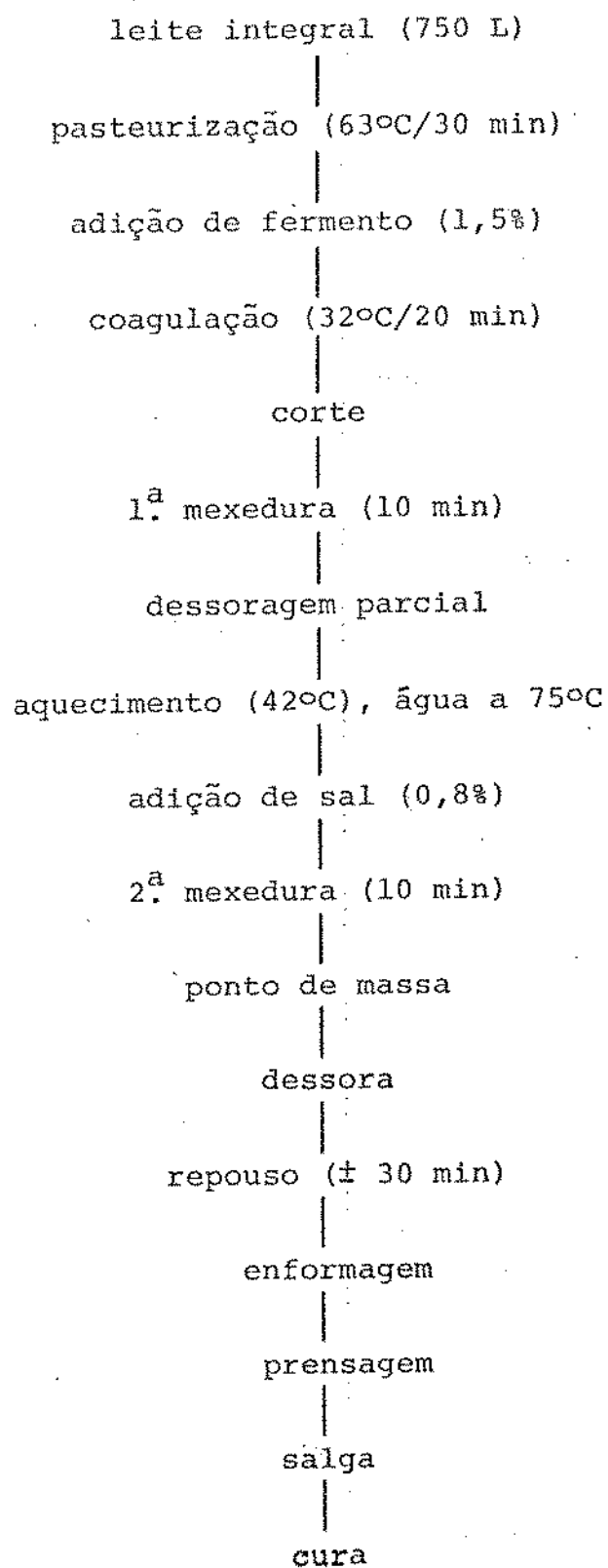
Foi adicionado ao leite o volume de solução de CaCl_2 50% necessário à obtenção de uma concentração final de 250 ppm (25 g em 100 L).

Técnicas de Fabricação de Queijos

Os queijos foram fabricados utilizando-se a tecnologia tradicional (69, 104) e empregando-se a pasteurização lenta do leite (63°C/30 minutos), procurando obter queijos com teores de umidade médios ao redor de 57% e 43% para os queijos Minas frescal e meia cura, respectivamente.

Para os queijos fabricados no teste a nível industrial, foi seguido o seguinte fluxograma:

Fluxograma do processamento de queijo Minas meia cura (teste a nível industrial)



Preparo do fermento láctico

O fermento láctico utilizado nos processamentos foi preparado inoculando-se as culturas ativas a razão de 1% em leite integral estéril. Após a incubação a 23°C durante aproximadamente 18 h, o fermento era resfriado e armazenado sob refrigeração, até a sua utilização, por um período não superior a 3 dias.

O fermento utilizado no teste a nível industrial foi preparado com leite tratado termicamente a 90°C durante 2 horas. Após o resfriamento, o leite foi inoculado com 1% das culturas - teste, incubado a temperatura ambiente até a coagulação e mantido posteriormente em câmara frigorífica até a sua utilização.

Determinações Analíticas

Amostragem dos queijos

Foram retiradas amostras em forma de cunha com aproximadamente 150 g, segundo método recomendado pelas Normas Britânicas (15). No caso de queijos maturados, a casca foi desprezada e a amostra triturada em gral até obtenção de uma pasta homogênea utilizada nas determinações analíticas.

Acidez

O pH do queijo foi medido diretamente na pasta com potenciômetro Micronal modelo B221 (41).

O pH final atingido pelas culturas foi medido com titulador automático Mettler DL 40. Foi também determinada a acidez Dornic (54) utilizando-se o titulador automático e NaOH N/9.

Umidade

As determinações de umidade do queijo fresco e do queijo maturado foram conduzidas em estufa atmosférica a 100°C - 110°C até peso constante (41, 63).

Gordura

Para a determinação da porcentagem de gordura no queijo utilizou-se o método volumétrico Gerber-van Gulik (41, 54).

Proteína

A extração da proteína solúvel foi feita segundo KOSIKOWSKI (63) e as determinações de nitrogênio total e solúvel segundo o método de Kjeldahl recomendado pela A.O.A.C. (2). O fator de conversão da porcentagem de nitrogênio para porcentagem de proteína foi de 6,38.

Cloreto de Sódio

A porcentagem de sal no queijo foi determinada pelo método clássico de Volhard, titulando-se o excesso de nitrato de prata com tiocianato de potássio segundo metodologia recomendada pela A.O.A.C. (3).

Índice de Maturação

O índice de maturação (I.M.) dos queijos foi calculado através dos valores de proteínas totais (P_t) e proteínas solúveis

(P_s), relacionados por $I.M. = (P_s/P_t) \cdot 100$ (41).

Análise Sensorial

A análise sensorial dos queijos foi efetuada após 20 dias de cura. Foi aplicado o teste de preferência - Escala Hedônica de 7 pontos (Ficha anexa - Figura 1). A equipe de provadores era formada por 10 elementos sendo cinco especialistas na área de leite e derivados.

Densidade Ótica

Para a medida da densidade ótica das culturas em leite, foi adotado o método desenvolvido por KANASAKI (59), que consiste na clarificação da cultura com o sequestrante de cálcio EDTA, em solução alcalina e a temperaturas de refrigeração.

A 0,5 mL da cultura em leite eram adicionados 4,5 mL de uma solução 0,2% de EDTA a pH 12,2 e, após leve inversão dos tubos para homogeneização evitando incorporação de ar, era feita a determinação da densidade ótica a 410 nm (50). Uma amostra de leite não inoculada e incubada sob as mesmas condições, era utilizada para prova em branco.

Atividade Proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica foi utilizado o método de HULL (53), seguindo as recomendações de CITTI *et alii* (22), onde a 5,0 mL de cultura (em leite desnatado reconstituído após 15 horas a 21°C) eram adicionados 1 mL de água destilada e 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,72 N. Após agitação e

Figura 1 Ficha do teste de preferência - Escala Hedônica de 7 pontos

Avalie cada amostra de queijo quanto ao sabor, corpo e textura.

<u>SABOR</u>	<u>CORPO E TEXTURA</u>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Extremamente desejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Extremamente desejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Moderadamente desejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Moderadamente desejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Ligeiramente desejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Ligeiramente desejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Nem desejável Nem indesejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Nem desejável Nem indesejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Ligeiramente indesejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Ligeiramente indesejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Moderadamente indesejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Moderadamente indesejável</p> </div> </div>
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Extremamente indesejável</p> </div> </div>	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; height: 100px; margin-right: 10px;"></div> <div> <p>Extremamente indesejável</p> </div> </div>

Descreva os tipos de defeitos encontrados:

Defeitos de Sabor

Defeitos de Corpo e Textura

repouso de 10 minutos, era filtrado em papel de filtro Whatman 41, e a 5 mL desse filtrado eram adicionados 10 mL de uma solução de carbonato pirofosfato (75 g de carbonato de sódio anidro e 10 g de metafosfato de sódio) e 3 mL de reagente de Folin Ciocalteau (1:2 em água). Após repouso de 5 minutos era feita a medida da % de transmissão a 650 nm, e por meio de uma curva padrão de tirosina calculava-se a concentração de tirosina na amostra, descontando-se o valor do branco (leite não inoculado, incubado sob as mesmas condições e tratado como a amostra).

Teste de Sensibilidade ao Cloreto de Sódio

Leite desnatado reconstituído foi medido assepticamente em provetas estéreis e dispensado em enlenmeyers previamente esterilizados contendo a quantidade de NaCl necessária para obter concentrações de 1 e 2%. Após a dissolução, o leite foi distribuído assepticamente em quantidades de 9,8 mL em tubos de ensaio esterilizados. Para cada porcentagem de sal foram inoculados dois tubos com 0,2 mL de cada cultura-teste, bem como duplicatas sem adição de sal. A incubação foi efetuada a 30°C por 5 horas e após esse período, feita a determinação de pH.

Teste de Sensibilidade a Bacteriófagos

Foi utilizado procedimento semelhante ao descrito por HEAP & LAWRENCE (48). Em cada tubo de ensaio estéril eram adicionados 0,2 mL de uma cultura ativa em leite, 0,2 mL de uma mistura de fagos (0,1 mL de soro industrial e 0,1 mL de caldo M-17 contendo fago homólogo da cultura *S. cremoris*), e deixado em repouso por 10 minutos, a seguir adicionava-se a cada tubo 9,6 mL de leite desna-

tado reconstituído e incubava-se a 30°C/5 horas. A prova era realizada em duplicata e, como controle para cada cultura, incubava-se 9,8 mL de leite desnatado reconstituído adicionado de 0,2 mL de cultura. Após o período de incubação um dos tubos era usado para a determinação de pH e comparação com o controle, enquanto que o outro era utilizado para separação do soro por meio de centrifugação a 3000 rpm/5 minutos. Esse soro era transferido assepticamente para tubo estéril e guardado sob refrigeração para ser utilizado no teste do dia seguinte no lugar da mistura de fagos. Prosseguiu-se com as repicagens sucessivas até o oitavo dia. Quando o tubo destinado à centrifugação não estava coagulado era necessária a adição de ácido lático para obtenção do soro.

