EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NO PH,
ACIDEZ TITULÁVEL, SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA
DE CULTURAS LÁTICAS

VERA LUCIA BELLUCCI

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1991

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NO PH,
ACIDEZ TITULÁVEL, SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA
DE CULTURAS LÁTICAS

VERA LUCIA BELLUCCI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrí-
cola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Bellucci, Vera Lucia
B449e Efeito das condições de armazenamento pH, acidez
titulável, sobrevivência e atividade proteolítica,
de culturas lácticas. Piracicaba, 1991.
102p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Bactéria láctica 2. Iogurte - Acidez 3. Iogurte -
Armazenamento 4. Iogurte - Tecnologia I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 637.146

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NO PH,
ACIDEZ TITULÁVEL, SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA
DE CULTURAS LÁTICAS

VERA LUCIA BELLUCCI

Aprovada em: 15.04.1992

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Lúcio Alberto Forti Antunes

UEL (Universidade
Estadual de Londrina),
Londrina, PR

Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA
Orientador

Aos meus sobrinhos Marília,
Gustavo, Bruno e Neto,
ofereço

Ao meu noivo, Osmar,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADEÇO

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Leite	4
2.2. Culturas Lácticas	7
2.2.1. Seleção das Culturas e Balanço Microbio- lógico	7
2.2.2. Simbiose Bacteriana	12
2.2.3. Produção de Ácido e Atividade Proteolíti- ca na Fermentação	17
2.3. Armazenamento	20
2.3.1. pH e Acidez Titulável	20
2.3.2. Sobrevivência	22
2.3.3. Proteólise	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais	26
3.1.1. Matéria-prima	26
3.1.2. Culturas Lácticas	26
3.1.3. Meio para Isolamento das Culturas	27

	Página
3.2. Métodos	27
3.2.1. Isolamento e Conservação das Culturas ..	27
3.2.2. Leite	28
3.2.2.1. Fortificação	28
3.2.2.2. Tratamento Térmico e Resfriamento	28
3.2.3. Preparo do Inóculo	29
3.2.4. Inoculação e Incubação	30
3.2.5. Resfriamento e Armazenamento	30
3.2.6. Análises Físico-Químicas	31
3.2.6.1. Acidez Titulável	31
3.2.6.2. pH	31
3.2.6.3. Índice de Proteólise	31
3.2.7. Análise Microbiológica	32
3.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Acidez Titulável	36
4.2. Atividade Proteolítica	46
4.3. pH	55
4.4. Sobrevivência	64
5. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICES	90

LISTA DE FIGURAS

Figura n ^o	Página
1. Acidez titulável a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy (mg de ácido lático/100 ml de amostra) .	37
2. Acidez titulável a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Paulista (mg de ácido lático/100 ml de amostra) ...	38
3. Atividade proteolítica a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy (mg de tirosina/100 ml de amostra)	53
4. Atividade proteolítica a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Paulista (mg de tirosina/100 ml de amostra)	54
5. pH a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy ..	56
6. pH a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Paulista	57
7. Sobrevivência da(s) cultura(s) Chambourcy a 3, 7 e 12°C (UFC/100 ml de amostra)	68

8. Sobrevivência da(s) cultura(s) Paulista a 3, 7 e 12°C (UFC/100 ml de amostra)	69
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela nº	Página
1. Variação do pH de acordo com o tempo e temperatura de armazenamento	21
2. Padrão microbiológico por ml de iogurte natural para consumo	22
3. Esquema de Análise de Variância	33
4. Dados das análises físico-químicas do leite utilizado como matéria-prima no experimento (média de 6 repetições)	35
5. Análise de variância para acidez, atividade proteolítica, pH, sobrevivência com relação a linhagens, temperatura de armazenamento, tratamento, tempo e suas interações	35
6. Análise da interação linhagens x temperatura de armazenamento com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico/100 ml de amostra) ..	39

7. Análise da interação linhagens x tratamentos com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico/100 ml de amostra)	40
8. Análise da interação Tempo x Temperatura de armazenamento com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico/100 ml de amostra) ..	41
9. Análise da interação Tratamentos x Temperatura com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico/100 ml)	42
10. Análise da interação Tempo x Tratamentos com relação à produção de acidez titulável (mg de ácido láctico /100 ml de amostra)	43
11. Análise da interação Linhagens x Tempo com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico/100 ml de amostra)	44
12. Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	47

13. Análise da interação Linhagens x Tempo com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	47
14. Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação à atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	49
15. Análise da interação Temperatura de armazenamento x Tratamentos com relação à atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	49
16. Análise da interação Tratamentos x Tempo de armazenamento com relação à atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	50
17. Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra)	51
18. Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação ao pH	58

19. Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação ao pH	59
20. Análise da interação Linhagens x Tempo de armazenamento com relação ao pH	59
21. Análise da interação Tratamentos x Tempo de armazenamento com relação ao pH	60
22. Análise da interação Tratamentos x Temperatura de armazenamento com relação ao pH	61
23. Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação ao pH	62
24. Variação nos valores de pH de acordo com o tempo de armazenamento	63
25. Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação à sobrevivência (UFC/100 ml de amostra)	64

26. Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação à sobrevivência (UFC/100 ml de amostra)	65
27. Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação à sobrevivência (UFC/100 ml de amostra) ...	66

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NO PH, ACIDEZ TITULÁVEL, SOBREVIVÊNCIA E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE CULTURAS LÁTICAS

Autora: VERA LÚCIA BELLUCCI

Orientador: PROF. DR. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

RESUMO

Para o levantamento das mudanças ocorridas no iogurte em termos de acidez titulável, atividade proteolítica, pH e sobrevivência das bactérias lácticas durante o armazenamento foi utilizado leite tipo C fortificado com leite desnatado desidratado (Molico, Nestlé) para que atingisse 16% de extrato seco total (EST). Esse leite recebeu um tratamento térmico (20 min, vapor fluente em autoclave), e então, foi resfriado até atingir aproximadamente 45°C. Após o resfriamento, o leite foi inoculado com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e/ou *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (MARSHALL, 1987) isolados de iogurte comercial (Chambourcy e Paulista) e incubado a 42°C $\pm$ 1 por 4 horas.

Após o período de incubação do leite (4 horas), a coalhada sofreu 2 tipos de resfriamento, rápido (banho de gelo) e lento (refrigerador), e após atingir a temperatura de armazenamento (3, 7 e 12°C), e a cada cinco dias do mesmo, foram retiradas amostras da coalhada para determinação das mudanças acima citadas, durante 25 dias.

A análise estatística dos resultados mostrou que a variação da acidez titulável, atividade proteolítica, pH e sobrevivência não foram significativas para as 3 temperaturas empregadas durante os 25 dias de armazenamento.

THE EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON THE TITRATABLE ACIDITY, PROTEOLYTIC ACTIVITY, PH AND SURVIVAL OF LACTIC ACID CULTURES

Author: VERA LÚCIA BELLUCCI

Adviser: PROF. DR. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

SUMMARY

This work was undertaken to study the changes in the titratable acidity, proteolytic activity, pH and survival of lactic acid starter cultures isolated from commercial of yogurts, on controlled storage conditions.

Commercial pasteurized milk fortified to 16% ETS with skim milk powder was heat treated by steam flow for 20 min. After cooled to $\pm 45.0^{\circ}\text{C}$, the milk was inoculated with *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and/or *S. salivarius* subsp. *bulgaricus* isolated from commercial yogurt (Chambourcy and Paulista), and incubated at $42.0 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for four hours.

At the end of incubation, the samples were divided in two lots. One of them was fast cooled in ice bath and the other put into the refrigerator to cool slowly. After that, the samples were stored in refrigerators at 3, 7 and 12.0°C for 25 days.

At every five days of storage, samples were taken and analyzed for titratable acidity, proteolytic activity, pH and survival of cultures.

The statistic analysis of the results showed no significative changes of the parameters analysed, for the 3 temperatures of storage (3, 7 and 12.0°C) for a total of 25 days.

1. INTRODUÇÃO

O iogurte se popularizou na Europa e muitas outras partes do mundo (TAMIME & DEETH, 1980). Há portanto grande interesse em sua produção, pois trata-se de um produto com grande margem lucrativa (FERREIRA & CHAVES, 1981).

Além de ser um produto muito apreciado (MATALON & SANDINE, 1986) ele possui alto valor nutritivo. Essa característica importante, que muitas vezes faz com que o consumidor opte pelo produto, exige algumas condições para ser mantida, tanto a nível de produção, quanto à nível de armazenamento (FERREIRA & CHAVES, 1981).

A nível de produção é importante salientar a compatibilidade das linhagens usadas na fabricação do iogurte, qualidade da matéria prima e processo de manufatura (MATALON & SANDINE, 1986), que embora não sejam objetos dessa pesquisa, influenciam diretamente nas mudanças ocorridas no produto durante o armazenamento (TAMIME & DEETH, 1980).

A nível de armazenamento destacam-se a temperatura e o tempo, pois a atividade bacteriana é

permitida durante a produção até que se alcance acidez, sabor e aroma desejados. Entretanto, as bactérias presentes no produto final estão em número máximo e viáveis e podem continuar sua atividade durante o armazenamento refrigerado (PUHAN, 1990).

TAMIME *et al* (1987a), observaram que conforme se elevava a temperatura de armazenamento ocorria decréscimo do número de microrganismos do iogurte.

Estudando iogurtes comercializados na Zona da Mata de Minas Gerais, FERREIRA & CHAVES (1981), concluíram que a acidez excessiva das amostras se deve ao prolongado período de armazenamento e ausência do controle de temperatura, e, a elevação da acidez pode ser seguida, na maioria dos casos, de outras modificações organolépticas indesejáveis.

ACOLLAS *et al* (1977), propuseram o resfriamento rápido do iogurte a temperaturas ao redor de 0 °C para que se contenha a produção de ácido, pois uma temperatura de 8 °C é insatisfatória para a conservação do produto devido a probabilidade de ocorrerem muitas combinações do tipo cocos-bastonetes que possibilitam a continuidade da acidificação.

TAMIME *et al* (1987b), sugeriram que a durabilidade do iogurte pode ser aumentada abaixando-se a temperatura de armazenamento. Eles afirmam também que a deterioração desse produto é grandemente afetada pela

temperatura de armazenamento de 10 °C, e que mantendo-o resfriado a 5 °C logo após a manufatura, a deterioração não é eliminada completamente, mas é menos intensa.

A compatibilidade e simbiose entre *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante a acidificação do leite foi extensivamente estudada, porém poucos trabalhos a respeito da sobrevivência e atividade proteolítica da associação durante o armazenamento foram desenvolvidos.

O objetivo deste trabalho foi estudar as variações ocorridas no pH, e acidez titulável, bem como a atividade proteolítica e a sobrevivência das culturas lácticas empregadas na produção comercial de iogurte em associação e separadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leite

A qualidade da matéria-prima, seleção e compatibilidade das linhagens utilizadas e os processos de produção são fatores que contribuem para a aceitabilidade do iogurte pelo consumidor (MATALON & SANDINE, 1986).

Segundo ARAÚJO (1984), a matéria-prima mais comumente usada para a elaboração do iogurte é o leite bovino que deve ser de boa qualidade e sofrer uma preparação adequada para resultar em um produto com as melhores características possíveis.

Pette & Lolkema¹, citados por MOOM & REINBOLD (1976), afirmaram que a composição do leite tem uma grande importância na consistência do iogurte. Segundo esses autores, uma quantidade alta de sólidos totais resulta num coágulo firme. Eles afirmaram ainda, que é

¹PETTE, J.W. & LOLKEMA, H. Yoghurt II. Grolinfactoren voor *Sc. thermophilus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 4:209-24, 1950.

muito importante que o leite sofra um tratamento térmico de 85 °C por 5 min e que seja submetido a homogeneização, pois, segundo KROGER (1976), esta faz com que a gordura contribua para a textura. Este mesmo autor afirma que o total de sólidos do leite pode ser aumentado através da evaporação da água ou adição de leite desidratado, embora existam métodos mais sofisticados de fortificação (TAMIME & DEETH, 1980). Segundo TAMIME & ROBINSON (1988), a fortificação aumenta o nível de proteína afetando desta forma a viscosidade e consistência do coágulo.

MARSHALL (1987), sugeriu que o leite para a fabricação do iogurte tenha 17% de sólidos não gordurosos. ROBINSON & TAMIME (1975), recomendaram uma faixa de 14 a 18% no teor de sólidos totais do leite, pois segundo HUMPHREYS & PLUNKETT (1969), eles influenciam no sabor e aroma, estabilidade e valor nutritivo do iogurte.

DAVIS (1970), afirmou que o leite para a fabricação do iogurte deve conter 3% de gordura e 8,5% de sólidos totais não gordurosos. É necessário que este contenha menos que 0,01 u.i. de penicilina por ml.

Com relação a acidez, ela deve estar na faixa entre 0,14 a 0,20% (g de ácido láctico por 100 ml de leite), o pH deve apresentar valores em torno de 6,5 a 6,7 (SPREER, 1975), e a quantidade de aminoácidos deve ser menor ou igual a 10 mg/100 ml de leite (MILLER & KANDLER, 1967).

Um dos defeitos mais comuns no iogurte é a sinerese, que pode ser prevenida por homogeneização da gordura, aumento do teor de proteína acima de 3,5%, redução do conteúdo de minerais, esterilização ou tratamento térmico do leite (KROGER, 1976).

Outro defeito comum é o desenvolvimento de sabor amargo, que foi atribuído por GODED y MUR (1975) à acidificação lenta, devido ao emprego de culturas defeituosas, e utilização de leite de má qualidade.

O nível total de sólidos e o tratamento térmico dispensado ao leite utilizado na fabricação do iogurte podem influenciar no grau de estimulação das culturas iniciadoras (TAMIME & DEETH, 1980; GREENE & JEZESKI, 1957a,b e c) devido à formação de ácido fórmico a partir da degradação da lactose (AUCLAIR & PORTMAN, 1959), entretanto, tem pouca influência na sobrevivência dos organismos durante o armazenamento refrigerado do iogurte (HAMMAN & MARTH, 1984).

SLOCUM *et al* (1988a), afirmaram que o grau de proteólise durante a incubação depende do tempo desta, do nível total de sólidos e principalmente do tratamento térmico aplicado ao leite.

SLOCUM & KILARA (1988). reforçaram a informação de que o nível de proteólise depende da concentração de sólidos totais do leite e tempo de incubação. Nível mínimo de proteólise ocorria com 10% e, máximo, com 12,8 e 14,5% de sólidos totais no leite.

2.2. Culturas Láticas

2.2.1. Seleção das Culturas e Balanço Microbiológico

A seleção das culturas láticas usadas na produção do iogurte exerce um importante papel no desenvolvimento da textura, acidez, sabor e aroma desejados no produto final (LAPROPOULOS *et al*, 1982). Quando essa seleção é adequada, ela aumenta a uniformidade e estabilidade na produção de ácido e atividade proteolítica no iogurte (SINGH & SHARMA, 1982).

Segundo GARCIA & VALLE (1986), parâmetros importantes para seleção de culturas para a produção de iogurte são: atividade acidificante, atividade proteolítica, pós-acidificação, consistência e compatibilidade com outras linhagens.

A importância da compatibilidade e crescimento associativo foi descrita por RASIC & KURMANN (1978) e MOON & REINBOLD (1974), que recomendaram evitar a utilização de combinações de linhagens de comportamento

antagônico, o que prejudicaria a qualidade do produto final.

MARTINS & LUCHESE (1988), sugeriram que os parâmetros a serem considerados fossem: formação de grânulos, produção de substâncias mucilaginosas, antibiose, produção de compostos carbonílicos, proteólise, resistência ao tratamento térmico, dessoramento, resistência a antibióticos, velocidade de acidificação nas temperaturas de processamento e armazenamento dentre outros.

TAMIME & ROBINSON (1978), recomendaram o uso de culturas produtoras de polissacarídeos, pois reduzem o uso de estabilizantes e possibilitam que o iogurte tenha uma consistência aceitável com níveis mais baixos de sólidos totais no leite.

Já Brandão² descreveu mais alguns critérios para seleção de fermento para iogurte. Este deve ser livre de contaminantes, que produza aromatizantes desejáveis, de balanço microbiológico facilmente mantido, que produza um coágulo com brilho (proteólise filante), que resista a fagos, que seja de fácil manutenção, rápido, com pouca pós-acidificação e que não cause dessoramento.

² BRANDÃO, S.C.C. Fermentação Láctica do Iogurte. Apostila do Curso proferido no XIV Congresso Brasileiro de Microbiologia. Viçosa. 1987.

WILLIAMSON & SPECK (1962), ressaltaram a importância de se usar culturas de crescimento rápido com o objetivo de minimizar o efeito de alguns contaminantes que segundo KROGER (1976), são principalmente coliformes, bactérias esporuladas, leveduras e fungos comuns no iogurte.

ARAÚJO (1984), discutiu alguns aspectos importantes para a seleção de culturas tendo em vista a segurança de uma boa fabricação e obtenção de iogurte com elevada qualidade organoléptica. Segundo este autor, as culturas lácticas devem produzir uma acidez de 0,78 a 0,90 g de ácido láctico por 100 ml do produto, embora atualmente se prefira usar culturas com médio ou baixo poder acidificante evitando a pós-acidificação durante o resfriamento, estocagem e distribuição do produto. É indispensável a formação de aroma principalmente para a fabricação de iogurte natural. A proteólise é de grande importância. Quando intensa, enfraquece a estrutura e favorece a simbiose entre as culturas, porém poderá provocar o aparecimento de sabor amargo, devido ao acúmulo de peptídeos. SHARPE *et al* (1972), afirmaram que lactobacilos produzem um polissacarídeo (glucano), provavelmente um dextrano que melhora a consistência e viscosidade do iogurte.

Devido a essas características as indústrias de laticínios que se dedicam à produção de iogurte

necessitam renovar ou recombinaar suas culturas com frequência a fim de obterem produtos com características desejáveis (MORAES & PASSOS, 1979).

Outro aspecto importante para a qualidade do iogurte é o balanço microbiológico entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. O controle da razão entre eles é de grande importância e preserva o balanço entre a acidez, sabor e aroma (DAVIS, 1970).

GRANDI & ANDRADE (1988), afirmaram que o armazenamento prolongado da cultura-mãe provoca um aumento na sua acidez, diminuição da relação *S. salivarius* subsp. *thermophilus* : *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e, conseqüentemente, diminuição na produção de ácido láctico.

Com acidez da cultura e temperatura de incubação altas, os bastonetes são favorecidos em relação aos cocos. Durante a transferência diária sobre essas condições estes últimos morriam rapidamente. Quando a acidez da cultura e a temperatura de incubação são baixas, o inverso ocorria (PETTE & LOKEMA, 1951).

Segundo Nielsen³ citado por RADKE-MITCHELL & SANDINE (1984), quando ocorria predominância de *S.*

³NIELSEN, V.H. Factors which control the body and texture of commercial yogurts. Am. Dairy Rev., 37:36-8, 1975.

salivarius subsp. *thermophilus* o iogurte tornava-se rançoso e sem aroma, em caso de predominância de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ocorria super-acidificação.

Por isso TAMIME & DEETH (1980), sugeriram que as culturas devam ser monitoradas microscopicamente ou cultivadas em meio sólido. Alguns meios de contagem e diferenciação de bactérias do iogurte foram descritos (DAVIS *et al.*, 1971; OTTOGALLI, *et al.*, 1972; LEE *et al.*, 1974; BRACQUART, 1981; HAMANN & MARTH, 1984; MILLARD *et al.*, 1989).

Vários autores estudaram a proporcionalidade adequada entre *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para a fabricação do iogurte. STOCKLIN (1969), recomendou que seja de 1:1 ou 1:2. PLATT (1969), SELLARS & BABEL (1970), Pette & Lolkema⁴, citado por LEE *et al.* (1974) e ROBINSON & TAMIME (1975), sugeriram que seja de 1:1. KAPAC-PARKACĚVA *et al.* (1975), afirmaram que a razão 1:1 no iogurte produz uma quantidade substancialmente maior de aminoácidos livres, do que quando a razão 1:3 é usada.

LEE *et al.* (1990), afirmaram que a produção de ácido e a sobrevivência dos microrganismos do iogurte

⁴PETTE, J.V. & LOLKEMA, H. Yoghurt III. Zuurvorming in aroma vorming in yoghurt. Netherlands Milk and Dairy Journal, 4:261-73, 1950.

depende da linhagem usada e da razão entre *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que deve ser 1:1. Já MOON & REINBOLD (1976), concluíram que esta razão deve ser 1:2, pois *S. salivarius* subsp. *thermophilus* é estimulado ao máximo na fase exponencial de crescimento e os fatores de estimulação da simbiose são produzidos em quantidades ótimas nessa razão e à temperatura de 37 °C.

2.2.2. Simbiose Bacteriana

Sendo o iogurte um produto de simbiose bacteriana, após a inoculação, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* cresce rapidamente até um pH de aproximadamente 5,5. Então o crescimento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é favorecido progressivamente. Se a incubação não for interrompida em pH entre 4,0 a 4,4; *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* continua crescendo, produzindo sabor e aroma até o pH chegar abaixo de 4,0. Nestas circunstâncias *S. salivarius* subsp. *thermophilus* desapareceria, a razão microbiana seria descontrolada e o produto tornar-se-ia extremamente ácido (KROGER, 1976).

Segundo ACOLLAS et al (1971), lactobacilos termofílicos estimulam a produção de ácido por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* em leite aquecido a 80 °C por 30 min. e leite autoclavado. Eles afirmaram que essa

estimulação é devida a ação dos primeiros organismos sobre as proteínas do leite e, efeito similar pode ser observado adicionando-se várias combinações de aminoácidos ao leite. Por outro lado *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pode ser estimulado por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* em leite aquecido a 80 °C por 30 min., entretanto esta ação não pode ser observada em leite autoclavado.

HEMME *et al* (1981), encontraram que extratos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são estimulantes para linhagens de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* em vários níveis devido a sua atividade caseinolítica. Eles concluíram que a natureza específica, mais do que a atividade proteolítica, determina o nível no qual os extratos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são estimulantes, pois a atividade caseinolítica mais alta, não significa necessariamente maior potencial de estimulação.

Alguns estudos têm demonstrado os vários níveis de atividade proteolítica em *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (McDONALD, 1955; OHMIYA & SATO, 1968; DUTTA *et al*, 1972 e SINGH *et al*, 1980).

Pette & Lolkema⁵ citado por MOON & REINBOLD (1976), encontraram que os fatores estimulantes para *S.*

⁵PETTE, J.W. & LOLKEMA, H. Yoghurt II. Groeinfactoren voor *Sc. thermophilus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 4: 209-24, 1950.

salivarius subsp. *thermophilus* produzidos por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* eram onze aminoácidos, sendo que o mais estimulante era a valina.

BAUTISTA *et al* (1966), identificaram que os fatores estimulantes eram apenas a glicina e histidina. SHANKAR & DAVIES (1977) e HIGASHIO *et al* (1977a), encontraram que os aminoácidos glutamina, histidina, valina, metionina e leucina são estimulantes para *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Os últimos autores afirmaram que cada aminoácido isolado não mostra nenhum efeito estimulante, entretanto a mistura deles resultou numa produção mais rápida de ácido em *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Outro estudo de SHANKAR & DAVIES (1976), indicou que certos peptídeos resultantes da caseína do leite, pela ação de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, são estimulantes para o crescimento de *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

Segundo HIGASHIO *et al* (1977b), no crescimento simbiótico em leite, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produz substâncias estimulantes para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que foram identificadas como ácido fórmico e ácido pirúvico. Esses dois ácidos mostraram efeito combinado na estimulação da produção de ácido no leite.

Galesloot *et al*⁶ citado por MOON & REINBOLD (1976), afirmaram que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produzia ácido fórmico que estimulava *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Esse trabalho enfatiza o estímulo na produção de ácido por culturas mistas, o que reduz o tempo de produção e, conseqüentemente, diminui o custo do produto. O mesmo foi concluído por TAMIME & DEETH (1980).

SHANKAR & DAVIES (1977), sugeriram que o tratamento térmico aplicado ao leite, 95 °C por 10 min, estimula apenas a mistura dos microrganismos do iogurte, isto é, não há estimulação de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* quando este organismo cresce isolado. Isto sugere que tal tratamento sobre o leite induz *S. salivarius* subsp. *thermophilus* a produzir um fator estimulante para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que pode ser o ácido fórmico. SHARPE (1979), afirma que é possível que tal tratamento abaixe a quantidade de oxigênio o suficiente para que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produza ácido fórmico.

Segundo DRIESSEN *et al* (1982), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* precisa de dióxido de carbono

⁶GALESLOOT, T.E.; Hassing, F.; Verenga, H.A. Symbiosis in Yogurt. I. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. Netherlands Milks and Dairy Journal, 22: 5-63, 1968.

(CO₂) em concentrações maiores ou iguais a 31 mg por kg de leite. A produção de CO₂ por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* em cultura pura, não é tão rápida quanto em cultura mista. Esse fenômeno é causado, provavelmente, pelo estímulo de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Estes mesmos autores afirmaram que devido as melhores condições de crescimento, a produção de CO₂ é mais rápida. Este é um elemento essencial para a protocooperação das bactérias do iogurte, porém a sua remoção durante o tratamento térmico do leite não retarda apreciavelmente a produção de ácido em cultura mista, devido a rápida formação de CO₂ por *S. salivarius* subsp. *thermophilus*.

MOON & REINBOLD (1976), afirmaram que o crescimento de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em cultura mista é menos vigoroso. Meers⁷ citado por estes autores conclui que a inibição de um organismo em cultura mista pode ser devido à super-população, pH subótimo, competição por nutrientes ou presença de um composto inibidor.

MOON & REINBOLD (1976), afirmaram também que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* produz um fator inibidor, pois a inibição era máxima quando este predominava no inóculo e mínima quando *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

⁷ MEERS, J.L. Growth of bacteria in mixed cultures. Revista de Microbiologia, 1: 139-184, 1973.

estava em maior número. Em condições ótimas, *S. salivarius* subsp. *thermophilus* cresce mais rapidamente podendo haver competição por nutrientes.