Produção de Substâncias Inibidoras

O procedimento adotado foi semelhante ao descrito por DAVEY & PEARCE (31). Uma gota das culturas em caldo M-17 (30°C/18 horas) foi inoculada com pipeta Pasteur em 3 pontos da superfície de ágar M-17 solidificado em placas de Petri. A seguir, com uma alça foram feitas três pequenas incisões no ponto de inoculação e as placas deixadas em repouso até o inóculo ser absorvido pelo ágar, sendo então incubadas a 30°C por 18 horas. Após a incubação, 0,1 mL de uma suspensão em caldo M-17 do microrganismo indicador (*S. cremoris*) e 2,5 mL de ágar M-17 semi-sólido (0,45% de ágar) foram colocados sobre o ágar formando uma sobrecamada e novamente levadas a incubação por mais 18 horas. Em caso afirmativo de inibição, havia a formação de um halo ao redor dos pontos de inoculação da cultura em questão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enriquecimento

Com a intenção de se obter leite cru apresentando uma microflora bem variada, as amostras foram obtidas de diferentes regiões e provenientes de diversos produtores. De acordo com a temperatura em que essas amostras foram incubadas, houve o favorecimento de determinados grupos de microrganismos. Em conformidade com a literatura, o procedimento mais simples para se promover o enriquecimento de bactérias láticas foi através da incubação de leite cru até que se observasse coagulação. As temperaturas de incubação foram adotadas de acordo com o grupo desejado e por períodos de 16 a 24 horas.

No presente trabalho, as amostras incubadas em condições ambientais (25 a 30°C) coagularam em cerca de 24 horas e houve um predomínio de cocos Gram positivos. Ao se prorrogar a incubação por um período de 72 horas, houve o aparecimento de bastonetes Gram positivos em associação com os cocos. Por esse processo, foi possível o enriquecimento necessário para obter o isolamento de estreptococos láticos mesófilos com certa facilidade, partindo-se de amostras de leite cru.

Estes resultados vem confirmar dados anteriormente obtidos por KING & KOBURGER (60) no enriquecimento de estreptococos láticos mesófilos, por meio da inoculação direta das amostras em leite tornassolado e incubação a 22°C/24 a 48 horas. Concordaram também com as observações de HARRIGAN & MACCANCE (47), sobre a predominância de *S. lactis* como principal agente na acidificação natural de leite, representando 90% da microflora total.

Normalmente, se a temperatura de incubação das amostras

de leite cru situar-se na faixa de 40 a 50°C, ou seja, em torno de 45°C, há a possibilidade de se obter o enriquecimento dos microrganismos lácticos comumente denominados termófilos. Entretanto, no presente trabalho, ao se adotar esse procedimento, a flora dominante não apresentou características de bactérias lácticas, pois a mesma promovia uma reação proteolítica bastante pronunciada, nem sempre acompanhada de coagulação. Ao se fazer um esfregaço dessa suspensão para exame microscópico, constatou-se um predomínio de cocos Gram positivos. Porém, pelas características de crescimento em leite, tais como: ausência de coágulo típico, presença de proteólise e odor desagradável, foi possível concluir não se tratar de bactérias lácticas pertencentes ao grupo de fermentos termófilos.

Em vista do insucesso na promoção do enriquecimento de bactérias lácticas termófilas pela simples incubação de amostras de leite cru a 45°C, foi tentado um prévio tratamento térmico a 55°C por 15 a 30 minutos antes da incubação das amostras. Esse tratamento visava selecionar as bactérias lácticas que são relativamente resistentes ao aquecimento a temperaturas dessa ordem. Entretanto, embora tenha havido alguma melhora, houve ainda predomínio de microrganismos proteolíticos não tipicamente lácticos. Esse resultado diferiu daquele obtido por POLLITI & OTTOGALLI (90), pois tais pesquisadores obtiveram o enriquecimento de estreptococos termófilos por meio de um tratamento térmico ou pré-incubação do leite a 50°C por 3 a 5 horas.

Posteriormente, tentando ainda o enriquecimento de bactérias lácticas termófilas, buscou-se um meio que pudesse apresentar uma seletividade em favor dos microrganismos desejados. Partindo-se do princípio que as bactérias lácticas são razoavelmente tolerantes à acidez, optou-se pelo desenvolvimento de um meio onde havia sido induzida uma pré-acidificação do leite por meio de uma

cultura lática, como por exemplo, uma cultura de iogurte. Nesse sentido, o leite pré-acidificado até um pH em torno de 5,5 foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavado e utilizado como meio de enriquecimento. Cerca de 5 a 10% de leite cru era inoculado no meio pré-fermentado e incubado a 45°C por 24 horas, obtendo-se assim, um excelente resultado no enriquecimento de lactobacilos pertencentes ao grupo de bactérias láticas termófilas. O sucesso obtido nesse experimento possivelmente foi devido à somatória do efeito da acidez e produção de algum fator estimulante ao crescimento durante a pré-fermentação com uma cultura lática (47, 93). HILL & THORNTON (52), em tentativas visando promover o enriquecimento de lactobacilos, utilizaram leite desnatado reconstituído e com ajustes de pH por acidificação direta, porém, apesar de uma melhora, os resultados desses autores foram considerados insatisfatórios, não sendo obtido portanto, o enriquecimento por meio desse procedimento.

Antes de prosseguir com o isolamento, as amostras enriquecidas em meio pré-fermentado eram repicadas em leite tornassolado visando facilitar a observação das características de crescimento em leite e assim selecionar as culturas com maior indicação de serem láticas.

Embora com o processo de enriquecimento em leite pré-fermentado tenha havido o aparecimento de estreptococos, possivelmente o *S. thermophilus*, a predominância de lactobacilos dificultava o seu isolamento, sendo essa espécie mais facilmente encontrada após enriquecimento, por incubação a 45°C/24 horas, de leite pasteurizado encontrado no comércio. Procedimento semelhante foi utilizado por OTTO GALLI & GALLI (88) para obter o enriquecimento de estreptococos termófilos.

Isolamentos

Uma vez obtido o enriquecimento dos microrganismos láti-
cos desejados, os quais eram reconhecidos por meio de suas caracte-
rísticas de crescimento em leite, tais como: coágulo firme, ausên-
cia ou um mínimo de produção de gás, ausência de proteólise e ca-
racterísticas morfológicas em conformidade com os microrganismos
procurados, prosseguia-se com o isolamento. Para isso era utiliza-
da a técnica de diluição em tampão fosfato visando a obtenção de
colônias isoladas, em placas preparadas de acordo com o método de
semeadura em profundidade.

Para o isolamento de bactérias láticas mesófilas utili-
zou-se o ágar padrão adicionado de bromocresol púrpura como in-
dicador (4) e incubação a 30°C por um período de 24 a 48 horas.
Após o crescimento, colônias isoladas que apresentavam halo amare-
lo devido à acidificação eram transferidas para leite tornassolado
com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo. Normalmente, as colô-
nias isoladas eram encontradas nas placas de sexta a oitava dilui-
ção, sendo coletadas 10 a 15 colônias por amostra e os tubos depois
de inoculados eram incubados a 30°C por um período de até 24 horas.

Para o isolamento de bactérias láticas termófilas, ao se
empregar um procedimento semelhante ao adotado no isolamento de es-
treptococos mesófilos, variando somente a temperatura de incubação
para 45°C, não se obteve crescimento em até 48 horas de incubação.
Resultado idêntico foi também obtido quando se utilizou o ágar su-
co de tomate ao invés do ágar padrão.

Tendo em vista que não se observou crescimento nas condi-
ções adotadas para o isolamento de termófilos, partiu-se para duas
modificações preliminares. A temperatura de incubação das placas

foi abaixada para 37°C, uma vez que a incubação a 45°C promoveu um considerável ressecamento no meio. Essa alteração favoreceu o aparecimento de colônias, entretanto o crescimento ainda era muito pobre. Partiu-se, então, para a busca de um meio de cultura que se mostrasse mais apropriado aos microrganismos em questão. Tentou-se, inicialmente, adicionar ao ágar padrão, 10% de soro extraído do meio pré-fermentado, na expectativa de melhorar o crescimento. Foi também tentada uma modificação do ágar suco de tomate acrescentando-se 0,1% de glucose. Em ambos os casos houve uma melhoria em relação ao meio original, entretanto o crescimento era insatisfatório pois apresentava colônias pequenas e difíceis de serem isoladas. OTTOGALLI & GALLI (88) trabalhando com o mesmo assunto, adotaram procedimento semelhante, adicionando soro obtido por coagulação enzimática do leite, após extração das proteínas do soro e do excesso de fosfato. Havendo, inclusive, autores que recomendam a adição de leite visando o enriquecimento do meio para bactérias lácticas (107). Uma melhoria substancial nos resultados, ao se utilizar ágar padrão adicionado de 10% de soro, foi conseguida quando se empregou a incubação em anaerobiose, ou seja, 90% de N₂ e 10% de CO₂. BRIGGS (14) obteve bons resultados empregando um procedimento semelhante.

Foi também testado um outro meio de cultura frequentemente recomendado para bactérias lácticas, que é o ágar APT (All Purpose medium with Tween). Com esse meio obteve-se um resultado bastante satisfatório pois as colônias apresentavam-se nítidas mesmo com incubação em condições aeróbicas. Nesse sentido, em função das dificuldades na utilização do método de incubação em anaerobiose acima mencionado, optou-se pela utilização do meio APT com incubação aeróbica para o isolamento de bactérias lácticas termófilas.

Seleção

Durante o trabalho foram isoladas cerca de 400 colônias e o processo de seleção das culturas isoladas era iniciado pela observação das características de crescimento em leite tornassolado, tais como: tempo de coagulação, aspecto do coágulo, reações no leite tornassolado e coloração de Gram. Dessa forma, foram agrupadas como bactérias láticas mesófilas as culturas Gram positivas, catalase negativas, que coagulavam o leite dentro de 24 horas à temperatura ambiente, dando origem a um coágulo firme e sem gás, cuja redução do leite tornassolado ocorria antes da coagulação. No caso das termófilas, a coagulação ocorria dentro de 10 horas e nem sempre havia redução do leite tornassolado antes da coagulação.

Por esse processo preliminar foram selecionadas um total de 150 culturas, das 400 isoladas inicialmente. LAWRENCE et alii (65) também utilizaram como critério de seleção para bactérias láticas mesófilas, a capacidade das culturas isoladas coagularem leite desnatado reconstituído dentro de 18 horas a 22°C. COGAN (25) também encontrou tempo de coagulação inferior a 16 horas no caso de culturas puras de estreptococos láticos mesófilos. ERZINKYAN et alii (39) obtiveram coagulação dentro de 9 horas, no caso de leite inoculado com 1% de uma cultura de *S. thermophilus* enquanto SOZZI (105) obteve coagulação de leite em 3 h com cepas rápidas de *S. thermophilus* inoculadas à razão de 1% e incubação a 40°C.