2.2.3. Produção de Ácido e Atividade Proteolítica na Fermentação

Segundo MOON & REINBOLD (1974), a estimulação ou não de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para a produção de ácido, quando cultivadas em associação, depende da linhagem usada e da temperatura de incubação. Estimulação ocorre a 32, 37 e 42 °C, mas não ocorre a 21 ou 48 °C. Estes autores afirmam que quando filtrado de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* era adicionado à cultura de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* havia um aumento na produção de ácido em relação ao controle. Quando filtrado deste último era adicionado à cultura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* havia pouco aumento na produção de ácido em relação ao controle, o mesmo ocorrendo quando adicionava-se filtrado da cultura mista às culturas puras.

MOON *et al* (1975), MOON & REINBOLD (1976) e LAPROPOULOS *et al* (1982), concluíram em seus estudos que a taxa de produção de ácido láctico no crescimento associativo de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é maior do que quando as culturas são

cultivadas separadamente.

BAUTISTA *et al* (1966), afirmaram que a alta produção de ácido por culturas mistas de microrganismos do iogurte, no leite, quando comparada com estes microrganismos crescendo isolados é devido principalmente ao aumento do crescimento de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* estimulado pela produção de glicina e histidina por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, implicando que este tem atividade proteolítica.

A acidez titulável é mais alta em cultura pura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que em cultura pura de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ou que a mistura de ambos, no final de 24 horas, a uma temperatura de incubação de 42 °C, em leite de vaca, o mesmo ocorrendo com a atividade proteolítica (SINGH *et al*, 1980). Entretanto, DUTTA *et al* (1972), afirmaram que a temperatura de incubação não tem efeito significativo sobre a atividade proteolítica.

SINGH & SHARMA (1982), estudando linhagens de microrganismos do iogurte, encontraram que a atividade proteolítica era maior na associação do que quando eles foram incubados separadamente. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentou atividade proteolítica mais alta que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* em todas as linhagens estudadas após 24 horas a uma temperatura de incubação de 37 °C, o mesmo ocorrendo com a acidez titulável.

Segundo SLOCUM *et al* (1988a), a atividade proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* influencia na qualidade e aceitabilidade do iogurte. Esses autores afirmaram que a atividade proteolítica do primeiro é maior que a do segundo, afirmativa reforçada por OGAI *et al* (1972), porém há diferenças significantes entre linhagens da mesma espécie, e o crescimento associativo, na maioria das vezes, inibe a proteólise.

ARGYLE *et al* (1976), afirmaram que proteólise mais intensa ocorre durante a fase logarítmica de crescimento dos microrganismos do iogurte, então declina lentamente, depois que a fase estacionária é atingida. Por isso, a maior intensidade de proteólise ocorre nas primeiras 24 a 48 horas, resultando num decréscimo de atividade durante o armazenamento de iogurte. Desta forma, segundo RASIC & KURMANN (1978), os aminoácidos produzidos no iogurte, representam aproximadamente 1% da proteína total do leite, resultando num aumento do conteúdo de aminoácidos livres de 6 a 24 mg por 100 ml do produto.

2.3. Armazenamento

2.3.1. pH e Acidez Titulável

Muitos são os autores que estudaram como aumentar o tempo de armazenamento do iogurte. COTTENIE (1978), sugeriu alguns métodos, dentre eles está o tratamento térmico do produto final. Entretanto, DAVIS (1971), afirmou que para que seja atribuído valor terapêutico ao iogurte, o número de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é de grande importância. Além disso, o baixo valor de pH e a alta sobrevivência de bactérias lácticas inibe efetivamente o crescimento de contaminantes, que pode ser evitado por volta de um mês a uma temperatura de armazenamento de 5 °C.

Segundo SINHA et al (1989), o desenvolvimento de acidez é medido através do pH e da acidez titulável no iogurte comercialmente produzido, e contribuem para o sabor e aroma. Super-acidificação durante a estocagem resultou em defeito de sabor, indicando maior número de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* no produto armazenado.

SALJI & ISMAIL (1983), afirmaram que tanto o pH como a acidez titulável sofrem mudanças mais acentuadas na primeira semana de armazenamento que nas duas semanas posteriores.

Segundo TOBA *et al* (1982), durante o armazenamento do iogurte a 5 °C, o pH decresceu ligeiramente e a acidez titulável aumentou levemente.

SALJI *et al* (1987), estudando a variação do pH concluíram que este diminuía a medida que se aumentava a temperatura de armazenamento (Tabela 1),

Tabela 1 - Variação do pH de acordo com tempo e temperatura de armazenamento

Temp. (°C)	Tempo (horas)			
	0	5	10	15
7	4,84	4,30	4,30	4,27
10	4,68	4,11	4,11	4,10
15	4,64	4,07	4,07	4,02

Fonte: SALJI *et al*, 1987.

TAMIME *et al* (1987a), observaram que todos os tipos de iogurte estudados mostraram desenvolvimento de acidez após armazenamento a 5 e 10 °C, embora a 10 °C as mudanças sejam bem mais acentuadas. Estes autores recomendaram pHs entre 4,2 a 4,4 e manter o produto a 5 °C durante o armazenamento, transporte e distribuição.

2.3.2. Sobrevivência

HAMMAN & MARTH (1984) afirmaram que, tipicamente, a população de organismos viáveis do iogurte aumenta inicialmente após sua manufatura e então decresce durante o armazenamento refrigerado do produto. Estes autores observaram que a temperatura de incubação influencia o número inicial de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, mas tem pouco efeito na sobrevivência destes dois microrganismos durante um longo período de armazenamento.

DAVIS (1970), sugeriu que o iogurte deve conter um número de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, maior ou igual a 10^7 por ml, para ser consumido.

Tabela 2 - Padrão microbiológico por ml de iogurte natural para consumo.

Microrganismos	Satisfatório
<i>S. thermophilus</i>	$> 10^8$
<i>L. bulgaricus</i>	$> 10^8$
Coliformes	< 1
Leveduras	< 10
Fungos	< 1

Fonte: DAVIS et al (1971)

Segundo TAMIME & DEETH (1980) e SELLARS (1981) o tempo de validade do iogurte que não sofreu tratamento térmico após a fermentação é acima de 3 a 4 semanas sob refrigeração. Eles afirmaram que o tempo de validade, no entanto, não é apenas dependente das condições de armazenamento, mas também depende da cultura empregada, sua bioquímica e padrões sanitários durante a produção, embalagem e armazenamento. LEE *et al* (1990), afirmaram que a sobrevivência das bactérias do iogurte é dependente das linhagens usadas e da razão entre *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

FELLER *et al* (1989), estudando amostras de iogurte natural e iogurte acrescido de 10% de sacarose encontraram que a contagem de bactérias lácticas, em iogurte natural, aumentou consideravelmente quando armazenadas a 4 °C por um período de 7 a 14 dias, baixando novamente ao nível inicial no decorrer do armazenamento. Nenhum aumento foi observado em iogurte com 10% de sacarose ou em amostras armazenadas a 15 °C. O conteúdo de ácido láctico aumentou em todas amostras. Houve também aumento na concentração de aminoácidos livres, indicando proteólise.

Segundo TAMIME *et al* (1987a), a temperatura de armazenamento é inversamente proporcional ao número de microorganismos do iogurte. Estes autores afirmaram que o produto recém fabricado tem contagem total maior do que o iogurte armazenado a 10 °C.

DAVIS (1970), usando o meio de cultivo LAB ágar encontrou poucas mudanças num período acima de 28 dias na contagem de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no iogurte armazenado a 5 °C. Entretanto, a contagem desses microrganismos decresce marcadamente após 14 dias a 15 °C.

GLÄTTLI et al (1974), armazenaram iogurte a 10 °C e 20 °C e encontraram que o número de bactérias lácticas decresce rapidamente depois de 40 e 25 dias respectivamente, mas o número não decresce a menos que 1 milhão por ml durante 80 dias de armazenamento a 5 °C.

2.3.3. Proteólise

A atividade proteolítica pode ser associada com certas propriedades físicas e organolépticas do produto final (WILLIAMSON & SPECK, 1962).

Segundo MARSHALL (1987), a proteólise e a produção de polissacarídeos por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* são muito importantes para se obter um produto de boa textura.

SLOCUM et al (1988b), afirmaram que a proteólise é dependente da sacarose adicionada ao produto e do tempo de armazenamento do mesmo, e varia de acordo com a cultura usada. Para algumas culturas o efeito combinado da

sacarose e o tempo de armazenamento sobre a proteólise são dependentes da quantidade de gordura do leite utilizado.

GARCIA & VALLE (1986), afirmaram que a atividade proteolítica das culturas puras foi maior para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* do que para *S. salivarius* subsp. *thermophilus*. Houve um aumento considerável em μg de tirosina por ml de iogurte armazenado por 4 dias a 15 °C.

Segundo FORMISANO *et al* (1971), a atividade proteolítica decresce quando o pH decresce de 7 para 4. Estes autores estudaram *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* separadamente ou em combinação e encontraram que o primeiro tem atividade proteolítica maior. Eles concluíram que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* utiliza os produtos da proteólise quando os dois microrganismos são cultivados em associação. A taxa inicial de acumulação de produtos da proteólise declina rapidamente depois da refrigeração do iogurte, talvez devido à temperatura e pH mais baixos.

3. MATERIAIS E METODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matéria-prima

A matéria prima utilizada para a fabricação do iogurte foi o leite tipo C (Leco), pasteurizado, comercializado na região de Piracicaba. Este era transportado dos caminhões refrigerados de distribuição diretamente para o laboratório.

Para a fortificação do leite de fabricação e preparo do inóculo foi utilizado leite em pó desnatado (Molico, Nestlé).

3.1.2. Culturas Lácticas

Foram utilizadas duas linhagens de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e duas linhagens de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isoladas de duas marcas de iogurtes comerciais (Paulista e Chambourcy) do tipo natural.

3.1.3. Meio para Isolamento das Culturas

Para o isolamento das culturas foi utilizado o meio de cultivo TPHY-Eriocromo Agar (BRACQUART, 1981).

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento e Conservação das Culturas

O isolamento de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* foi feito em TPHY-eriocromo ágar, através da morfologia de colônia e observação em microscópio, no próprio laboratório.

Os microrganismos isolados foram transferidos separadamente das placas para o meio tornassolado "Litmus milk", incubados a $42^{\circ}\text{C} \pm 1$ até ocorrer coagulação parcial, para impedir a injúria celular devido a elevação excessiva da acidez do meio em conjunto com a baixa temperatura de armazenamento. Os tubos contendo as culturas foram armazenados em congelador a $-15^{\circ}\text{C} \pm 1$ para que pudessem ser utilizados durante toda fase experimental.

3.2.2. Leite

3.2.2.1. Fortificação

Cinco litros de leite foram desembalados, colocados num balde de alumínio com capacidade para 10 l e homogeneizados com uma espátula de madeira. Calculou-se então o extrato seco total (EST) do leite pelo método sugerido por LANARA (1981) corrigindo-o para 16% através da adição de leite em pó desnatado. Essa mistura foi homogeneizada por 10 minutos com movimentos vigorosos e circulares com espátula de madeira.

3.2.2.2. Tratamento Térmico e Resfriamento

Após homogeneização dividiu-se o leite em 3 porções de 1,6 l que foram colocados em erlenmeyers pré-esterilizados com capacidade para 3 l, tamponados com algodão e submetidos ao vapor fluente, em autoclave, por 20 min. Em seguida, o conteúdo de cada erlenmeyer foi resfriado em água corrente até atingir a temperatura de $\pm 45^{\circ}\text{C}$. Amostras desse leite foram coletadas assepticamente para determinação da acidez titulável (FERREIRA & CHAVES, 1981); teor de gordura (A.O.A.C., 1975); índice de proteólise (HULL, 1947) e pH, por leitura direta em potenciômetro digital, Digimed Modelo DMPH-2.

3.2.3. Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado leite em pó desnatado reconstituído a 12% de sólidos totais, distribuído em tubos de vidro pré-esterilizados de 150 x 15 mm e fechados com tampão de algodão, e submetidos ao vapor fluente, em autoclave, por 20 min.

A esse leite foi adicionado 1% de cultura lática, seguido de incubação a $42^{\circ}\text{C} \pm 1$ até coagulação ($\simeq 4$ horas). As culturas foram repicadas separadamente por duas vezes. A mistura de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* só ocorreu no momento da inoculação para a fabricação do iogurte e dependendo do tratamento.

Para que a proporcionalidade 1:1 fosse obtida, foi feito um plaqueamento das culturas em meio de cultivo TPY-Eriocromo Ágar (BRACQUART, 1981), com o objetivo de estimar o número de células por ml de cada um dos tubos de inóculo.

Para isso, homogeneizamos as amostras num agitador tipo Phoenix (modelo AT 56) e retiramos assepticamente amostras com auxílio de pipetas. A diluição foi feita em água peptonada esterilizada (1%).

3.2.4. Inoculação e Incubação

Cada um dos três erlenmeyers (Item 3.2.2.2.) recebeu as seguintes culturas:

- 1º - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- 2º - *Lactobacillus delbrueckii* + *Streptococcus salivarius* subsp. *bulgaricus*
- 3º - *Streptococcus salivarius* subsp. *bulgaricus*

Após esse procedimento os erlenmeyers foram agitados para que os microrganismos se dispersassem uniformemente no leite. Depois, o conteúdo de cada frasco foi distribuído em alíquotas de 30 ml assepticamente em tubos de ensaio de 200 x 25 mm, previamente esterilizados num total de 15 tubos para cada tratamento.

Os tubos contendo o leite inoculado foram levados a uma estufa com temperatura controlada à $42^{\circ}\text{C} \pm 1$ e incubados por 4:00 horas.

3.2.5. Resfriamento e Armazenamento

Após a incubação, metade do lote de tubos correspondente a cada tratamento (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *S. salivarius* subsp. *thermophilus*) foi levada diretamente à geladeira.

A outra metade foi submetida ao resfriamento em banho de gelo até que a temperatura do produto atingisse a $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ e então retirada e levada à geladeira. Em ambos os casos os tubos foram mantidos por 25 dias às temperaturas de 3, 7 e 12°C .

3.2.6. Análises Físico-Químicas

As análises das amostras foram feitas a cada 5 dias, a começar da data de "fabricação".

3.2.6.1. Acidez Titulável

Pelo método descrito por LANARA (1981) e expressa em g de ácido láctico por 100 ml de amostra.

3.2.6.2. pH

Determinado através de potenciômetro digital, Digimed, Modelo DMPH-2.

3.2.6.3. Índice de Proteólise

Pelo método descrito por HULL (1947) e os resultados expressos em mg de tirosina por 100 ml de amostra.

3.2.7. Análise Microbiológica

A análise microbiológica foi feita por plaqueamento usando-se o meio de cultivo TPPY-Eriocromo Ágar, sugerido por BRACQUART (1981), com incubação em estufa a $42^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 48 horas. Fez-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), em contador de colônias tipo Quebec.

3.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial $2 \times 3 \times 6 \times 6$. Para se constatar diferenças entre as médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1985).

Tabela 3 - Esquema de Análise de Variância

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE
Linhagens (L)	1
Temperaturas (T)	2
Tratamento (Tr)	5
Tempo (Tp)	5
L x T	2
L x Tr	5
L x Tp	5
T x Tr	10
T x Tp	10
Tr x Tp	25
L x T x Tr x Tp	50
Resíduos	527
Total	647

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 4 são apresentadas as análises físico-químicas do leite utilizado como matéria-prima. Na tabela 5 são apresentadas as análises de variância para acidez titulável, atividade proteolítica, pH e sobrevivência com os valores de F e respectivos níveis de significância. Nas tabelas 6 a 27 são apresentadas as análises das interações entre os parâmetros: linhagens, temperaturas, tratamentos e tempo com relação a acidez titulável (Tabelas 6 a 11), atividade proteolítica (Tabelas 12 a 18), pH (Tabelas 19 a 24) e sobrevivência (Tabelas 25 a 27). Os valores utilizados para essas análises são apresentados nos apêndices 1 a 24. Nas Figuras 1 a 8 são apresentadas as curvas de comportamento dos parâmetros: acidez titulável (Figuras 1 e 2: Gráficos 1 a 3 e 4 a 6), atividade proteolítica (Figuras 3 e 4: Gráficos 7 a 9 e 10 a 12), pH (Figuras 5 e 6: Gráficos 13 a 15 e 16 a 18) e sobrevivência dos microrganismos (Figuras 7 e 8: Gráficos 19 a 21 e 22 a 24), de acordo como tempo de armazenamento.

Tabela 4 - Dados das análises Físico-Químicas do leite utilizado como matéria-prima no experimento (média de 6 repetições).

Análises	Resultados
Acidez (mg de Ac. láctico/100 ml)	0,15
Gordura (%)	2,66
Índice de proteólise $\left[\begin{array}{c} \text{mg de} \\ \text{tirosina} \\ \text{por 100 ml} \end{array} \right]$	7,06
pH	6,70

Tabela 5 - Análise de variância para acidez titulável, atividade proteolítica, pH, sobrevivência com relação as linhagens, temperatura de armazenamento, tratamento, tempo e suas interações.

FONTE DE VARIACÃO	ACIDEZ TITULÁVEL	ATIVIDADE PROTEOL.	pH	SOBREVI-VÊNCIA
Linhagens (L)	325,01**	96,13**	43,32**	173,76**
Temperat. (T)	176,23**	125,18**	95,30**	61,12**
Trat. (Tr)	138,48**	551,89**	90,29**	34,01**
Tempo (Tp)	88,56**	50,71**	38,72**	10,24**
L x T	51,92**	88,31**	15,05**	27,58**
L x Tr	27,78**	2,42*	23,51**	9,26**
L x Tp	0,92 ^{n.s.}	17,06**	11,26**	1,35 ^{n.s.}
T x Tr	6,13**	11,27**	13,06**	19,34**
T x Tp	12,59**	6,04**	25,79**	2,47**
Tr x Tp	1,20 ^{n.s.}	2,36**	0,66 ^{n.s.}	2,92**
L x T x Tr x Tp	0,81 ^{n.s.}	1,30 ^{n.s.}	1,00 ^{n.s.}	1,24 ^{n.s.}
COEFICIENTES DE VARIACÃO (%)	17,55	15,23	7,20	58,70

** significativo a 1%

* significativo a 5%

n.s. não significativo

4.1. Acidez Titulável

A análise estatística dos resultados obtidos para acidez titulável mostra que as linhagens de *S. salivarius* subsp *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* isoladas a partir de iogurte Chambourcy produziram maior acidez titulável que as linhagens isoladas a partir do iogurte Paulista e há diferença significativa entre as suas médias concordando com a afirmação feita por LEE *et al* (1990), de que a produção de acidez é dependente da linhagem utilizada (Figuras 1 e 2: Gráficos 1 a 3 e 4 a 6).

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 1 - Acidez titulável, a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy (mg de ácido láctico/100 ml de amostra).

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 2 - Acidez titulável, a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Paulista (mg de ácido láctico/100 ml de amostra).

O aumento de acidez titulável foi diretamente proporcional à temperatura de armazenamento (Tabela 6). À temperatura de 12°C ambas as linhagens (Paulista e Chambourcy) produziram valores maiores de acidez titulável do que à temperatura de 3°C (Figuras 1 e 2: Gráficos 1 a 3 e 4 a 6), com diferença significativa entre as médias nas diferentes temperaturas. Dados semelhantes foram obtidos por Abrahamsen⁸, citado por MATALON & SANDINE (1986), que encontrou um aumento na quantidade total de ácido láctico durante o armazenamento de iogurte às temperaturas de 3, 10 e 15°C respectivamente.

Tabela 6 - Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TEMPERATURA			MÉDIAS
	3 °C	7 °C	12 °C	
CHAMBOURCY	0,76 ^{Ac}	1,10 ^{Ab}	1,16 ^{Aa}	1,01 ^A
PAULISTA	0,71 ^{Bc}	0,78 ^{Bb}	0,86 ^{Ba}	0,78 ^B
MÉDIAS	0,74 ^c	0,94 ^b	1,01 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁸ ABRAHAMSEN, R.K. The content of lactic acid and acetaldehyde in yoghurt stored at different temperatures. XX International Congress, Norway, E(829-830), 1978.

Os tratamentos que apresentaram maiores médias em acidez titulável foram o III e IV (Tabela 7) que correspondem aos tratamentos onde foi empregada a mistura de *S. salivarius* subsp *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* tanto para as linhagens do tipo Chambourcy quanto para as linhagens do tipo Paulista nas três temperaturas empregadas e com diferença significativa entre elas (Tabela 8 e Figuras 1 e 2: Gráficos 1 a 3 e 4 a 6) concordando com estudos feitos por MOON & REINBOLD (1974 e 1976), MOON *et al* (1975) que concluíram que a mistura de *S. salivarius* subsp *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* produz mais acidez que quando esses microrganismos são cultivados isoladamente.

Tabela 7 - Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
CHAMBOURCY	0,97 ^{Ac}	1,16 ^{Ab}	1,19 ^{Aab}	1,27 ^{Aa}	0,71 ^{Ad}	0,74 ^{Ad}	1,01 ^A
PAULISTA	0,68 ^{Bb}	0,72 ^{Bb}	0,93 ^{Ba}	0,99 ^{Ba}	0,69 ^{Ab}	0,69 ^{Ab}	0,78 ^B
MÉDIAS	0,83 ^d	0,94 ^c	1,06 ^b	1,13 ^a	0,70 ^e	0,71 ^e	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8 - Análise da interação Tempo x Temperatura de armazenamento com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido lático / 100 ml de amostra).

TEMPERAT.	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
3 °C	0,60 ^{Bb}	0,72 ^{Ba}	0,79 ^{Ca}	0,79 ^{Ca}	0,78 ^{Ca}	0,74 ^{Ca}	0,74 ^C
7 °C	0,72 ^{Ad}	0,88 ^{Ac}	0,94 ^{Bbc}	1,01 ^{Bab}	1,01 ^{Bab}	1,09 ^{Ba}	0,94 ^B
12 °C	0,62 ^{Be}	0,84 ^{Ad}	1,05 ^{Ac}	1,11 ^{Abc}	1,19 ^{Aab}	1,25 ^{Aa}	1,01 ^A
MÉDIAS	0,65 ^d	0,81 ^c	0,93 ^b	0,97 ^{ab}	0,99 ^a	1,02 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos I e II sempre apresentaram maiores médias em acidez titulável que os tratamentos V e VI (Tabelas 7,9 e 10 e Figuras 1 e 2: Gráficos 1 a 3 e 4 a 6) indicando que *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* produz mais ácido que *S. salivarius* subsp *thermophilus* concordando com o Manual de Bergey (SNEATH et al, 1986).

Tabela 9 - Análise da interação Tratamentos x Temperatura de armazenamento com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico / 100 ml de amostra).

TEMPERAT.	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
3 °C	0,58 ^{Bc}	0,78 ^{Bb}	0,93 ^{Ca}	0,94 ^{Ca}	0,60 ^{Cc}	0,60 ^{Cc}	0,74 ^C
7 °C	0,95 ^{Ac}	1,05 ^{Ab}	1,03 ^{Bbc}	1,18 ^{Ba}	0,71 ^{Bd}	0,72 ^{Bd}	0,94 ^B
12 °C	0,95 ^{Ab}	0,99 ^{Ab}	1,22 ^{Aa}	1,28 ^{Aa}	0,80 ^{Ac}	0,82 ^{Ac}	1,01 ^A
MÉDIAS	0,83 ^d	0,94 ^c	1,06 ^b	1,13 ^a	0,70 ^e	0,71 ^e	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Análise da interação Tempo x Tratamentos com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido láctico / 100 ml de amostra).

TRATAMENTOS	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
I	0,57	0,72	0,85	0,91	0,93	0,99	0,83 ^d
II	0,64	0,83	0,96	1,03	1,07	1,11	0,94 ^c
III	0,73	0,99	1,08	1,14	1,19	1,22	1,06 ^b
IV	0,89	1,06	1,22	1,23	1,21	1,18	1,13 ^a
V	0,52	0,63	0,72	0,75	0,79	0,81	0,70 ^e
VI	0,53	0,64	0,73	0,78	0,77	0,84	0,71 ^e
MÉDIAS	0,65 ^d	0,81 ^c	0,93 ^b	0,97 ^{ab}	0,99 ^a	1,02 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

SINGH *et al* (1980), encontraram que a acidez titulável é superior na cultura de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* que na cultura pura de *S. salivarius* subsp *thermophilus* ou na mistura de ambos; o que, em parte, discorda com os dados obtidos neste trabalho, conforme já mencionado no parágrafo anterior em que os tratamentos III e IV atingiram maiores valores em acidez titulável.

Não houve diferença significativa entre as médias de acidez titulável desenvolvida pelas linhagens no decorrer do tempo de armazenamento (Tabela 11), indicando que a variável linhagem é a mais importante em termos de desenvolvimento de acidez durante a incubação, mas não durante o armazenamento, provavelmente por serem linhagens selecionadas para pós-acidificação lenta.

Tabela 11 - Análise da interação Linhagens x Tempo com relação a produção de acidez titulável (mg de ácido lático / 100 ml do produto).

LINHAGENS	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
CHAMBOURCY	0,78	0,91	1,02	1,10	1,10	1,13	1,01 ^A
PAULISTA	0,51	0,71	0,83	0,85	0,88	0,92	0,78 ^B
MÉDIAS	0,65 ^d	0,81 ^c	0,93 ^b	0,97 ^{ab}	0,99 ^a	1,02 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em todas as temperaturas, os tratamentos II, IV e VI apresentaram médias superiores de acidez titulável às dos tratamentos I, III e V embora diferenças significativas existam apenas entre as médias dos

tratamentos I e II para as temperaturas de armazenamento 3 e 7°C e entre as médias dos tratamentos III e IV, na temperatura de armazenamento de 7°C. Isto sugere que o resfriamento rápido tem efeito de retardamento da pós-acidificação conforme afirmação feita por ACOLLAS *et al* (1977), embora esse efeito seja, em alguns casos, não significativo (Tabela 10).