Nesse sentido, tomando como base a velocidade de crescimento em termos de tempo de coagulação, das 150 culturas láticas iniciais foram selecionadas 80, sendo 30 mesófilas (coagulação dentro de 16 horas a temperatura ambiente) e 50 termófilas (coagulação dentro de 10 horas a 45°C). Estas culturas foram consideradas potencialmente indicadas para serem utilizadas como fermento lático

na indústria de laticínios e as mesmas foram submetidas a uma avaliação de aroma e sabor por meio de um teste organoléptico.

Para o teste organoléptico as culturas foram inoculadas à razão de 1% em leite tipo B comercial, aquecido até a fervura. Esse tratamento térmico, relativamente brando, foi adotado a fim de evitar a interferência do forte sabor de cozido normalmente observado em leite esterilizado em autoclave. Porções de 100 ml de leite eram inoculadas com a cultura a ser testada e incubadas a 30°C por um período de 16 horas, no caso de mesófilos, e a 45°C por 10 horas para as termófilas. Logo após a incubação eram colocadas sob refrigeração para serem provadas após 6 a 12 horas, visando com isso não só o resfriamento da cultura mas também a obtenção da consistência típica do coágulo.

No momento da prova organoléptica a temperatura era padronizada para cerca de 15°C e para isso a cultura era deixada à temperatura ambiente por alguns minutos. Iniciava-se o teste observando a consistência e corpo do coágulo, a seguir a cultura era homogeneizada com um bastão de vidro ou com uma agitação do recipiente, a fim de propiciar a avaliação organoléptica (82). Tendo em vista que as condições foram padronizadas, pôde-se detectar nítidas diferenças de uma cultura para outra, tanto no que diz respeito às características do coágulo como no sabor e aroma.

A maioria das culturas isoladas, tanto as mesófilas quanto as termófilas, apresentaram sabor e aroma típicos e bastante agradáveis. É importante salientar que, em alguns casos, mesmo em culturas isoladas de uma mesma amostra foram detectadas diferenças marcantes de uma cultura para outra. Houve também a ocorrência de algumas culturas mesófilas com sabor atípico, lembrando a malte (levedo), e estas foram descartadas. BOTTAZZI (12), HARRIGAN & MacCAN

CE (47) e SHARPE (102) referiram-se a uma variedade de *S. lactis* denominada *maltigenes*, que produzia 3-metilbutanal, composto este responsável pelo sabor e odor de malte.

Pelo teste organoléptico descrito, das 80 culturas, foram selecionadas cinquenta e sete que apresentaram as melhores características. Vinte e uma delas foram agrupadas como sendo estreptococos lácticos mesófilos e as 36 restantes como termófilos e destas, 26 eram lactobacilos e 10 estreptococos termófilos. Na Tabela 1 são apresentados esses grupos bem como as amostras dos produtos que serviram para o isolamento de cada uma das culturas.

As culturas selecionadas até essa fase dos trabalhos foram mantidas em leite desnatado reconstituído estéril, armazenadas sob refrigeração e congeladas. Em condições de refrigeração as repicagens se processavam a cada dois meses e no caso das congeladas a cada 6 meses. No decorrer do presente trabalho, algumas culturas apresentaram mudança de comportamento durante o período de armazenamento. Houve diminuição na velocidade de acidificação, como no caso da cultura S-25, ou perda total da capacidade de produzir acidez em leite, a exemplo das culturas S-48 e S-70. Neste último caso, foi possível verificar que a perda da atividade acidificante estava relacionada com a perda da capacidade de crescimento em leite. Comportamento semelhante foi citado por CITTI *et alii*(23) onde, após 3 anos de repicagens, foi detectado o aumento gradual na população de cepas lentas de uma cultura inicialmente rápida. OTTO (86) também verificou a mudança de comportamento após repicagens diárias.

Tabela 1 Principais grupos de culturas isoladas, de acordo com a amostra de origem

amostra de origem	estreptococos		lactobacilos termófilos
	mesófilos	termófilos	
LEITE CRU	S-1, S-4, S-5, S-7,		S-62, S-101, S-102,
	S-10, S-25, S-27,		S-103, S-104, S-105,
	S-46, S-47, S-48,		S-107, S-108, S-109,
	S-53, S-56, S-58,		S-110, S-114, S-116,
	S-70, S-72, S-73,		S-117, S-118, S-119,
	S-74, S-204, S-235.		S-120, S-126, S-127, S-128.
QUEIJO	S-205, S-206		
LEITE PAS-TEURIZADO		S-42, S-44,	S-34, S-35,
		S-132, S-135,	S-36, S-37,
		S-136, S-251,	S-38, S-39,
		S-254, S-256,	S-40.
		S-285, S-286.	

Avaliação das Culturas Isoladas Através de Fabricação de Queijo

A comprovação definitiva da qualidade de uma cultura láctica, normalmente deve ser feita por meio da avaliação da qualidade do produto fabricado, utilizando a cultura em questão, como fermento láctico. Nesse sentido, as culturas de estreptococos mesófilos selecionadas no teste organoléptico foram utilizadas na fabricação de queijos, inicialmente a nível de laboratório e planta piloto, e finalmente testadas em uma indústria de laticínios.

Tomando como base uma cultura para cada amostra ou fonte de isolamento, foram escolhidas, para serem utilizadas nessa fase dos trabalhos, 12 das 21 culturas de estreptococos mesófilos selecionados pelo teste organoléptico.

Preliminarmente, pequenas quantidades de leite (20 litros) foram utilizadas na fabricação de queijo Minas frescal em escala de laboratório. Nessa fase a cultura era avaliada em termos de capacidade de produzir acidez e pelas características de qualidade do queijo resultante. Os resultados obtidos indicaram que, em geral, as culturas testadas mostraram ser semelhantes e os queijos resultantes apresentaram características satisfatórias, exceto por um único problema, houve excesso de acidificação, atingindo pH em torno de 4,9. Isto deu uma indicação da maior capacidade de acidificação das novas culturas.

Com relação às culturas termófilas (estreptococos e lactobacilos) foram realizados alguns ensaios de fabricação de iogurte e somente dois testes de fabricação de queijos devido a dificuldades com relação à necessidade de cura. Mesmo assim, foi possível detectar uma indicação de que essas culturas apresentavam um comportamento semelhante ao normalmente obtido com culturas comerciais.

Numa segunda fase, as novas culturas foram testadas no processamento em escala piloto, onde eram fabricadas partidas de queijo Minas frescal e meia cura utilizando 150 a 400 litros de leite por partida. Os trabalhos de pesquisa iniciados nesta fase foram direcionados para a determinação da porcentagem ideal de cultura láctica mesófila a ser adicionada ao leite, tendo em vista que em escala de laboratório os novos isolados apresentaram uma maior capacidade de acidificação em relação às culturas tradicionais, quando se utilizava 1% de inóculo, conforme normalmente recomendado (10, 69, 104).

De acordo com trabalhos já realizados, o pH do queijo Minas logo após a prensagem deve se situar em torno de 5,3. Nesse sentido procurou-se diminuir a porcentagem de inóculo e controlar as demais fases do processamento onde a cultura pudesse alterar rapidamente a acidez do queijo, tais como: tempo e temperatura de prensagem e, conseqüentemente, a umidade final do queijo. Na Tabela 2 é apresentado um resumo dos resultados obtidos na fabricação de queijo Minas frescal utilizando 0,01 a 0,5% de cultura láctica. Conforme pode ser verificado, embora tenha havido alguma variabilidade, o emprego de 0,1% apresentou resultados bem próximos dos esperados nessa variedade de queijo.

Na Tabela 3 são apresentados alguns resultados obtidos na fabricação de queijo Minas meia cura. Nessa variedade, a umidade final dos queijos é menor, assim sendo, o emprego de uma porcentagem mais elevada de cultura, ou seja, em torno de 0,5%, apresentou resultados satisfatórios.

Além do controle de acidez e umidade, os queijos obtidos nessa fase foram avaliados sensorialmente visando detectar possíveis defeitos provocados pela cultura láctica. Os testes indica

Tabela 2 pH de queijo Minas frescal em função da porcentagem de cultura láctica adicionada

Partida	Cultura láctica	% Cultura	pH	% Umidade
1	S-1	0,01	5,7	62,1
2	S-25	0,05	6,0	65,7
3	S-1	0,10	5,2	51,4
4	S-1	0,10	5,1	57,0
5	S-1	0,10	5,3	61,0
6	S-1	0,10	5,1	50,8
7	S-58	0,10	5,2	59,9
8	S-74	0,10	5,1	58,0
9	S-74	0,10	5,1	61,5
10	S-25	0,50	5,0	61,9

Tabela 3 pH de queijo Minas meia cura em função da porcentagem de cultura láctica adicionada

Partida	Cultura láctica	% Cultura	pH	% Umidade
1	S-48	0,3	5,6	51,3
2	S-1	0,5	5,2	56,7
3	S-1	0,5	5,0	47,4
4	S-25	0,5	5,2	50,6
5	S-58	0,5	5,2	50,8
6	S-74	0,5	5,5	51,1

ram plena aceitação por parte dos provadores e não houve evidência de qualquer característica negativa, ao serem comparados com queijos da mesma variedade encontrados no comércio.

Foram também fabricadas algumas partidas de queijo tipo Prato e queijo tipo Parmesão utilizando as novas culturas. Embora não tenha sido feito com esses queijos um estudo com a mesma profundidade daquele feito com queijo Minas, houve uma boa indicação de que o comportamento das novas culturas láticas foi igualmente promissor para serem utilizadas como fermento lático nesses tipos de queijos.

Teste a Nível Industrial

As 12 culturas avaliadas nos testes em escala piloto, tiveram o seu comportamento como culturas láticas observado durante aproximadamente dois anos. De acordo com a sua estabilidade em termos de características de crescimento, capacidade de acidificação e características organolépticas do queijo resultante, cinco delas foram escolhidas para um teste industrial em um laticínio de porte médio (25.000 litros de leite/dia) situado na região nordeste do estado de São Paulo. Com a finalidade de testar comparativamente essas cinco culturas láticas frente a uma cultura comercial, esse experimento procurou seguir as técnicas e condições normalmente empregadas na indústria para a fabricação de queijo Minas meia cura.