O tempo zero (dias) apresenta menor média em acidez titulável em relação aos demais na temperatura de armazenamento de 3°C, com diferença significativa entre eles (Tabela 8).

A partir do dia zero, as médias passam a aumentar e diferir significativamente entre si nas três temperaturas de armazenamento utilizadas, sendo que as maiores médias foram obtidas para a temperatura de armazenamento de 12°C nos tempos 15, 20 e 25 dias respectivamente (Tabela 8), concordando com a afirmação feita por JORDANO *et al* (1988), de que a acidez titulável é diretamente proporcional ao tempo de armazenamento, porém discordando com outra afirmação feita pelo mesmo autor de que as mudanças mais marcantes ocorrem nos primeiros 11 dias de armazenamento do que entre o 11º e 21º dias. Os apêndices 1 a 6 e Figura 1 (Gráficos 1 a 6) mostram as variações de acidez titulável durante o armazenamento.

Segundo DAVIS (1970), a acidez aceitável para o consumo do iogurte deve estar numa faixa de 0.7 a

1.2% de ácido lático, isto faz com que, baseados nos resultados obtidos neste trabalho, observe-se que a uma temperatura de armazenamento de 3°C o iogurte por nós produzido pode ser seguramente consumido com 25 dias de armazenamento para ambas as linhagens (Apêndices 1 e 4). As temperaturas de armazenamento de 7 e 12°C pode-se consumir o iogurte por nós produzido com a linhagem tipo Chambourcy antes de 5 dias de armazenamento e até 25 dias para as linhagens Paulista (Apêndices 2, 3, 5 e 6).

O que se pode sugerir, portanto, é a diminuição do tempo de incubação para culturas mais rápidas, no caso a do tipo Chambourcy, visto que, neste trabalho o tempo de incubação foi fixado em 4 horas para ambas culturas, desprezando-se a rapidez ou lentidão das mesmas ou da associação, que poderia ser controlada pelo pH.

4.2. Atividade Proteolítica

As linhagens do tipo Chambourcy apresentaram atividade proteolítica mais intensa e significativamente diferente das linhagens do tipo Paulista, sendo que à temperatura de armazenamento de 12°C essa atividade foi maior que a 7 e 3°C respectivamente em todos os tempos (Tabela 12 e 13).

Tabela 12 - Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina/ 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TEMPERATURA			MÉDIAS
	3 °C	7 °C	12 °C	
CHAMBOURCY	18,0 ^{Ab}	23,0 ^{Aa}	18,0 ^{Ab}	20,0 ^A
PAULISTA	14,0 ^{Bc}	18,0 ^{Bb}	20,0 ^{Ba}	17,0 ^B
MÉDIAS	16,0 ^c	19,0 ^b	21,0 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Análise da interação Linhagens x Tempo com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
CHAMBOURCY	18,0 ^{Ab}	20,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	21,0 ^{Aa}	20,0 ^A
PAULISTA	13,0 ^{Bd}	15,0 ^{Bc}	18,0 ^{Bb}	19,0 ^{Aab}	20,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	17,0 ^B
MÉDIAS	15,0 ^e	17,0 ^d	19,0 ^c	19,0 ^{bc}	20,0 ^{ab}	21,0 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos que apresentaram maior atividade proteolítica foram o I e II, que correspondem aos tratamentos onde apenas *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* foi utilizado concordando com dados obtidos por SINGH & SHARMA (1982), FORMISANO *et al* (1971) e SLOCUM *et al* (1988a), que encontraram que esse microrganismo apresenta maior atividade proteolítica que *S. salivarius* subsp *thermophilus* quando crescendo isoladamente ou quando crescendo em associação. Esse fato pode ser explicado retornando-se aos estudos feitos pelos mesmos autores acima citados que encontraram que o nível mais baixo de proteólise em culturas em associação se deve à simbiose que ocorre entre esses dois microrganismos, e não no decréscimo de proteína quebrada, pois segundo Pette & Lolkema⁹ citado por RADKE-MITCHELL & SANDINE (1984), *S. salivarius* subsp *thermophilus* se utiliza de peptídeos e de aminoácidos liberados por *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, visto que este tem maior atividade da proteinase e aquele maior atividade da peptidase.

⁹PETTE, J.W. & LOLKEMA, H. Yoghurt I. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, Holanda, 4: 197-208, 1950.

Os tratamentos que apresentaram menor atividade proteolítica foram o V e VI, que correspondem aos tratamentos nos quais utilizou-se apenas as linhagens de *S. salivarius* subsp *thermophilus* (Tabela 14 e 15).

Tabela 14 - Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
CHAMBOURCY	26,0 ^{Aa}	26,0 ^{Aa}	21,0 ^{Ab}	22,0 ^{Ab}	12,0 ^{Ac}	12,0 ^{Ac}	20,0 ^A
PAULISTA	23,0 ^{Ba}	24,0 ^{Ba}	20,0 ^{Bb}	20,0 ^{Bb}	10,0 ^{Bc}	10,0 ^{Bc}	17,0 ^B
MÉDIAS	24,0 ^a	25,0 ^a	20,0 ^b	21,0 ^b	11,0 ^c	11,0 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 15 - Análise da interação Temperatura de armazenamento x Tratamentos com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina / 100 ml de amostra).

TEMPERAT.	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
3 °C	23,0 ^{Ba}	22,0 ^{Ca}	16,0 ^{Cb}	17,0 ^{Bb}	09,0 ^{Bc}	10,0 ^{Bc}	16,0 ^C
7 °C	27,0 ^{Aa}	27,0 ^{Aa}	24,0 ^{Ab}	23,0 ^{Ab}	11,0 ^{Ac}	10,0 ^{ABc}	19,0 ^B
12 °C	23,0 ^{Bab}	24,0 ^{Ba}	21,0 ^{Bc}	22,0 ^{Abc}	11,0 ^{Ad}	12,0 ^{Ad}	21,0 ^A
MÉDIAS	24,0 ^a	25,0 ^a	20,0 ^b	21,0 ^b	11,0 ^c	11,0 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não há diferença significativa entre os tratamentos I e II, III e IV, V e VI, nas três temperaturas de armazenamento, mostrando que estatisticamente o resfriamento rápido tem pouca ou nenhuma influência sobre a atividade proteolítica dos microrganismos durante o armazenamento.

Em todos os tratamentos houve pequena mudança nas médias de atividade proteolítica no decorrer de 25 dias de armazenamento (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise da interação Tratamentos x Tempo de armazenamento com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina / 100 ml de amostra).

TRAT.	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
I	19,0 ^{ABc}	23,0 ^{Ab}	25,0 ^{Aa}	25,0 ^{Aa}	27,0 ^{Aa}	27,0 ^{Aa}	24,0 ^A
II	21,0 ^{Ac}	23,0 ^{Abc}	25,0 ^{Aab}	26,0 ^{Aa}	25,0 ^{Aab}	27,0 ^{Aa}	25,0 ^A
III	17,0 ^{Bcb}	18,0 ^{Bb}	21,0 ^{Ba}	21,0 ^{Ba}	22,0 ^{Ba}	23,0 ^{Ba}	20,0 ^B
IV	16,0 ^{Cb}	20,0 ^{Ba}	21,0 ^{Ba}	21,0 ^{Ba}	23,0 ^{Ba}	23,0 ^{Ba}	21,0 ^B
V	09,0 ^{Db}	10,0 ^{cab}	10,0 ^{cab}	11,0 ^{cab}	12,0 ^{cab}	12,0 ^{ca}	11,0 ^C
VI	09,0 ^{Da}	11,0 ^{Ca}	10,0 ^{Ca}	11,0 ^{Ca}	11,0 ^{Ca}	12,0 ^{Ca}	11,0 ^C
MED.	15,0 ^e	17,0 ^d	19,0 ^c	19,0 ^{bc}	20,0 ^{ab}	21,0 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As maiores mudanças ocorreram nos primeiros 5 dias de armazenamento, exceto para os tratamentos I e III onde alterações significativas ocorreram nos primeiros 10 dias e no tratamento VI onde não ocorreu modificação significativa durante todo tempo de armazenamento (Tabela 17).

Tabela 17 - Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação a atividade proteolítica (mg de tirosina / 100 ml de amostra).

TEMP.	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
3 °C	14,0 ^{Bc}	15,0 ^{Bbc}	17,0 ^{Bab}	17,0 ^{Ba}	17,0 ^{Cab}	17,0 ^{Ca}	16,0 ^C
7 °C	17,0 ^{Ad}	18,0 ^{Acd}	19,0 ^{Abc}	21,0 ^{Ab}	23,0 ^{Aa}	24,0 ^{Aa}	19,0 ^B
12 °C	15,0 ^{Bb}	19,0 ^{Aa}	20,0 ^{Aa}	19,0 ^{Aa}	20,0 ^{Ba}	20,0 ^{Ba}	21,0 ^A
MÉDIAS	15,0 ^e	17,0 ^d	19,0 ^c	19,0 ^{bc}	20,0 ^{ab}	21,0 ^a	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir do 10^o dia as linhagens passam a desempenhar uma atividade proteolítica pouca intensa (Tabela 15 e 16), concordando com FORMISANO *et al* (1971), que afirmam que a taxa inicial de acumulação dos produtos de proteólise declina rapidamente após a refrigeração do iogurte, talvez devido à temperatura e pH baixos.

Em todos os tratamentos, a atividade proteolítica foi maior a 7°C do que a 12°C, exceto nos tratamentos V e VI. Diferenças significativas foram encontradas nos tratamentos I, II e III. A 3°C as médias da atividade proteolítica foram menores em todos os tratamentos. A maior atividade proteolítica ocorreu nos tratamentos I e II a 7°C (Tabela 15).

Os Apêndices 7 a 12 e Figuras 3 e 4 (Gráficos 7 a 9 e 10 a 12) mostram as variações na atividade proteolítica durante o armazenamento.

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 3 - Atividade proteolítica a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy (mg de tirosina/100 ml de amostra).

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 4 - Atividade proteolítica a 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Paulista (mg de tirosina/100 ml de amostra).

4.3. pH

Nota-se através do quadro de análise estatística (Tabela 18) que as médias dos valores de pH foram maiores nas linhagens do tipo Paulista em relação às linhagens do tipo Chambourcy. Para ambas linhagens, as maiores médias de pH foram encontradas na temperatura de armazenamento de 3°C e as menores a 12°C, embora para as linhagens do tipo Chambourcy não haja diferença estatisticamente significativa entre as temperaturas 7 e 12°C (Tabela 18). Por isso os dados do presente trabalho concordam em parte com os obtidos por SALJI & ISMAIL (1983), que encontraram que o armazenamento a 7°C provocava uma diminuição mais acentuada no pH do iogurte que o armazenamento a uma temperatura de 4°C, visto que para a linhagem Chambourcy houve um aumento no valor do pH na temperatura de 12°C em relação a temperatura 7°C; apesar de, como o mencionado acima, estatisticamente insignificante. As Figuras 5 e 6 (Gráficos 13 a 15 e 16 a 18) mostram a variação de pH nas amostras onde cultivou-se as linhagens do tipo Chambourcy ou Paulista nas temperaturas de 3, 7 e 12°C durante 25 dias de armazenamento.

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 5 - pH à 3, 7 e 12°C para a(s) cultura(s) Chambourcy

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 6 - pH à 3, 7 e 12 °C para a(s) cultura(s) Paulista

Tabela 18 - Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação ao pH.

LINHAGENS	TEMPERATURA			MÉDIAS
	3 °C	7 °C	12 °C	
CHAMBOURCY	4,72 ^{Ba}	4,26 ^{Bb}	4,36 ^{Ab}	4,45 ^B
PAULISTA	4,84 ^{Aa}	4,62 ^{Ab}	4,39 ^{Ac}	4,62 ^A
MÉDIAS	4,78 ^a	4,44 ^b	4,37 ^b	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nos tratamentos I e II, nos quais usou-se apenas *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, as médias de pH para a linhagem do tipo Paulista são significativamente maiores que as da linhagem do tipo Chambourcy, embora para os tratamentos III, IV, V e VI não haja diferença significativa entre as linhagens (Tabela 19).

Tabela 19 - Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação ao pH.

LINHAGENS	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
CHAMBOURCY	4,48 ^{Bb}	4,16 ^{Bc}	4,25 ^{Ac}	4,15 ^{Ac}	4,83 ^{Aa}	4,80 ^{Aa}	4,45 ^B
PAULISTA	4,94 ^{Aa}	4,81 ^{Aab}	4,17 ^{Ac}	4,15 ^{Ac}	4,86 ^{Aab}	4,77 ^{Ab}	4,62 ^A
MÉDIAS	4,71 ^b	4,49 ^c	4,21 ^d	4,15 ^d	4,85 ^a	4,78 ^{ab}	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para ambas as linhagens, nas três temperaturas de armazenamento, as maiores médias de valores de pH foram encontradas nos tempos 0 e 5 dias, respectivamente (Tabelas 20 e 21).

Tabela 20 - Análise da interação Linhagens x Tempo de armazenamento com relação ao pH.