Conforme pode ser verificado, existem algumas alterações no processo em relação ao tradicionalmente utilizado para essa variedade de queijo, como por exemplo o aquecimento da massa por meio da adição de água quente até atingir 42°C, o que faz com que esse processo de fabricação se assemelhe ao processo de fabricação do queijo tipo Prato. Entretanto, como a intenção era testar as novas culturas de uma forma comparativa, a tecnologia adotada na indústria foi seguida sem qualquer alteração. Optou-se também pela adição de 1,5% de fermento, que era a porcentagem tradicionalmente adotada por essa indústria, embora os resultados obtidos na fase de planta piloto tenham sugerido o emprego de uma porcentagem menor (0,5%).

Os queijos obtidos nesse ensaio foram analisados com relação à acidez, umidade e gordura logo após a fabricação e após 20 dias de cura nas condições normalmente adotadas nessa indústria, ou seja, 12°C e umidade relativa de 85%.

De acordo com os resultados na Tabela 4, não houve praticamente diferença entre os resultados do controle e a média dos resultados obtidos com as cinco novas culturas lácticas testadas. Embora tenha sido usada uma porcentagem maior de fermento, a acidez dos queijos esteve dentro do esperado para essa variedade (69), excetuando-se apenas a acidez inicial no caso da cultura S-204. Possivelmente, as alterações no processamento, como lavagem e aquecimento da massa, tenham concorrido para que as novas culturas não tenham dado origem a queijos mais ácidos do que o normal.

Para avaliar possíveis diferenças entre a intensidade de cura, nos queijos produzidos com as novas culturas e o controle, são apresentados na Tabela 5 os resultados das determinações de proteína total, proteína solúvel e índice de maturação (I.M.) (amostras em duplicata). Os resul

Tabela 4 Determinação de pH, umidade, gordura e sal em queijo Minas meia cura, logo após a salga e depois de 20 dias de cura

Cultura	Dias	pH	% Umidade	% Gordura	% NaCl
controle	0	5,30	46,43	29,0	----
	20	5,50	41,05	31,0	1,31
S-1	0	5,20	46,40	28,0	----
	20	5,60	39,12	29,5	1,49
S-10	0	5,00	47,39	28,5	----
	20	5,40	43,45	30,0	1,69
S-58	0	5,40	47,89	27,5	----
	20	5,60	41,33	30,0	1,67
S-74	0	5,30	47,34	28,5	----
	20	5,50	40,95	30,0	1,32
S-204	0	4,90	47,14	29,5	----
	20	5,35	40,89	30,0	1,23
média	0	5,16	47,23	28,5	----
		5,49	41,15	30,0	1,48

Tabela 5 Determinação de proteína total, proteína solúvel e Índice de maturação (I.M.) em queijo Minas meia cura, logo após a salga e depois de 20 dias de cura

Cultura	Dias	% Proteína Total	% Proteína Solúvel	I.M.
controle	0	20,32	2,17	10,68
	20	22,00	5,10	23,18
S-1	0	20,81	1,81	8,70
	20	22,50	8,44	37,51
S-10	0	18,74	1,83	9,77
	20	20,13	16,59	82,41
S-58	0	21,03	2,23	10,60
	20	22,91	9,73	42,47
S-74	0	20,97	2,19	10,44
	20	22,21	10,61	47,77
S-204	0	19,96	1,13	5,66
	20	21,23	12,71	59,87
Média	0	20,30	1,84	9,03
	20	21,80	11,62	54,01

tados indicaram uma grande diferença entre as novas culturas e a cultura comercial utilizada como controle. É importante observar que o menor índice de maturação dentre as novas culturas (S-1) foi 1,6 vezes superior ao obtido com o controle, enquanto que o índice de maturação médio das novas culturas foi 2,3 vezes o do controle. Esses resultados permitem concluir que, em termos de avaliação da intensidade de cura, as culturas isoladas do nosso habitat apresentam uma atividade proteolítica bem maior do que a de uma cultura comercial importada.

Além dos resultados analíticos mencionados, uma equipe de dez provadores, dentre eles cinco especialistas na área de leite e derivados, avaliaram sensorialmente as seis amostras de queijo após 20 dias de cura. Nesse teste foi utilizada uma Escala Hedônica na qual o provador expressou o grau de aceitação da amostra, com notas variando de 1 (extremamente indesejável) a 7 (extremamente desejável), para as características de sabor e textura. Conforme pode ser verificado na Tabela 6, os resultados com relação ao sabor apresentaram uma pequena variação, sendo relativamente próximos um do outro. A cultura S-1 foi a que recebeu a menor preferência, mesmo assim obteve 70% de aceitação, enquanto que a controle foi a segunda menos preferida (74%). As culturas S-58 e S-204 foram as melhores, com 84% de aceitação. Com relação a corpo e textura, Tabela 7, os resultados estiveram na mesma faixa de variação, onde o valor mais baixo coube à cultura S-74 e o mais alto à cultura S-58. Os resultados permitiram concluir que, tanto em termos de sabor como corpo e textura, a maioria das novas culturas deu origem a produtos de maior preferência, cabendo à cultura S-58 as melhores médias.

Tabela 6 Grau de aceitação, em uma escala de 1 a 7, para avaliação sensorial de sabor de queijo Minas meia cura

Provador	Culturas					
	Controle	S-1	S-10	S-58	S-74	S-204
1	4	2	6	5	3	6
2	4	7	3	7	6	6
3	6	4	5	6	5	6
4	5	4	6	4	4	4
5	6	5	7	7	6	7
6	6	4	7	5	5	7
7	7	4	7	5	6	7
8	7	6	7	6	7	7
9	5	6	4	7	6	5
10	2	7	4	7	5	4
média	5,2	4,9	5,6	5,9	5,3	5,9

Tabela 7 Grau de avaliação, em uma escala de 1 a 7, das características de corpo e textura de queijo Minas meia cura

Provador	Culturas					
	Controle	S-1	S-10	S-58	S-74	S-204
1	4	1	6	6	1	7
2	5	7	6	5	3	6
3	6	4	5	6	5	5
4	6	5	7	5	4	4
5	6	6	7	6	7	7
6	5	6	7	6	5	7
7	6	5	7	6	4	4
8	7	6	6	7	7	7
9	5	6	5	7	6	6
10	4	6	4	7	5	5
média	5,4	5,2	6,0	6,1	4,7	5,8

Comportamento Microbiológico

Diante dos resultados altamente promissores, indicando certa superioridade das novas culturas em comparação com as culturas importadas, alguns testes adicionais, a nível de estudo microbiológico, foram realizados visando obter dados comparativos entre as cinco novas culturas e culturas comerciais importadas. O meio de cultura utilizado para os testes foi leite desnatado reconstituído submetido a um tratamento térmico brando, conforme descrito em materiais e métodos.

Tendo em vista que a atividade acidificante é uma das características mais importantes no aproveitamento de uma cultura como fermento láctico, foram realizados alguns experimentos visando avaliá-la. A variação de acidez foi medida pela determinação de pH após determinado período de incubação a diferentes temperaturas. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos numa comparação das novas culturas com culturas comerciais de atividade acidificante conhecida, partindo-se de 0,2% de inóculo e incubação a 23°C por 16 horas. Conforme pode ser verificado, os novos isolados, com exceção das culturas S-10 e S-58, produziram uma acidificação na mesma faixa das culturas comerciais conhecidas como rápidas em termos de produção de acidez, mesmo assim, duas culturas que apresentaram acidificação menor, produziram uma variação de pH quase três vezes superior à da cultura AM₂ conhecida como lenta produtora de acidificação.

Em um outro teste foi feita a comparação dos novos isolados entre si, utilizando-se um inóculo de 2% e incubação a 30°C por um período de 5 horas. Os resultados na Tabela 9 indicaram uma variação de acidez muito próxima entre as cinco culturas.

Tabela 8 Atividade acidificante de culturas láticas em
leite desnatado, após ¹⁶ horas a 23°C

Cultura	pH inicial	pH final	variação de pH
* <i>S. lactis</i>	6,62	5,36	1,26
* <i>S. cremoris</i> 208	6,50	4,46	2,04
* <i>S. cremoris</i> AM ₂	6,48	6,15	0,33
* <i>S. lactis</i> C ₂	6,47	4,70	1,77
<i>S. lactis</i> S-1	6,49	4,67	1,82
<i>S. lactis</i> S-10	6,53	5,51	1,02
<i>S. lactis</i> S-58	6,60	5,77	0,83
<i>S. lactis</i> S-74	6,51	4,75	1,76
<i>S. lactis</i> S-204	6,51	4,76	1,75

* Culturas Comerciais

Tabela 9 Atividade acidificante de culturas láticas em
leite desnatado, após 5 horas a 30°C

Cultura	pH inicial	pH final	variação de pH
<i>S. lactis</i> S-1	6,51	5,20	1,31
<i>S. lactis</i> S-10	6,56	5,24	1,32
<i>S. lactis</i> S-58	6,59	5,35	1,35
<i>S. lactis</i> S-74	6,53	5,31	1,22
<i>S. lactis</i> S-204	6,51	5,22	1,29

Posteriormente foi feito um estudo comparativo entre uma das cepas mais utilizadas desde o início dos testes de avaliação (*S. lactis* S-1) e uma cepa comercial (*S. cremoris* 208). Curvas de acidificação foram construídas medindo-se o pH e a acidez titulada a cada hora, durante um período de 8 horas de incubação a 30°C, Figura 2. Conforme pode ser verificado, as duas culturas apresentaram comportamento muito semelhante, tanto em termos de pH como em acidez Dornic.

Uma comparação em termos populacionais foi também realizada, fazendo-se a cada hora de incubação, a contagem em placas e a determinação da densidade ótica a 410 nm. A Tabela 10 apresenta os resultados das contagens microbiológicas realizadas em ágar BCP a 30°C após 48 horas. Conforme pode ser verificado, o desenvolvimento entre as culturas foi semelhante, havendo entretanto uma indicação de uma multiplicação mais rápida da cultura S-1, que apresentou até a sétima hora de incubação um aumento relativo na sua população celular em torno de duas vezes e meia o observado na outra cultura. Ao compararmos esse crescimento por meio da densidade ótica a 410 nm, os resultados confirmaram aqueles obtidos com a contagem microbiológica, Figura 3.

Efeito da Temperatura de Cozimento na Atividade Acidificante

O efeito da elevação de temperatura a uma faixa semelhante à utilizada na fabricação de queijos de massa semi-cozida, foi testado em experimentos realizados com os novos isolados, procurando detectar possíveis alterações na atividade acidificante ao serem incubados em torno de 40°C. A Tabela 11 mostra, por exemplo, que a incubação a 30°C durante 5 horas apresentou resultados semelhantes à incubação a 30°C por 1,5 h mais 4 horas a 38°C e poder-se-ia dizer, inclusive, que houve uma

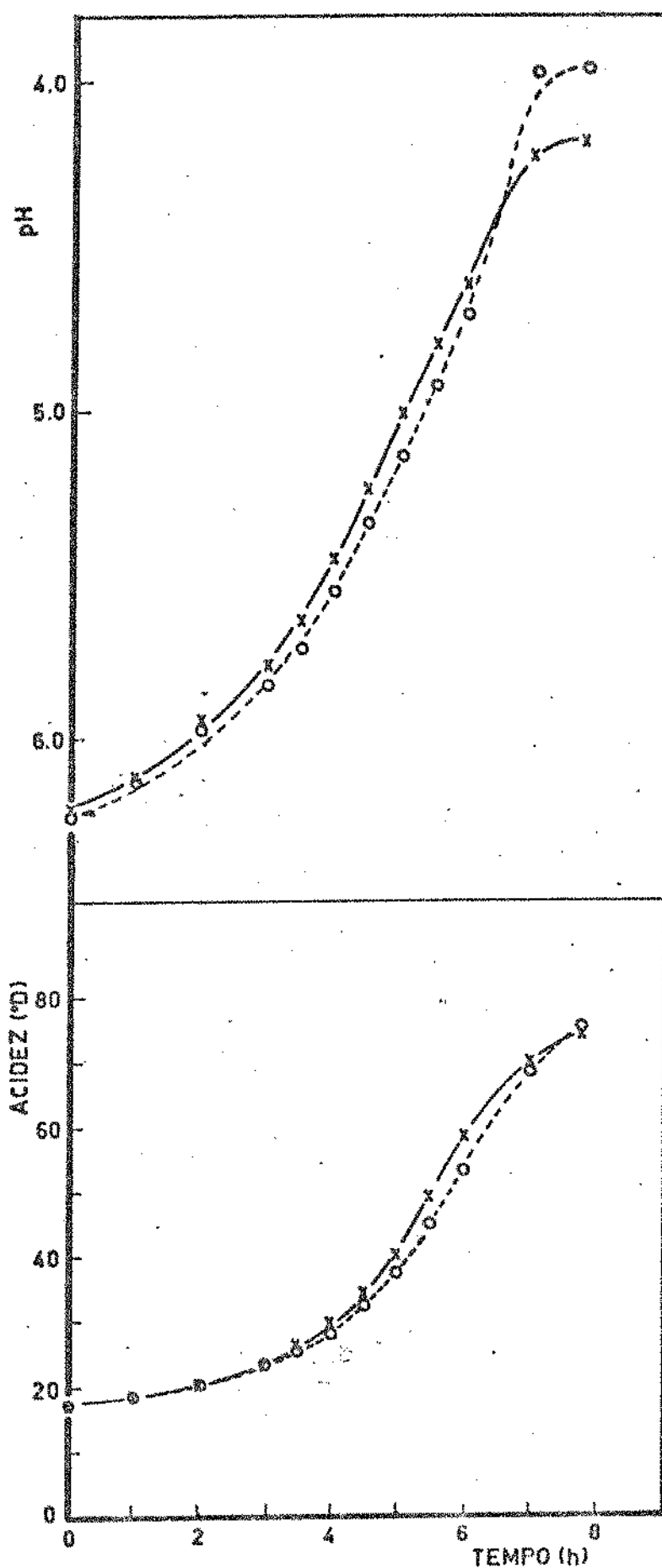


Figura 2 Medidas de pH e acidez (°D) de culturas de (x) *S. lactis* S-1 e (o) *S. cremoris* 208 inoculadas em leite à razão de 2% e incubadas a 30°C.

Tabela 10 Contagem em placas das culturas após cada hora de crescimento em leite desnatado a 30°C.

Horas de Crescimento	Culturas	
	<i>S. lactis</i> S-1 UFC/mL	<i>S. cremoris</i> 208 UFC/mL
0	$3,1 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6$
1	$5,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
2	$1,6 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
3	$2,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$
4	$3,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^7$
5	$7,1 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$
6	$1,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^8$
7	$1,8 \times 10^9$	$2,0 \times 10^8$
8	$1,5 \times 10^9$	$6,5 \times 10^8$

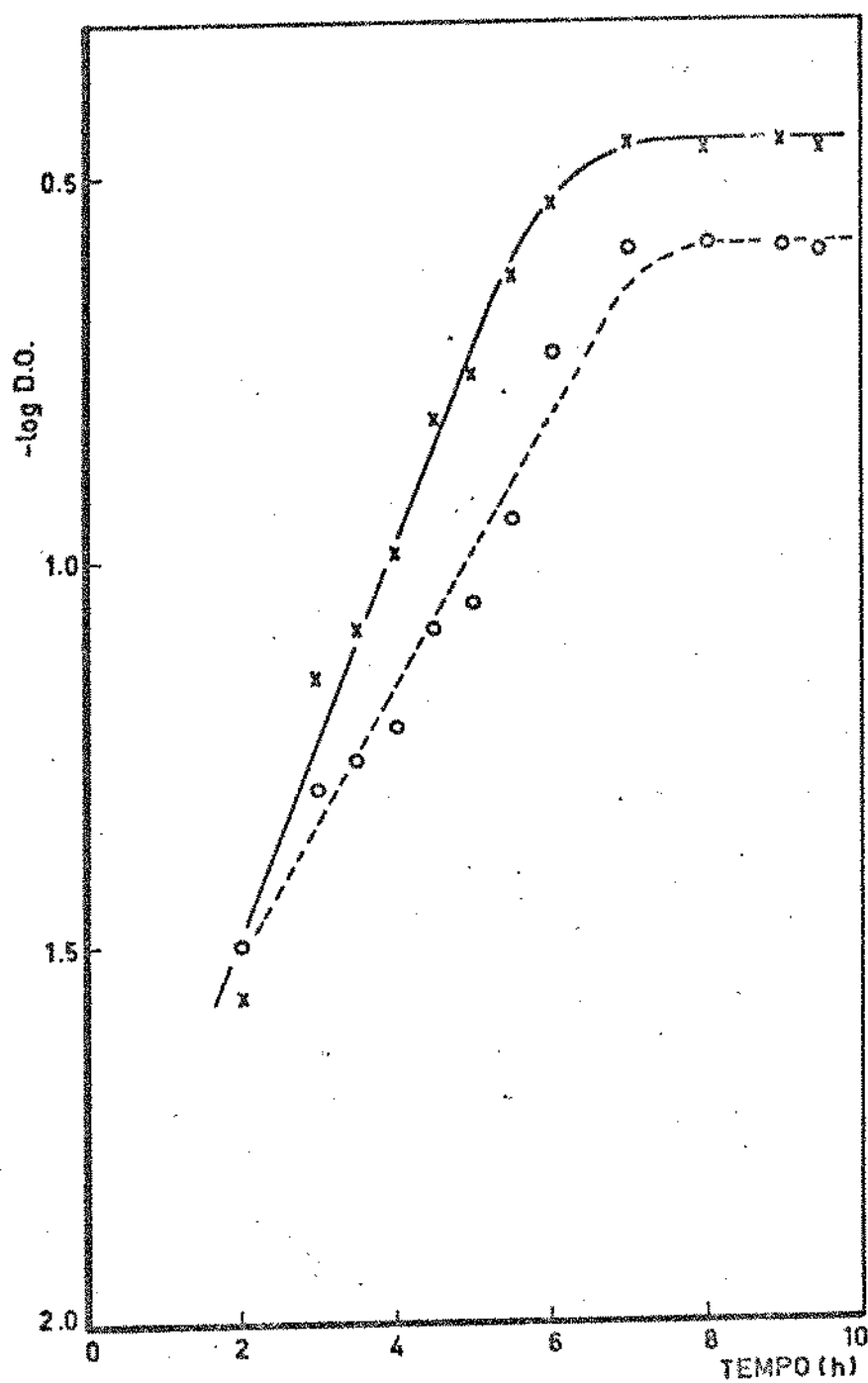


Figura 3 Curva de crescimento obtida pela medida da densidade ótica a 410 nm em função do tempo
 (x) *S. lactis* S-1
 (o) *S. cremoris* 208 (comercial)

Tabela 11 Efeito da temperatura de incubação na atividade acidificante.

Culturas	pH após incubação	
	5 horas a 30°C	1,5 horas a 30°C mais 4 horas a 38°C
<i>S. lactis</i> S-1	4,97	4,72
<i>S. lactis</i> S-10	5,09	4,58
<i>S. lactis</i> S-58	5,15	4,88
<i>S. lactis</i> S-74	5,10	4,68
<i>S. lactis</i> S-204	5,05	4,90

melhor atuação das culturas no último caso. Em outro experimento, Tabela 12, os novos isolados foram estudados juntamente com uma cultura comercial em condições variáveis de incubação (30°C por 1,5 h, mais 1 h a 40°C e novamente a 30°C por até 4 horas). Os resultados desse experimento indicaram que a atividade acidificante não foi afetada pela variação de temperatura. Tais resultados diferiram daqueles obtidos por BABEL (5) pois esse autor obteve, para a maioria das culturas testadas, uma lenta acidificação a 40°C. Com a finalidade de minimizar o efeito da variação do número de células no inóculo utilizado, foi montado um experimento onde foi feita a padronização do inóculo inicial por meio da determinação da densidade ótica. As culturas, primeiramente inoculadas em leite com β glicerofosfato de sódio (50) com 18 h de incubação a 22°C, foram submetidas a uma determinação de densidade ótica a 410 nm e a densidade corrigida para o menor valor correspondente à densidade da cultura AM₂. Foram, portanto, diluídas para esse valor de densidade ótica com leite estéril, de tal forma que após a padronização todas as culturas continham aproximadamente o mesmo número de células e este inóculo utilizado para verificar o efeito da temperatura na atividade acidificante. As culturas assim preparadas foram inoculadas à razão de 2% em leite e incubadas a 30°C durante 1,5 h e a 38°C por mais 4 horas. Os resultados apresentados na Tabela 13 confirmaram que os novos isolados não sofreram interferência da variação de temperatura de incubação havendo entretanto alguma diferença entre eles. As culturas comerciais de *S. cremoris* utilizadas como controle apresentaram uma pequena acidificação em comparação com as demais, podendo-se observar que os melhores resultados (em termos de acidificação) ocorreram dentre os novos isolados (culturas S-1 e S-74).

Tabela 12 Efeito da temperatura de incubação na atividade acidificante.