LINHAGENS	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
CHAMBOURCY	4,62 ^{Ba}	4,57 ^{Bab}	4,37 ^{Ac}	4,43 ^{Abc}	4,27 ^{Bc}	4,40 ^{Ac}	4,45 ^B
PAULISTA	5,11 ^{Aa}	4,76 ^{Ab}	4,48 ^{Ac}	4,38 ^{Ad}	4,59 ^{Ac}	4,37 ^{Ad}	4,62 ^A
MÉDIAS	4,87 ^a	4,67 ^b	4,42 ^c	4,41 ^c	4,43 ^c	4,39 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Análise da interação Tratamentos x Tempo de armazenamento com relação ao pH.

TRATAMENTOS	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
I	5,03	4,84	4,59	4,63	4,62	4,54	4,71 ^B
II	4,86	4,60	4,36	4,37	4,39	4,33	4,49 ^C
III	4,58	4,37	4,00	4,02	4,14	4,13	4,21 ^D
IV	4,38	4,24	4,06	4,06	4,04	4,15	4,15 ^D
V	5,20	5,04	4,80	4,73	4,72	4,59	4,85 ^A
VI	5,15	4,93	4,75	4,62	4,66	4,58	4,78 ^{AB}
MÉDIAS	4,87 ^a	4,67 ^b	4,42 ^c	4,41 ^c	4,43 ^c	4,39 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os maiores valores de pH foram encontrados nos tratamentos V e VI e os menores nos tratamentos III e IV (Tabela 22) em todos os tempos, mostrando que a mistura dos microrganismos, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp *thermophilus* faz com que o produto apresente um pH mais baixo do que quando um ou outro é cultivado isoladamente (tratamentos I, II, V e VI). Os tratamentos II, IV e VI sempre apresentaram médias de pH menores que os tratamentos I, III e V, embora quase sempre as diferenças não sejam significativas (Tabela 22).

Tabela 22 - Análise da interação Tratamentos x Temperatura de armazenamento com relação ao pH.

TEMPERAT.	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
3 °C	5,30 ^{Aa}	4,89 ^{Ab}	4,20 ^{Ac}	4,27 ^{Ac}	5,04 ^{Ab}	4,96 ^{Ab}	4,78 ^A
7 °C	4,42 ^{Bb}	4,26 ^{Bbc}	4,28 ^{Ab}	4,06 ^{Bc}	4,85 ^{Ba}	4,77 ^{Ba}	4,44 ^B
12 °C	4,40 ^{Bbc}	4,30 ^{Bcd}	4,15 ^{Ad}	4,13 ^{ABd}	4,65 ^{Ca}	4,61 ^{Bab}	4,37 ^B
MÉDIAS	4,71 ^b	4,49 ^c	4,21 ^d	4,15 ^d	4,85 ^a	4,78 ^{ab}	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na temperatura de armazenamento de 3°C as médias de pH foram maiores e significativamente diferentes das médias nas temperaturas de armazenamento 7 e 12°C em todos os tempos. A partir do 10^o dia foram obtidas as menores médias de valores de pH, que permanecem baixos e sem diferença significativa entre si até o 25^o dia (Tabela 23), concordando com resultados obtidos por SALJI & ISMAIL (1983), que afirmaram que, tanto o pH como a acidez titulável sofreram mudanças mais acentuadas na 1^a semana de armazenamento do que nas duas semanas posteriores.

Tabela 23 - Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação ao pH.

TEMPERAT.	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
3°C	4,87 ^{Bab}	4,64 ^{Bcd}	4,45 ^{Ad}	4,77 ^{Abc}	4,95 ^{Aab}	4,99 ^{Aa}	4,78 ^A
7°C	4,65 ^{Cab}	4,83 ^{Aa}	4,46 ^{Abc}	4,32 ^{Bcd}	4,24 ^{Bd}	4,16 ^{Bd}	4,44 ^B
12°C	5,09 ^{Aa}	4,54 ^{Bb}	4,37 ^{Ab}	4,13 ^{Cc}	4,10 ^{Bc}	4,01 ^{Bc}	4,37 ^B
MÉDIAS	4,87 ^a	4,67 ^b	4,42 ^c	4,41 ^c	4,43 ^c	4,39 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados desse trabalho concordam em parte com os resultados encontrados por SALJI *et al* (1987), JORDANO *et al* (1988), DÍAZ *et al* (1989) e SINHA *et al* (1989) que encontraram que o pH do iogurte natural diminuía a medida que se aumentava o tempo e/ou temperatura de armazenamento, pois na temperatura de armazenamento de 3°C, houve uma diminuição do pH até o 10º dia e subsequentemente aumento a partir deste dia até o 25º. Na temperatura de armazenamento de 7°C houve um aumento no 5º dia e subsequente diminuição a partir deste até o 25º dia. A afirmação feita pelos autores citados acima só é válida para a temperatura de armazenamento de 12°C.

À temperatura de armazenamento de 12°C a média de pH é menor e estatisticamente igual a média da temperatura de armazenamento de 7°C. À 3°C a média de pH é maior e estatisticamente diferente das de 12°C e 7°C. A 12°C ocorre uma diminuição de pH conforme aumenta o tempo de armazenamento. Esses resultados podem ser ilustrados pela Tabela 24.

Tabela 24 - Variação nos valores de pH de acordo com o tempo de armazenamento.

Temperatura de armazenamento	0 dias	5 dias	10 dias	14 dias
°C	pH	pH	pH	pH
7	4,84	4,44	4,30	4,27
10	4,68	4,23	4,11	4,10
15	4,64	4,13	4,07	4,02

FONTE: SALJI *et al* (1987).

As Figuras 5 e 6 (Gráficos 13 a 15 e 16 a 18) mostram as variações do pH nas amostras onde cultivou-se as linhagens do tipo Chambourcy ou Paulista nas temperaturas de 3, 7 e 12°C durante 25 dias de armazenamento de acordo com o tratamento.

4.4. Sobrevivência

As linhagens do tipo Chambourcy apresentaram maior nível de sobrevivência que as linhagens do tipo Paulista, com diferença significativa entre suas médias.

Maior nível de sobrevivência ocorreu a 3 e 7°C para ambas linhagens estudadas. Os menores níveis de sobrevivência foram encontrados para a temperatura de 12°C, que diferiu significativamente das outras duas temperaturas de armazenamento (Tabela 25). Estes resultados concordam com estudos feitos por PUHAN *et al* (1974), que afirmaram que a sobrevivência de *S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é inversamente proporcional à temperatura de armazenamento.

Tabela 25 - Análise da interação Linhagens x Temperatura de armazenamento com relação à sobrevivência (UFC / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TEMPERATURA			MÉDIAS
	3 °C	7 °C	12 °C	
CHAMBOURCY	7,27 ^{Ab}	10,22 ^{Aa}	5,50 ^{Ac}	7,66 ^A
PAULISTA	6,10 ^{Ba}	4,12 ^{Bb}	2,05 ^{Bc}	4,09 ^B
MÉDIAS	6,68 ^a	7,17 ^a	3,77 ^b	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir do 15^o dia de armazenamento, o índice de sobrevivência foi maior a 7°C do que a 3°C, porém com diferença significativa apenas no 20^o dia de armazenamento (Tabela 26).

Tabela 26 - Análise da interação Temperatura x Tempo de armazenamento com relação à sobrevivência (UFC / 100 ml de amostra).

TEMP.	TEMPO (DIAS)						MÉDIAS
	0	5	10	15	20	25	
3°C	9,42 ^{Aa}	7,48 ^{Aab}	6,34 ^{Abcd}	7,08 ^{Abc}	4,87 ^{Bd}	4,91 ^{ABcd}	6,68 ^A
7°C	8,49 ^{Aa}	7,42 ^{Aab}	6,26 ^{Abc}	7,44 ^{Aab}	8,20 ^{Aab}	5,21 ^{Ac}	7,17 ^A
12°C	5,14 ^{Ba}	3,28 ^{Ba}	3,57 ^{Ba}	3,45 ^{Ba}	4,00 ^{Ba}	3,22 ^{Ba}	3,77 ^B
MED.	7,68 ^a	6,06 ^b	5,39 ^{bc}	5,99 ^b	5,69 ^{bc}	4,44 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os maiores índices de sobrevivência foram encontrados nos tratamentos III e IV, sem diferença significativa entre os tratamentos, mas com diferença significativa entre as linhagens (Tabela 27) discordando dos resultados obtidos por PUHAN *et al* (1974), que concluíram que a sobrevivência de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* é dependente do pH. SINHA *et al* (1989), afirmaram que estas linhagens

variam em sua sobrevivência de acordo com suas habilidades de manter um pH mais alto no iogurte durante o armazenamento.

Tabela 27 - Análise da interação Linhagens x Tratamentos com relação à sobrevivência (UFC / 100 ml de amostra).

LINHAGENS	TRATAMENTOS						MÉDIAS
	I	II	III	IV	V	VI	
CHAMBOURCY	5,51 ^{Ac}	8,35 ^{Aab}	9,84 ^{Aa}	9,09 ^{Aa}	7,29 ^{Abc}	5,89 ^{Ac}	7,66 ^A
PAULISTA	0,85 ^{Bc}	1,23 ^{Bc}	6,57 ^{Ba}	6,68 ^{Ba}	5,05 ^{Bab}	4,16 ^{Bb}	4,09 ^B
MÉDIAS	3,18 ^d	4,79 ^c	8,21 ^a	7,89 ^a	6,17 ^b	5,03 ^{bc}	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa na sobrevivência nos diferentes tempos para ambas linhagens, mas houve uma pequena diminuição da população bacteriana com o aumento do tempo de armazenamento, talvez como resultado do abaixamento do pH (Figuras 7 e 8: Gráficos de 19 a 21 e 22 a 24).

As maiores médias de sobrevivência foram encontradas para a linhagem Chambourcy, diferindo estatisticamente da linhagem Paulista. No tratamento I a média foi menor que nos outros cinco tratamentos e estatisticamente diferente. As médias dos tratamentos II e

VI são estatisticamente iguais. A média do tratamento VI é estatisticamente igual a média do tratamento V. As maiores médias foram as dos tratamentos III e IV, que se igualam estatisticamente (Tabela 27).

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 7 - Sobrevivência da(s) cultura(s) Chambourcy a 3, 7 e 12°C (UFC/100 ml de amostra).

- I- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento rápido
 II- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - Resfriamento lento
 III- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 IV- *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento
 V- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento rápido
 VI- *S.salivarius* subsp. *thermophilus* - Resfriamento lento

Figura 8 - Sobrevivência da(s) cultura(s) Paulista a 3, 7 e 12°C (UFC/100 ml de amostra).

O nível de sobrevivência maior nos tratamentos V e VI do que nos tratamentos I e II pode ser explicado pelo fato do pH ser menor nestes que naqueles tratamentos, concordando com afirmação feita por SINHA *et al* (1989).

Devido a grande variação nos resultados (Apêndices 19 a 24), principalmente pelo fato dos tratamentos III e IV apresentarem maiores níveis de sobrevivência com pH mais baixos, sugere-se que talvez o meio de cultivo utilizado não tenha sido efetivo concordando com alguns estudos feitos por MILLARD *et al* (1989), que mostram que há necessidade de se melhorar os meios diferenciais para contagem dos microrganismos do iogurte e HAMANN & MARTH (1984), que observaram que os meios diferenciais se tornam menos efetivos quando há preponderância de estreptococos ou lactobacilos.

5. CONCLUSÕES

A mistura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, resultou numa maior produção de ácido do que quando estas foram cultivadas separadamente, independentemente da origem, sendo que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, apresentou maior capacidade de produção de ácido.

O aumento de acidez foi diretamente proporcional à temperatura e tempo de armazenamento.

O resfriamento rápido provocou um retardamento no desenvolvimento da acidez (pós-acidificação) durante o armazenamento para os tratamentos onde *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi utilizado separadamente nas temperaturas 3 e 7 °C e onde foi utilizada a mistura na temperatura de 7 °C.

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* apresentou maior atividade proteolítica do que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* independentemente da origem (tipo Paulista ou Chambourcy).

O índice de proteólise, quando utilizada a mistura dos microrganismos, foi inferior àquele quando se empregou somente *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

A redução do pH foi mais acentuada nos dez primeiros dias de armazenamento para todos os tratamentos empregados.

A sobrevivência dos microrganismos, tanto em mistura como separados foi afetada significativamente pela redução do pH durante o armazenamento, porém não foi influenciada pelo tipo de resfriamento.

A sobrevivência dos microrganismos variou entre as linhagens, e foi inversamente proporcional à temperatura de armazenamento.

A mistura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* favoreceu a sobrevivência, apresentando maior número de sobreviventes durante o armazenamento.

As variações da atividade proteolítica, pH, acidez e sobrevivência não foram significativas para as três temperaturas durante os 25 dias de armazenamento.