Culturas	pH após incubação			
	1,5 horas 30°C	1 h 40°C	3 h 30°C	1 h 30°C
controle ^a	6,62	6,59	6,52	6,54
* BD	6,51	6,42	5,52	5,09
<i>S. lactis</i> S-1	6,52	6,36	5,43	4,91
<i>S. lactis</i> S-10	6,51	6,33	5,32	4,73
<i>S. lactis</i> S-58	6,53	6,39	5,64	5,22
<i>S. lactis</i> S-74	6,52	6,35	5,47	4,96
<i>S. lactis</i> S-204	6,52	6,35	5,55	5,03

a - tubo de leite não inoculado e incubado sob as mesmas condições

* - cultura comercial mista, utilizada como controle

Tabela 13 Controle da acidificação utilizando inóculo padronizado e incubação a 30°C por 1,5 h e 38°C por mais 4 horas.

Culturas	Repetições			média de pH	variação ^a média de pH
	1	2	3		
controle ^b	6,54	6,64	6,52	6,57	0,00
* <i>S. lactis</i> CH	5,58	5,97	5,78	5,78	0,79
* <i>S. cremoris</i> 208	6,07	6,23	6,00	6,10	0,47
* <i>S. cremoris</i> AM ₂	6,32	6,32	6,28	6,31	0,26
* <i>S. lactis</i> C ₂	5,69	5,98	5,65	5,77	0,79
<i>S. lactis</i> S-1	5,50	5,82	5,38	5,57	1,00
<i>S. lactis</i> S-10	5,96	6,12	5,91	6,00	0,57
<i>S. lactis</i> S-58	5,87	6,16	6,02	6,02	0,55
<i>S. lactis</i> S-74	5,48	5,74	5,47	5,56	1,00
<i>S. lactis</i> S-204	5,74	5,96	5,67	5,79	0,78

a - variação entre a acidez final do controle e da cultura em questão

b - leite não inoculado e incubado sob as mesmas condições

(*) - culturas comerciais

Atividade Proteolítica

Os resultados apresentados na Tabela 14, em que os novos isolados foram avaliados quanto a atividade proteolítica, indicaram uma substancial variação na quantidade de tirosina liberada, sendo entretanto possível detectar uma semelhança na atividade proteolítica entre as culturas comerciais utilizadas como controle e os novos isolados. Houve uma nítida diferença entre o valor obtido para a cultura AM₂, conhecida como lenta, e as demais, o mesmo ocorrendo entre a cultura S-10 e os outros isolados. A cultura S-1, que apresentou maior atividade acidificante, apresentou também maior atividade proteolítica.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados por CITTI et alii (23). Houve, entretanto, uma pequena discrepância entre os resultados da atividade proteolítica obtidos nesse experimento e a avaliação do índice de maturação dos queijos fabricados com essas mesmas cepas. A cultura S-10, por exemplo, que nesse experimento apresentou baixa atividade proteolítica, deu origem a queijos com alto índice de maturação. Entretanto, a atividade proteolítica no queijo se processa em condições diferentes, tanto em termos de acidez como pela presença de sal, havendo ainda a adição de renina que exerce atividade proteolítica. Os resultados desse experimento, bem como os observados na determinação do índice de maturação, permitem concluir que os novos isolados são cepas bastante distintas no que diz respeito ao seu comportamento final em termos de cura do queijo.

Tabela 14 Atividade proteolítica de culturas láticas, expressas em concentração de tirosina, após crescimento em leite a 21°C por 15 horas.

Culturas	µg de tirosina por mL de leite
* <i>S. lactis</i> CH	29
* <i>S. cremoris</i> 208	44
* <i>S. cremoris</i> AM ₂	3
* <i>S. lactis</i> C ₂	45
<i>S. lactis</i> S-1	39
<i>S. lactis</i> S-10	5
<i>S. lactis</i> S-58	24
<i>S. lactis</i> S-74	35
<i>S. lactis</i> S-204	37

* Culturas comerciais utilizadas como controle

Influência da Concentração de Cloreto de Sódio na Atividade Acidificante

A influência de pequenas concentrações de NaCl na atividade acidificante pode ser verificada por meio da análise da Tabela 15, as novas cepas praticamente não foram afetadas pelo aumento na concentração de NaCl até o nível de 2%. Já as cepas de *S. cremoris*, utilizadas como controle, foram consideravelmente afetadas. Tais resultados confirmaram observações anteriormente realizadas sobre a maior sensibilidade de cepas de *S. cremoris* frente ao cloreto de sódio (65, 92). Resultados semelhantes foram obtidos por IRVINE & PRICE (57), embora tenham sido utilizadas diferentes condições para os testes. MARTH & HUSSONG (75) concluíram em seu trabalho que a diversidade de resultados, por vezes contraditórias, é devida às diferentes condições utilizadas para o teste, tais como porcentagem de inóculo, meio de cultura, temperatura e porcentagem de NaCl.

Teste de Sensibilidade a Bacteriófagos

Os novos isolados foram também avaliados com relação à sensibilidade a bacteriófagos, segundo procedimento descrito por HEAP & LAWRENCE (48, 50). Nas condições desse experimento, nenhuma sensibilidade a bacteriófago foi detectada dentre os novos isolados pois não houve alteração na atividade acidificante.

Tabela 15 Influência da concentração de cloreto de sódio na atividade acidificante de culturas lácticas incubadas a 30°C por 5 horas.

Culturas	pH a diferentes concentrações de NaCl		
	0,0%	1,0%	2,0%
* <i>S. cremoris</i> 208	4,93	5,58	6,20
* <i>S. cremoris</i> 227	5,10	5,51	5,94
<i>S. lactis</i> S-1	4,93	4,84	5,04
<i>S. lactis</i> S-10	4,68	4,57	4,70
<i>S. lactis</i> S-58	4,82	4,79	4,95
<i>S. lactis</i> S-74	5,44	5,41	5,70
<i>S. lactis</i> S-204	5,34	5,25	5,54

* culturas comerciais utilizadas como controle

Teste de Produção de Substâncias Inibidoras

Assim como as bactérias lácticas são capazes de produzir substâncias estimulantes ao crescimento de outras bactérias (28, 102) determinadas cepas são igualmente capazes de produzir substâncias inibidoras como ácidos, peróxido de hidrogênio e antibióticos (7, 102). Essa característica pode ser benéfica se tal capacidade for estendida a contaminantes indesejáveis, todavia não seria desejável no caso de culturas mistas onde poderia haver inibição de espécies componentes do próprio fermento láctico, promovendo, assim, uma incompatibilidade entre as espécies (5, 7, 65).

Utilizando-se o método descrito por DAVEY & PEARCE (31) foi possível verificar a produção, pelas culturas isoladas, de substâncias inibidoras tipo bacteriocina. Os resultados mostraram que a cepa S-1 foi capaz de inibir fortemente a cultura utilizada como indicadora (sensível à bacteriocina), produzindo grande halo, conforme pode ser vista na Figura 4. Os demais isolados não produziram inibição significativa. Esses resultados indicaram uma possível deficiência da cepa S-1, até então selecionada como uma das melhores em termos de características para ser utilizada como fermento láctico. Nesse sentido, procurou-se promover a perda dessa característica inibitória da cultura S-1 por meio do isolamento de mutantes. Conforme procedimento recomendado por DAVEY & PEARCE (31), uma incubação da cultura em caldo M 17 a 35,5°C por 16 horas, temperatura esta ligeiramente elevada, pode promover a perda dessa característica sem alteração das demais propriedades da cultura. Foi possível obter quatro novas cepas não produtoras de bacteriocina que não apresentariam qualquer inconveniente ao serem utilizadas em fermentos mistos, substituindo assim a cepa S-1 original.

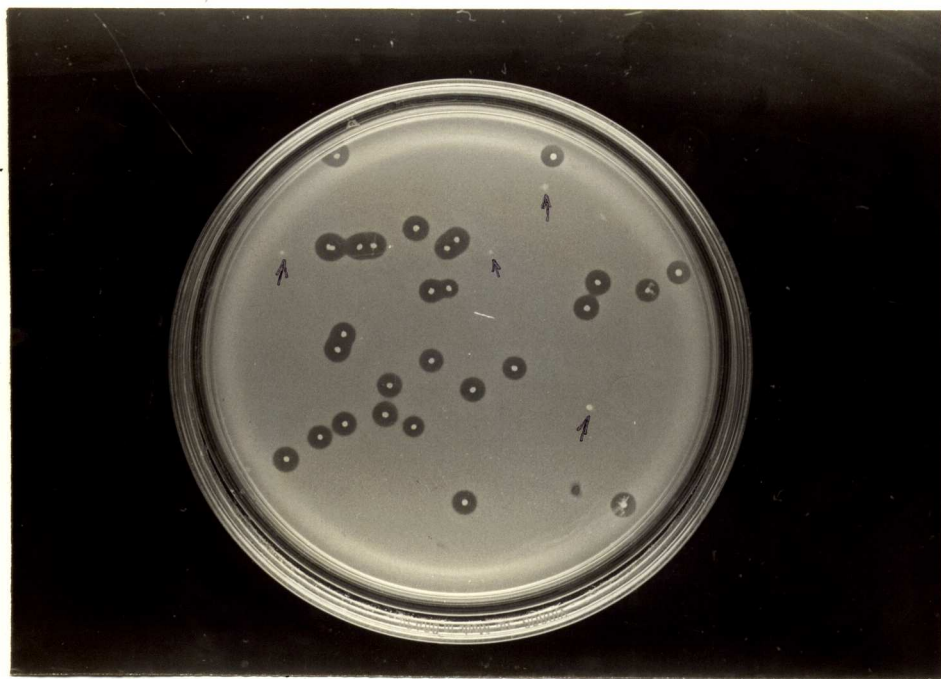


Figura 4 Zonas de inibição provocadas pela cepa *S. lactis* S-1 (placa de diluição 10^{-8}) sobre a cepa *S. cremoris* 16. As cepas não produtoras aparecem como pontos brancos (colônias sem o halo de inibição).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. É viável o isolamento de culturas lácticas originárias do nosso meio, as quais apresentam, no mínimo, um desempenho comparável às culturas importadas normalmente utilizadas na indústria de queijos.
2. O enriquecimento de estreptococos lácticos mesófilos foi facilmente obtido pela simples incubação das amostras de leite cru em temperatura ambiente, enquanto que a incubação a 45°C de leite pasteurizado comercialmente, permitiu o enriquecimento de estreptococos termófilos. Para os lactobacilos o enriquecimento foi amplamente favorecido pela inoculação de amostras de leite cru em leite pré-fermentado e incubação a 45°C.
3. O isolamento de mesófilos foi prontamente obtido utilizando-se ágar padrão adicionado de bromocresol púrpura, semeadura em profundidade e incubação a 32°C. As culturas termófilas, porém, foram isoladas em ágar APT e 37°C de incubação.
4. A seleção das culturas com base nas características organolépticas e tecnológicas mostrou ser muito importante na definição de uma cultura para uso como fermento láctico.
5. O estudo comparativo das culturas isoladas do nosso habitat com culturas comerciais importadas revelou uma maior atividade de cura, e a nível de laboratório, maior atividade acidificante, maior velocidade de multiplicação, maior tolerância a sal e a variações de temperatura na faixa de 30 a 40°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACCOLAS, J.P. & AUCLAIR, J. 1983. Thermophilic lactic starters
Ir. J. Fd. Sci. Technol. 7(1): 27-38.
2. A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis 13th ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., Proc. 2.057.
3. A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis. 13th ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., Proc. 16.243.
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. APHA, Inc., Washington, D.C., 701 p.
5. BABEL, F.J. 1955. Slow acid production by lactic cultures: A Review J. Dairy Sci. 38(7): 705-733.
6. BABEL, F.J. 1962. Industrial utilization of lactic cultures. In: Symposium on lactic starter cultures. J. Dairy Sci. 45(10): 1286-1290.
7. BABEL, F.J. 1977. Antibiosis by lactic culture bacteria. In: Practical importance of the lactic streptococci. J. Dairy Sci. 60(5): 815-820.
8. BANWART, G.J. 1979. Basic Food Microbiology. Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 78lp.
9. BELOVA, G.A., MEDVEDEVA, Z.P., KORNELYUK, A.N. & TROFIMOVA, T.I. 1982. Study of some properties of lactic streptococci used in cheesemaking. Dairy Science Abstracts 44(6): 455.
10. BONASSI, I.A., LIMA, U.A. & GOLDONI, J.S. 1978. Efeito da variação da quantidade de bactérias lácticas na fabricação do queijo tipo Minas. Ciência e Cultura 30(11): 1317-1320.

11. BOTTAZZI, V., SARRA, P.G., VESCOVO, M. & BERSANI, C. 1978. Caratteristiche dei bacilli lattici presenti nelle colture naturali in siero. 4. Saggi per la caratterizzazione delle colture. Scienza e Tecnica Lattiero-casearia 29(6):367-381.
12. BOTTAZZI, V. 1979. Microbiologia dei fermenti lattici. Futurgraf, Reggio Emilia, 324 p.
13. BREHENY, S., KANASAKY, M., HILLIER, A.J. & JAGO, G.R. 1975. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. 2. The uncoupling of acid production from growth. The Australian Journal of Dairy Technology 30(4): 145-148.
14. BRIGGS, M. 1953. The classification of lactobacilli by means of physiological tests. J. Gen. Microbiol. 9: 234-248.
15. BRITISH STANDARDS INSTITUTION. 1974. Sampling of cheese. British Standards Institution, BSI. 809:12.
16. BUCHANAN, R.E., & GIBBONS, N.E. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
17. CARINI, S. & BAGLIERI, G. 1976. Preparazione e impiego di uno starter nella produzione di "Caciocavallo Ragusano". L'industria del latte: 57-69.
18. CHAMBA, J.F., BONNAZ, G. & BOURG, P. 1981. Comparaisons de diverses méthodes de dénombrement de la flore acidifiante du lait cru. Le lait 61(609-610): 555-567.
19. CHAPMAN, H.R. & SHARPE, M.E. 1981. Microbiology of cheese. In: Dairy Microbiology Vol. 2. Robinson, R.K. Applied Science Publishers, Ltd. London and New Jersey, 333 p.
20. CHAZAUD, M.T. 1977. Problèmes posés par les milieux sélectifs pour streptocoques lactiques. Stabilité des levains industriels. Revue Laitière Française 358(11): 605-607.

21. CHOMAKOV, K.H. 1976. Species composition of lactic acid bacteria in raw and pasteurized cow's milk for manufacture of white pickled cheese. Dairy Science Abstracts 38(7):469.
22. CITTI, J.E., SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R. 1963. Some observation on the Hull Method for measurement of proteolysis in milk. J. Dairy Sci. 46(4): 337.
23. CITTI, J.E., SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R. 1965. Comparison of slow and fast acid-producing *Streptococcus lactis*. J. Dairy Sci. 48(1): 14-18.
24. COGAN, T.M. 1980. Les levains lactiques mesophiles. Une revue. Le lait 60(597): 397-425.
25. COGAN, T.M. 1983. Some aspects of the metabolism of dairy starter cultures. Ir. J. Fd. Sci. Technol. 7(1): 1-13.
26. COKER, C.J. & MARTLEY, F.G. 1982. Selective enumeration of thermophilic lactobacilli in association with *Streptococcus thermophilus*. N.Z. Jl. Dairy Sci. and Technol. 17(3): 269-272.
27. COLLINS, E.B. 1962. Culture identity and selection. In: Symposium of lactic starter cultures. J. Dairy Sci. 45(10): 1262-1266.
28. COLLINS, E.B. 1977. Influence of medium and temperature on end products and growth. In: Practical importance of the lactic streptococci. J. Dairy Sci. 60(5): 799-804.
29. COX, W.A. 1977. Characteristics and use of starter cultures in the manufacture of hard pressed cheese. J. Soc. Dairy Technol. 30(1): 5-15.
30. DALY, C. 1983. Starter culture developments in Ireland. Ir. J. Fd. Sci. Technol. 7: 39-48.
31. DAVEY, G.P. & PEARCE, L.E. 1980. The use of *Streptococcus cremoris* strains cured of diplococcin production as cheese starters. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 15(1): 51-57.

32. DAVIES, F.L. & GASSON, M.J. 1981. Reviews of the progress of dairy science: Genetics of lactic acid bacteria. J. Dairy Research 48(2): 363-376.
33. DE MAN, J.C., ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.
34. DEMETER, K.J. 1971. Elementos de Microbiologia Lactol6gica. 6^a ed., Editorial Acribia, Saragoza, Espana, 150 p.
35. DILANYAN, Z.Kh., SAAKYAN, R.V. & SAGOYAN, A.S. 1975. Analysis of lactic acid bacteria and principles of their selection for use in starters. FSTA 7(5): 114.
36. DUTTA, S.M., KUILA, R.K., ARORA, B.C. & RANGANATHAN, B. 1972. Effect of incubation temperature on acid and flavour production in milk by lactic acid bacteria. J. Milk Fd. Technol. 35(4): 242-244.
37. ELLIKER, P.R., ANDERSON, A.W. & HANNESSON, G. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy Sci. 39(11): 1611-1612.
38. EVANS, J.B. & NIVEN, C.F. Jr. 1951. Nutrition of heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. J. Bacteriol. 62: 599-603.
39. ERZINKYAN, L.A., PAKHLEVANYAN, M.Sh., CHARYAN, L.M., AKOPYAN, L.G. & VEKILYAN, S.M. 1979. *Streptococcus thermophilus* M7 used for production of cultured milk products and cheeses. FSTA. 11(4): 185.
40. FOSTER, E.M., NELSON, F.E., SPECK, M.L., DOETSCH, R.N. & OLSON, J.C. 1957. Dairy Microbiology. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 492 p.
41. FURTADO, J.P. 1975. Análises Bromatológicas (Apostila). Universidade Federal de Juiz de Fora - MG, Brasil, 97 p.

42. GERALDINI, A.M., DELAZARI, I., LEITÃO, M.F.F., OLIVEIRA, C.M. M. & UBOLDI EIROA, M.N. 1979. Caracterização de bactérias lácticas em alimentos. 1. Avaliação de meios sólidos para contagens de culturas puras. Bol. ITAL, Campinas, 16(1): 53-64, jan/mar.
43. GILLILAND, S.E. 1977. Preparation of concentrated cultures of lactic streptococci. In: Practical importance of the lactic streptococci. J. Dairy Sci. 60(5): 805-809.
44. GONZALES, F.C. & FANTUZZI, L. 1981. Meio de cultura para bactérias lácticas. Indústria Alimentar 25: 18-21, jan/fev.
45. GUDKOV, A.V., PERFIL'EV, G.D., MATEVOSYAN, L.S., DOKUKIN, V.M. & CHEPKOVA, V.I. 1980. Physiological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria present in cheese starters. Dairy Science Abstracts 42(1): 46.
46. HAMMOND, L.A. 1976. Starters and selected micro-organisms in cheesemaking. Food Technology in Australia 28(1): 11-13.
47. HARRIGAN, W.F. & Mc CANCE, M.E. 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc., London, 452 p.
48. HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. 1976. The selection of starter strains for cheesemaking. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 11(1): 16-20.
49. HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. 1977. The contribution of starter strains to the level of phage infection in a commercial cheese factory. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 12(4): 213 - 218.
50. HEAP, H.A. & LAWRENCE, R.C. 1981. Recent modifications to the New Zealand activity test for cheddar cheese starters. N. Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 16(1): 91-94.
51. HEAP, H.A., LIMSOWTIN, G.K.Y. & LAWRENCE, R.C. 1978. Contribution of *Streptococcus lactis* strains in raw milk to phage infection in commercial cheese factories. N.Z. Jl. Dairy

Sci. Technol. 13(1): 16-22.

52. HILL, D.A., & THORNTON, H.R. 1958. Lactobacilli in Edmonton Dairy Products. Can. J. Microbiology 4: 215-220.
53. HULL, M.E. 1947. Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci. 30: 881-884.
54. INSTITUTO ADOLFO LUTZ 1976. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz Vol. I. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.^a ed., IAL - SP, 371 p.
55. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1980. Starters in manufacture of cheese. 2. Factors affecting the results of an activity test of mesophilic cheese starters. Bulletin IDF (129): 5 - 8.
56. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION 1982. Taxonomic features and identification of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Bulletin IDF (145): 3-10.
57. IRVINE, D.M., & PRICE, W.V. 1961. Influence of salt on the development of acid by lactic starters in skimmilk and in curd submerged in brine. J. Dairy Sci. 44(2): 243-248.
58. JENSEN, R.G. & EDMONDSON, J.E. 1957. The characterization of some lactobacilli found in milk. J. Dairy Sci. 40(2):180-186.
59. KANASAKI, M., BREHENY, S., HILLIER, A.J. & JAGO, G.R. 1975. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. 1. A rapid method for the estimation of bacterial populations. The Australian Journal of Dairy Technology 30(4): 142-144.
60. KING, N.S. & KOBURGER, J.A. 1970. Characterization of some group N streptococci. J. Dairy Sci. 53(4): 403-409.