A manutenção da temperatura de 3 °C no armazenamento das amostras poderá manter as características do produto por um período maior do que à temperaturas mais elevadas (7 e 12 °C), embora estas temperaturas não causem alterações drásticas no produto durante 25 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOLLAS, J.P.; BLOQUEL, R.; DIDIENNE, R.; REGNIER, J.
Proprietes acidifiantes des bactéries lactiques
thermophiles en relation avec la fabrication du
yoghourt. Le Lait, Paris, 57(561/562): 1-23, 1977.
- ACOLLAS, J.P.; VEAUX, M.; AUCLAIR, J. Etude des
interactions entre diverses bactéries lactiques
thermophiles et mésophiles, en relation avec la
fabrication des fromages à pâte cuite. Le Lait, Paris,
51(505/506): 249-72, 1971.
- ARAÚJO, W.M.C. Efeito do tratamento térmico do leite na
qualidade do iogurte. Piracicaba, 1984. 83p.
(Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz"/ESALQ).
- ARGYLE, P.J.; MATHISON, G.E.; CHANDAN, R.C. Production of
cell-bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and
its location in the bacterial cell. Journal Applied
Bacteriology, London, 41(1): 175-84, 1976.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 12.ed. Washington, 1975. 1094p.

AUCLAIR, J.E. & PORTMANN, A. Influence du chauffage du lait sur le developpement des bacteries. Effect stimulant du lait autoclave sur la croissance de *Lactobacillus lactis* (Role de l'Acide Formique), Revue Le Lait, Paris, 39(388): 496-519, 1959.

BAUTISTA, E.S.; DAHYA, R.S.; SPECK, M.L. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. Journal Dairy Research, London, 33: 299-307, 1966.

BRACQUART, P. An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt. Journal of Applied Bacteriology, London, 51(2): 303-5, 1981.

COTTENIE, J. Yogurt processing in Europe. Cultured Dairy Products Journal, Ames, 13(4): 6-10, 1978.

DAVIS, J.G. Laboratory control of yogurt. Dairy Industries, London, 35(3): 139-44, 1970.

- DAVIS, J.G.; ASHTON, T.R.; McCLASKILL, M. Enumeration and viability of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* in Yogurts. Dairy Industries, London, 36(10): 569-73, 1971.
- DÍAZ, M.C.P.; PADRÓN, G.A.; MARANTE, R.A. Evolution de los microorganismos de intereses higiénico-sanitario en yogurtes comerciales. Alimentaria, Madrid, 26(205): 51-5, 1989.
- DRIESSEN, F.M.; KINGMA, F.; STADHOUDERS, J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, Wageningen, 36(2): 135-44, 1982.
- DRIESSEN, F.M.; UBBELS, J.; STADHOUDERS, J. Yogurt .I. Optimal condiction and kinectics of the prefermentation process. Biotechnology and Bioengineering, New York, 19(6): 821-39, 1977.
- DUTTA, S.M.; KUILA, K.K.; ARORA, B.C. and RANGANATHAN, B. Effect of incubation temperature on acid and flavor production in milk by lactic acid bacteria. Journal of Milk and Food Technology, Orange, 35(4): 242-244, 1972.

- FELLER, E. CESCATTI, G.; SEPPI, A.; AVANCINI, A.; GIACOMELLI, F.; BOSSI, M.G. Lo yoghurt: Caratteristiche nutrizionali, microbiologiche, biochimiche. Revista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione, Trento, 18(4): 289-300, 1989.
- FERREIRA, C.L.L.F. & CHAVES, J.B.P. Caracterização do iogurte comercializado na zona da mata, Minas Gerais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 36(218): 27-32, 1981.
- FORMISANO, H.; PERCUOCO, G.; PERCUOCO, S. Microbiological studies of fermented milk products. Proteolytic activity of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt. Industrie Agrarie, Naples, 9(12): 430-5, 1971.
- GARCIA, S. & VALLE, J.L.E. do. Obtenção de fermentos lácticos termofilos para utilização em iogurte. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 23(1): 61-85, 1986.
- GLATTLI, H.E.; FLÜCKIGER, E.; WALSER, F. Beitrag zur frage der dauer lebensfähigkeit der kulturen in gelagerten, yoghurt. Food Science Technology Abstract, Buks, 6(5): 175, 1974.

GODED y MUR, A. Defeitos de sabor do iogurte. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 30(182): 25-6, 1975.

GRANDI, J.C. & ANDRADE, E.C.L. Effect of storage time and number of culture transfers on activity of a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 13(155): 40-3, 1988.

GREENE, V.O. & JEZESKI, J.J. Studies on starter metabolism. I. The relationship between starter activity and the pedrying heat history of reconstituted nonfat dry milk solids. Journal of Dairy Science, Lancaster, 40(9): 1046-53, 1957a.

GREENE, V.O. & JEZESKI, J.J. Studies on starter metabolism. II. Influence of heating milk on the subsequent response of starter cultures. Journal of Dairy Science, Lancaster, 40(9): 1053-62, 1957b.

GREENE, V.O. & JEZESKI, J.J. Studies on starter metabolism. III. Studies on cysteine-induced stimulation and inhibition of starter cultures in milk. Journal of Dairy Science, Lancaster, 40(9): 1062-71, 1957c.

HAMANN, O.T. & MARTH, E.H. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. Journal of Food Protection, Ames, 47(10): 781-6, 1984.

HEMME, D.H.; SCHMAL, V.; AUCLAIR, J.E. Effect of the addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. Journal of Dairy Research, London, 48(1): 139-48, 1981.

HIGASHIO, K.; YOSHIOKA, Y.R.; KIKUCHI, T. Symbiosis in yogurt culture. 1 Isolation and identification of a growth factor for *S. thermophilus* produced by *L. bulgaricus*. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, Tokyo, 51(4): 203-8, 1977a.

HIGASHIO, K.; YOSHIOKA, Y.R.; KIKUCHI, T. Symbiosis in yogurt culture. 2. Isolation and Identification of growth factor of *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, Tokyo, 51(4): 209-15, 1977b.

HULL, M.E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. Journal of Dairy Science, Lancaster, 30(11): 881-4, 1947.

HUMPHREYS, C.L. & PLUNKETT, M. Yogurt: A review of its manufacture. Dairy Science Abstrat, Shinfield, 31(11): 607-22, 1969.

JORDANO, R. MARTÍNEZ, P.; GARRIDO, M.D.; JODRAL, M. Changes of acidity and pH in commercial yogurt, Alimentaria, Madrid, 25 (189): 61-4, 1988.

KAPAC-PARKACĚVA, N.; BAUER, O.; CIZBANOSKI, T. Effects of different ratios of starter bacteria on amino acids, spectrum in yogurt made from cow's milk. Dairy Science Abstracts, Shinfield, 37(11): 1722, 1975.

KROGER, M. Quality of yogurt. Journal of Dairy Science, Lancaster, 59(2): 344-350, 1976.

LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II - Métodos físicos e químicos. Brasília, Ministério da Agricultura, 1981.

LAPROPOULOS, A.E.; COLLINS, O.F.; STONE, W.R. Starter culture effects on yogurt fermentation. Cultured Dairy Products Journal, Ames, 17(5): 15-7, 1982.

LEE, S.Y.; KOO, Y.J.; SHIN, D.H. Physicochemical and bacteriological properties of yogurt made by single or mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Dairy Science Abstracts, Shinfield, 52(2): 130, 1990.

LEE, S.Y.; VEDAMUTHU, E.R.; WASHAM, C.J.; REINBOLD, G.W. An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. Journal of Milk and Food Technology, Orange, 37(5): 272-276, 1974.

MARSHALL, V.M. Fermented milks and their future trends 1. Microbiological aspects. Journal of Dairy Research, London, 54(4): 559-74, 1987.

MARTINS, J.F.P. & LUCHESE, R.H. Determinação da compatibilidade do crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 43(256): 11-3, 1988.

MATALON, M.E. & SANDINE, W.E. *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and yogurt: A review. Cultured Dairy Products Journal, Ames, 21(11): 6-12, 1986.

- McDONALD, I.J. Utilization of sodium caseinate by some homofermentative lactobacilli. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 1(8): 653-8, 1955.
- MILLARD, G.E.; McKELLAR, R.C.; HOLLEY, R.A. Counting yogurt starters. Dairy Industries International, London, 54(7): 37, 1989.
- MILLER, I. & KLANDER, O. Proteolysis and liberation of the free amino acids by lactic acid bacteria in milk. Milchwissenschaft, Kiel, 22(11): 608-15, 1967.
- MOON, N.J. & REINBOLD, G.W. Associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Skim milk. Journal of Dairy Science, Lancaster, 57(5): 581, 1974.
- MOON, N.J.; REINBOLD, G.W.; HAMMOND, E.G. Acid production of mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* as an indicator of growth at 37, 21 and 14 °C. Journal of Dairy Science, Lancaster, 58(5): 787, 1975.
- MOON, N.J. & REINBOLD, G.W. Comensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Journal of Milk and Food Technology, Orange, 39(5): 337-41, 1976.

- MORAES, J.M. de & PASSOS, L.A.S. Isolamento de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* a partir de iogurte do mercado. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, 34(206): 15-17, 1979.
- OGAI, D.K.; MUSAEV, S.M.; MADRAKHIMOV, Y. Comparative study of the formation of free amino acids by local thermophilic lactic bacteria. Dairy Science Abstracts, Shienfield, 34(9): 698, 1972.
- OHMIYA, K & SATO, Y. Studies on the proteolytic action of dairy lactic acid bacteria Part IV. Changes of casein treated with *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* or *Streptococcus lactis*. Agricultural Biological Chemistry, Tokyo, 32(3): 291-6, 1968.
- OTTOGALLI, G.; GALLI, A.; FERRARI, A. Enumeration, differentiation and isolation of lactic acid, bacteria from yogurt. Dairy Science Abstracts, Shienfields, 34(6): 478, 1972.
- PETTE, J.W. & LOLKEMA, H. Yoghurt IV. Hit evenwicht der bacteriesoorten in yoghurt. Netherlands milk and Dairy Journal, Wagening, 5(1): 14-26, 1951.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de estatística experimental.

11.ed. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1985. 466p.

PLATT, D. Processing and merchandising of yogurt. Cultured of Dairy Products Journal, Ames, 4(3): 16-17, 1969.

PUHAN, Z. Developments in technology of fermented milk products. Cultured Dairy Products Journal, Ames, 25(2): 4-9, 1990.

PUHAN, Z.; FÜELER, O.; BANHEGHI, M. Microbiological status and content and configuration of lactic acid, in commercially produced yogurt in Switzerland. Dairy Science Abstracts, Shinfield, 36(7): 366, 1974.

RADKE-MITCHELL, L. & SANDINE, W.E. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: A review. Journal of Food Protection, Oregon, 47(3): 245-8, 1984.

RASIC, J.L. & KURMANN, J.A. Yogurt; Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Copenhagen, Technical Dairy Publishing House, 1978. 466p.

ROBINSON, R.K. & TAMIME, A.Y. Yogurt. A review of the product and its manufacture. Journal of the Society of Dairy Technology, London, 28(3): 149-63, 1975.

SALJI, J.P. & ISMAIL, A.A. Effect of initial acidity changes during refrigerated storage. Journal of Food Science, Champaign, 48(1): 258-9, 1983.

SALJI, J.P.; SAADI, S.B.; MASHHADI, A. Shelf life of plain liquid yogurt manufactured in Saudi Arabia. Journal of Food Protection, Ames, 50(2): 123-6, 1987.

SELLARS, R.L. Fermented Dairy Foods. Journal of Dairy Science, Champaign, 64(6): 1070-6, 1981.

SELLARS, R.L. & BABEL, F.J. Cultures for the manufacture of Dairy Products. Milwaukee, CHR. Hansen's Laboratory, Inc., 1970. 64p.

SHANKAR, P.A. & DAVIES, F.L. Associative bacterial growth in yogurt starters; initial observations on stimulatory factors. Journal of the Society of Dairy Technology, London, 30(1): 31-2, 1976.

SHANKAR, P.A. & DAVIES, F.L. Amino acid and peptide utilization by *S. thermophilus* in relation to yogurt manufacture. The Journal of Applied Bacteriology, London, 43(8): VIII, 1977.

SHARPE, M.E. Lactic acid bacteria in the dairy industry. Journal of the Society of Dairy Technology, London, 32(1): 9-18, 1979.

SHARPE, M.E.; GARVIE, E.I.; TILBURY, R.H. Some slime-forming heterofermentative species of genus *Lactobacillus*. Applied Microbiology, Baltimore, 23(2): 389-97, 1972.

SINGH, J.; RANGANATHAN, B.; CHANDER, H. Effect of incubation temperature on acid production and proteolytic activity in milk selected lactobacilli mutants. Folia Microbiologica, Praga, 25(6): 496-97, 1980.

SINGH, J. & SHARMA, D.R. Yogurt starters in skim milks 1. Acid and flavor production and proteolytic activity by yogurt starters. Cultured Dairy Products Journal, Ames, 17(1): 22-5, 1982.

SINHA, R.P.; MODLER, H.W.; EMMONS, D.B. Changes in acidity and starter bacteria in commercial yogurts during storage. Cultured Dairy Products Journal, Washington, 24(2): 12-4,16, 1989.

SLOCUM, S.A.; JASINSKI, E.M.; ANANTHESWARAN, R.C.; KILARA, A. Processing variables affecting proteolysis in yogurt during incubation. Journal of Dairy Science, Champaign, 71(3): 596-603, 1988a.