61. KLIMOVSKII, I.I., ZVYAGINTSEN, V.I., GUDKOV, A.V. & MEDVEDEVA, Z.P. 1973. Selection of strains in the formulation of starters. Dairy Science Abstracts 35(4): 135.
62. KRŠEV, L. 1980. Selection and practical application of starters for production of cultured milk products. Dairy Science Abstracts 42(5): 335.
63. KOSIKOWSKI, F.V. 1978. Cheese and fermented milk foods. 2nd ed., F.V. KOSIKOWSKI and Associates, Brooktondale, New York, 711 p.
64. LAWRENCE, R.C. 1978. Action of bacteriophage on lactic acid bacteria: Consequences and protection. N.Z. J. Dairy Sci. Technol. 13(3): 129-136.
65. LAWRENCE, R.C., HEAP, H.A., LIMSOWTIN, G., & JARVIS, A.W. 1978. Cheddar cheese starters: Current knowledge and practices of phage characteristics and strain selection. In: Symposium: Research and development in natural cheese manufacturing and ripening. J. Dairy Sci. 61(8): 1181-1191.
66. LAWRENCE, R.C., THOMAS, T.D. & TERZAGHI, B.G. 1976. Reviews of the progress of dairy science: "Cheese starters". J. Dairy Res. 43(1): 141-193.
67. LEE, S.Y., VEDAMUTHU, E.R., WASHAN, C.J. & REINBOLD, G.W. 1974. An agar medium for the differential enumeration of yoghurt starter bacteria. J. Milk Food Technol. 37(5): 272-276.
68. LEGG, W.M. 1973. The selection and maintenance of starters for non cheddar cheese varieties. Dairy Science Abstracts 35(2): 54.
69. LEITE, E.A. 1978. Proteínas do soro na fabricação de queijo Minas. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 50 p. Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.

70. LIMSOWTIN, G.K.Y., HEAP, H.A., & LAWRENCE, R.C. 1980. A new approach to the preparation of bulk starter in commercial cheese plants. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 15(3): 219-224.
71. LLOYD, G.T. 1971. New developments in starter technology. Dairy Science Abstracts 33(6):411-416.
72. LLOYD, G.T. & PONT, E.G. 1973. An experimental continuous culture unit for the preparation of frozen concentrated cheese starters. J. Dairy Res. 40: 149-155.
73. LLOYD, G.T. & PONT, E.G. 1973. Some properties of frozen concentrated starters produced by continuous culture. J. Dairy Res. 40: 157-167.
74. MARCOS, A., STEBAN, M.A., ESPEJO, J., MARTINEZ, P. & MUÑOZ, M.T. 1977. "Screening" de las cepas proteolíticas del queso tipo Manchego y acción de las proteasas de las suspensiones de células sobre la α_s e β caseína. Archivos de Zootecnia 26(102): 189-199.
75. MARTH, E.H. & HUSSONG, R.V. 1965. Microbial acid production in and subsequent coagulation of milk as affected by added sodium chloride. J. Dairy Sci. 48(5): 548-552.
76. MARTLEY, F.G. & LAWRENCE, R.C. 1973. Cheddar cheese flavour. II Characteristics of single strain starters associated with good or poor flavour development. Dairy Science Abstracts 35(2): 54.
77. MILLS, O.E. & THOMAS, T.D. 1980. Bitterness development in cheddar cheese: Effect of the level of starter proteinase. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 15(2): 131-141.
78. MILLS, O.E. & THOMAS, T.D. 1981. Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. N.Z. Jl. Dairy Sci. Technol. 16(1): 43-55.

79. MOON, N.J., HAMMAN, A.C. & REINBOLD, G.W. 1974. Recovery of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on nine commonly used agar media. Appl. Microbiol. 28(6):1076-1078.
80. MULLAN, M.A. & WALKER, A.L. 1979. An agar medium and a simple streaking technique for the differentiation of the lactic streptococci. Dairy Industries International 44(6): 13 e 17.
81. NELSON, G.A. & THORNTON, H.R. 1952. The lactic streptococci in Edmonton milks and creams. Can. J. Technol. 30: 130-135.
82. NELSON, J.A. & TROUT, G.M. 1964. Judging dairy products. 4th ed. The Olsen Publishing Co., Milwaukee Wis., 463 p.
83. NUÑEZ, M., MARTINEZ MORENO, J.L. & MEDINA, A.L. 1982. Study of *S. lactis* of different acid producing activities as starters for Manchego type cheese. Dairy Science Abstracts 44(6): 458.
84. OBLINGER, J.L. 1975. Recovery of streptococci from a variety of foods: a comparison of several media. J. Milk Fd. Technol. 38(6): 323-326.
85. OSBORNE, R.J.W. 1977. Production of frozen concentrated cheese starters by diffusion culture. Journal of the society of Dairy Technology 30(1): 40-44.
86. OTTO, R. 1982. An ecophysiological study of starter. Dairy Science Abstracts 44(7): 543.
87. OTTOGALLI, G. 1981. *Microbiologia lattiero-casearia* C.L.E.S.A. V., Milano, 126 p.
88. OTTOGALLI, G. & GALLI, A. 1978. Metodi per la conta l'isolamento e l'identificazione della specie *Streptococcus thermophilus* nei prodotti lattiero-caseari. Ann. Microbiol. 28: 91-110.
89. OTTOGALLI, G. & GALLI, A. & DELLAGLIO, F. 1979. Taxonomic relationships between *Streptococcus thermophilus* and some other

- streptococci. J. Dairy Res. 46: 127-131.
90. POLITI, I. & OTTOGALLI, G. 1968. Preparation of natural milk cultures for crescenza-type cheeses. Dairy Science Abstracts 30(7): 388.
 91. RAMOS, M., BARNETO, R. & ORDONEZ, J.A. 1981. Evaluation of a specific starter for manchego cheese production. Milchwissenschaft 36(9): 528-532.
 92. RÄSIC, J. 1962. A study of the resistance of lactic acid bacteria to sodium chloride. XVI International Dairy Congress. Copenhagen Vol B Section IV: 2: 881 - 887.
 93. RÄSIC, J. & KURMANN, J.A. 1978. Yoghurt. Scientific grounds, technology manufacture and preparations. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, 466 p.
 94. REDDY, M.S., VEDAMUTHU, E.R., WASHAM, C.J. & REINBOLD, G.W. 1972. Agar medium for differential enumeration of lactic streptococci. Appl. Microbiol. 24(6): 947-952.
 95. REINBOLD, G.W. & REDDY, M.S. 1974. Sensitivity or resistance dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. J. Milk Fd. Technol. 37(10): 517-521.
 96. REITER, B. 1973. Some thoughts on cheese starters. J. Soc. Dairy Technol. 26(1): 3-21.
 97. ROGOSA, M., MITCHELL, J.A. & WISEMAN, R.F. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62: 132-133.
 98. ROSS, G.D. 1980. Observation on the effect of inoculum pH on the growth and acid production of lactic streptococci in milk. The Australian Journal of Dairy Technology 35(4): 147-149.
 99. SANDINE, W.E. 1977. New techniques in handling lactic cultures to enhance their performance. J. Dairy Sci. 60(5): 822 - 828.

100. SANDINE, W.E., RADICH, P.C. & ELLIKER, P.R. 1972. Ecology of the lactic streptococci. A review. Journal of Milk and Food Technology 35(3): 176-185.
101. SHANKAR, P.A. & DAVIES, F.L. 1977. A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing β Glycero-phosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. Journal of the Society of Dairy Technology 30(1): 28-30.
102. SHARPE, M.E. 1979. Lactic acid bacteria in dairy industry. Journal of the Society of Dairy Technology 32(1): 9-18.
103. SHARPE, M.E. & FRYER, T.F. 1966. Identification of the lactic acid bacteria In: Identification Methods for Microbiologists, Ed. B.M. GIBB & F.A. SKINNER. Part A, Academic Press, London & New York, 145 p.
104. SOUZA, E.A. 1960. Tecnologia da fabricação de queijos. Edição da revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, MG.
105. SOZZI, T. 1972. Ricerche sulla microflora lattica dei lattoinnesti naturali. Latte 46(12) 844-847.
106. SOZZI, T. 1973. The preparation of very active lactic cultures. Dairy Science Abstracts 35(2): 52.
107. SOZZI, T. & MARET, R. 1973. Etude sur la microflore lactique du fromage << Vacherin Mont-d'Or >> Le Lait 53 (525-526): 280-294.
108. SPECK, M.L. 1982. Starter culture growth and action in milk In: Symposium on Lactic Starter Cultures. J. Dairy Sci. 45 (10): 1281-1286.
109. STADHOUDERS, J. 1974. Dairy starter cultures. Milchwissenschaft 29(6): 329-337.
110. STADHOUDERS, J. & HASSING, F. 1974. A standardized method of determining the activity of cheese starters. Dairy Science

Abstracts 36(4): 182.

111. STAMER, J.R. 1979. The lactic acid bacteria: Microbes of Diversity. Food Technology 33(1): 60-65.
112. STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A. & INGRAHAM, J.L. 1977. General Microbiology. 4th ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
113. TAMIME, A.Y. 1981. Microbiology of fermented milks in "Dairy Microbiology". Robinson, R.K., Applied Science Publishers, London, 333 p.
114. TAMIME, A.Y. 1981. Microbiology of "Starter cultures" in dairy microbiology. Vol. 2. ROBINSON, R.K., Applied Science Publishers Ltd., London and New Jersey, 333 p.
115. TERZAGHI, B.E. & SANDINE, W.E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29(6): 807-813.
116. TURNER, K.W., DAVEY, G.P., RICHARDSON, G.H. & PEARCE, L.E. 1979. The development of a starter handling system to replace traditional mother cultures. N.Z. Jl. Dairy Sci. and Technol. 14(1): 16-22.
117. VEDAMUTHU, E.R., SANDINE, W.E. & ELLIKER, P.R. 1966. Flavor and Texture in Cheddar Cheese. I. Role of Mixed Strain Lactic Starter Cultures. J. Dairy Sci. 49(2): 144-150.
118. WILLIANSOON, W.T. & SPECK, M.L. 1962. Proteolysis and curd tension in milk associated with accelerated starter culture growth. J. Dairy Sci. 45(2): 164-169.
119. WULF, J.J. & SANDINE, W. 1983. Isolation and characterization of fast acid-producing antibiotic-resistant mutants of lactic streptococci. J. Dairy Sci. 66(9): 1835-1842.