SLOCUM, S.A.; JASINSKI, E.M.; ANANTHESWARAN, R.C.; KILARA, A. Effect of sucrose on proteolysis in yogurt during incubation and storage. Journal of Dairy Science, Champaign, 71(3): 589-95, 1988b.

SLOCUM, S. & KILARA, A. Processing variables affecting the proteolytic activity of yogurt. Food Science Technology Abstracts, Bucks, 20(10), 1988.

SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v.2.

SPREER, E. Lactologia Industrial. Zaragoza, Editorial Acribia, 1975. 458p.

STOCKLIN, P. Production and handling of yogurt on a commercial scale. Cultured of Dairy Products Journal, Ames, 4(3): 6-10, 1969.

TAMIME, A.Y.; DAVIES, G.; HAMILTON, M.P. The quality of yogurt on retail sale in a Ayrshire. Part I. Chemical and microbiological evaluation. Dairy Industries International, London, 52(6): 19-21, 1987a.

TAMIME, A.Y.; DAVIES, G.; HAMILTON, M.P. The quality of yogurt on retail sale in Ayrshire. Part II. Organoleptic evaluation Dairy Industries International, London, 52(7): 40-41, 1987b.

TAMIME, A.Y. & DEETH, H.C. Yogurt. Technology and Biochemistry. Journal of Food Protection, Ames, 43(12): 939-77, 1980.

TAMIME, A.Y. & ROBINSON, R.R. Some aspects of the production of a concentrated yogurt (labneh) popular in the middle east. Milchwissenschaft, Hokenheim, 33(4): 209-12, 1978.

TAMIME, A.Y. & ROBINSON, R.R. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. Journal of Dairy Research, London, 55(2): 281-307, 1988.

TOBA, T.; WATANABE, A.; ADACHI, S. Quantitative changes in sugars especially oligosaccharides, during fermentation and storage of yogurt. Journal of Dairy Science, Lancaster, 66(1): 17-20, 1982.

WILLIAMSON, W.T. & SPECK, M.L. Proteolysis and curd tension in milk associated with accelerated starter culture growth. Journal of Dairy Science, Lancaster, 45(2): 164-9, 1962.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,5910	0,6162	0,6712	0,6996	0,6826	0,7226
II	0,7905	0,9576	0,9666	1,0304	1,1340	1,0675
III	0,6662	0,7103	0,7557	0,8295	0,8356	0,8686
IV	0,7073	0,7756	0,8291	0,8218	0,9238	0,8507
V	0,5635	0,6145	0,6513	0,6594	0,6904	0,6952
VI	0,5730	0,6251	0,6725	0,6921	0,6942	0,6942

Apêndice 2 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,9778	1,1107	1,2394	1,3504	1,2260	1,3796
II	1,0925	1,3313	1,3513	1,5071	1,4515	1,5555
III	0,9810	1,1815	1,2618	1,2995	1,2485	1,3102
IV	1,0550	1,1992	1,2969	1,3473	1,2823	1,4065
V	0,5621	0,7052	0,7647	0,8658	0,7956	0,8551
VI	0,5622	0,7520	0,8102	0,8687	0,7912	0,8846

Apêndice 3 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy, a temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,6251	0,8352	1,1129	1,1458	1,2323	1,2547
II	0,6816	0,8832	1,1542	1,2297	1,3407	1,3153
III	1,2145	1,3678	1,5529	1,7280	1,8112	1,8238
IV	1,2920	1,4799	1,8061	1,8831	1,9627	1,9317
V	0,5544	0,5869	0,7292	0,8246	0,8783	0,8389
VI	0,5807	0,6420	0,7543	0,9306	0,8689	0,8915

Apêndice 4 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,4092	0,4708	0,4757	0,4896	0,5811	0,5446
II	0,4201	0,4466	0,6541	0,6496	0,5750	0,6061
III	0,5327	1,1920	1,2338	1,1478	1,1894	1,1833
IV	1,0677	1,0897	1,3938	1,3364	0,9237	0,5046
V	0,4271	0,5561	0,5541	0,5844	0,6095	0,5888
VI	0,5016	0,5366	0,5567	0,5824	0,5467	0,5440

Apêndice 5 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista, à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,4273	0,5477	0,6634	0,7311	0,7914	0,9254
II	0,4411	0,6179	0,7221	0,7810	0,8637	0,9399
III	0,5803	0,7840	0,7726	0,9090	1,0199	1,0071
IV	0,8397	1,0671	1,1146	1,0791	1,1852	1,2593
V	0,5568	0,6021	0,6894	0,6967	0,6957	0,7213
VI	0,5538	0,6127	0,6488	0,7025	0,7087	0,7888

Apêndice 6 - Acidez titulável (g de ác.lático/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista à temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,4109	0,7286	0,9115	1,0113	1,0430	1,1359
II	0,3930	0,7264	0,9145	1,0003	1,0603	1,1604
III	0,4186	0,7044	0,8991	0,9214	1,0229	1,1317
IV	0,3993	0,7412	0,8613	0,8995	0,9958	1,1065
V	0,4526	0,7215	0,9260	0,8792	1,0498	1,1699
VI	0,4210	0,6772	0,9321	0,9048	1,0107	1,2050

Apêndice 7 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	20,26	24,60	27,23	28,18	30,61	28,45
II	18,78	23,84	23,64	24,60	20,34	24,29
III	15,00	14,13	13,73	15,08	16,12	18,94
IV	14,80	17,51	13,61	15,64	17,71	19,66
V	13,01	13,41	10,07	12,85	13,97	16,22
VI	14,68	15,96	11,62	12,25	14,29	14,05

Apêndice 8 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	28,49	27,47	31,64	28,32	31,04	32,15
II	32,15	28,07	28,59	28,32	29,34	30,58
III	23,14	23,22	25,09	23,73	29,68	28,54
IV	20,04	22,71	22,55	27,30	27,09	28,66
V	12,95	13,12	13,88	15,07	12,95	15,58
VI	12,44	13,80	13,37	14,90	13,63	14,82

Apêndice 9 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	17,32	25,78	26,03	23,86	20,43	22,12
II	21,86	26,37	27,39	25,13	21,44	25,69
III	19,49	25,69	27,22	23,14	20,17	19,32
IV	18,43	26,54	28,33	21,28	23,14	21,61
V	07,51	08,03	07,34	06,09	07,92	06,09
VI	06,37	07,85	07,77	06,64	07,32	06,22

Apêndice 10 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista, à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	15,14	18,34	21,88	21,18	21,81	21,43
II	16,96	16,67	24,43	25,49	23,82	23,24
III	13,43	13,57	20,74	19,32	15,32	15,34
IV	13,25	16,13	22,20	21,59	17,84	15,01
V	05,25	04,18	06,58	06,05	05,95	04,64
VI	04,68	03,43	06,58	06,46	05,20	05,97

Apêndice 11 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista, à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	16,41	19,48	20,65	24,66	31,14	31,36
II	16,08	20,44	21,76	29,22	29,86	32,55
III	15,74	17,63	20,55	25,66	27,13	29,99
IV	15,75	18,59	19,29	19,05	25,74	26,57
V	06,08	07,99	07,69	07,96	09,67	11,08
VI	05,37	07,88	07,26	06,38	08,90	08,82

Apêndice 12 - Atividade proteolítica (mg de tirosina/100 ml de amostra), desenvolvida pela linhagem Paulista, à temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	15,46	20,00	23,85	25,86	27,63	28,28
II	17,68	21,33	23,40	25,68	26,58	27,73
III	16,18	16,63	18,91	20,99	22,28	22,86
IV	15,60	18,46	19,32	20,92	23,06	23,34
V	10,35	13,59	16,49	16,38	18,40	18,02
VI	11,34	14,54	15,77	17,24	19,04	19,28

Apêndice 13 - pH desenvolvido pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	4,94	4,70	4,60	5,21	5,27	5,47
II	4,45	3,91	3,88	4,80	4,56	4,92
III	4,58	4,44	4,32	5,09	4,59	5,15
IV	4,46	4,13	4,13	5,02	4,48	5,12
V	4,74	4,52	4,67	5,13	4,82	5,06
VI	4,68	4,39	4,59	5,16	4,79	5,03

Apêndice 14 - pH desenvolvido pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	3,67	4,66	4,04	4,04	3,95	3,90
II	3,55	4,48	3,92	3,74	3,65	3,17
III	4,29	4,61	4,21	4,02	3,87	4,03
IV	3,88	4,39	4,14	4,01	3,87	3,89
V	5,13	5,48	4,80	4,57	4,38	4,37
VI	5,28	5,31	4,83	4,56	4,36	4,34

Apêndice 15 - pH desenvolvido pela linhagem Chambourcy, à temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	5,19	4,50	4,33	4,03	4,06	4,14
II	5,10	4,32	4,45	3,91	4,03	4,03
III	4,13	4,05	3,90	3,73	3,57	3,84
IV	4,09	4,13	4,08	3,76	3,49	3,70
V	5,55	5,18	4,80	4,52	4,62	4,64
VI	5,46	5,14	4,97	4,46	4,55	4,49

Apêndice 16 - pH desenvolvido pela linhagem do tipo Paulista, à temperatura de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	5,82	5,45	5,54	5,59	5,65	5,39
II	5,71	5,52	5,01	5,09	5,55	5,32
III	4,26	3,99	2,73	2,83	4,44	3,91
IV	4,02	4,15	3,74	3,38	4,24	4,40
V	5,45	5,25	5,17	5,18	5,56	4,90
VI	5,35	5,26	4,94	4,76	5,43	5,20

Apêndice 17 - pH desenvolvido pela linhagem do tipo Paulista, à temperatura de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	5,29	5,10	4,71	4,69	4,61	4,42
II	5,28	4,98	4,69	4,52	4,51	4,67
III	4,90	4,59	4,47	4,23	4,22	3,92
IV	4,50	4,19	4,01	3,97	3,98	3,85
V	5,05	5,17	4,91	4,84	4,81	4,73
VI	4,95	4,96	4,78	4,66	4,66	4,59

Apêndice 18 - pH desenvolvido pela linhagem do tipo Paulista, à temperatura de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	5,28	4,66	4,30	4,23	4,18	3,93
II	5,07	4,38	4,20	4,12	4,07	3,88
III	5,33	4,55	4,34	4,23	4,16	3,93
IV	5,30	4,42	4,24	4,23	4,17	3,93
V	5,30	4,63	4,42	4,16	4,15	3,82
VI	5,20	4,53	4,37	4,13	4,21	3,81

Apêndice 19 - Sobrevivência (UFC x 10^8 / ml de amostra), à 3°C , da linhagem do tipo Chambourcy à temperatura de armazenamento de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	5,13	2,07	3,83	2,33	1,08	1,97
II	11,10	12,33	10,67	7,20	4,17	3,40
III	13,33	7,43	8,17	7,47	4,80	7,10
IV	10,07	8,37	10,27	8,20	9,73	8,77
V	7,70	7,73	6,00	8,27	9,00	9,53
VI	4,23	8,00	5,27	12,00	9,00	5,90

Apêndice 20 - Sobrevivência (UFC x 10^8 / ml de amostra), da linhagem do tipo Chambourcy à temperatura de armazenamento de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	14,00	12,00	11,33	11,67	10,70	9,60
II	18,00	17,67	13,67	17,00	10,03	8,20
III	13,33	11,67	11,67	12,33	11,57	6,07
IV	13,00	3,63	1,23	10,33	8,77	5,30
V	9,00	9,23	8,87	9,37	21,13	5,27
VI	9,70	8,73	8,30	6,57	5,80	3,03

Apêndice 21 - Sobrevivência (UFC x 10^8 / ml de amostra), da linhagem do tipo Chambourcy à temperatura de armazenamento de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	3,03	2,03	2,53	1,63	1,67	2,50
II	4,83	2,70	2,67	2,10	2,33	2,30
III	18,33	8,07	12,00	6,13	11,17	6,57
IV	14,67	9,10	7,33	13,27	14,00	7,63
V	3,90	3,33	3,30	2,50	3,00	4,03
VI	4,17	2,47	3,27	2,63	3,07	3,83

Apêndice 22 - Sobrevivência (UFC x 10^8 / ml de amostra), da linhagem do tipo Paulista à temperatura de armazenamento de 3°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	1,77	1,01	0,23	1,20	0,24	0,28
II	1,73	1,34	0,97	1,60	1,12	1,23
III	22,00	19,33	13,03	13,23	13,33	10,57
IV	29,00	18,00	13,00	17,67	1,53	6,50
V	4,10	2,10	2,33	3,47	2,47	1,97
VI	2,87	2,03	2,27	2,37	2,00	1,67

Apêndice 23 - Sobrevivência ($\text{UFC} \times 10^8 / \text{ml}$ de amostra), da linhagem do tipo Paulista à temperatura de armazenamento de 7°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	0,88	0,70	0,59	0,71	0,79	0,76
II	1,00	1,37	1,16	1,23	1,24	1,43
III	2,77	2,70	1,87	2,37	2,13	1,77
IV	6,57	6,53	0,76	0,71	0,73	6,27
V	7,93	7,60	7,57	8,97	18,67	7,50
VI	5,70	7,23	8,07	7,97	6,80	7,33

Apêndice 24 - Sobrevivência ($\text{UFC} \times 10^8 / \text{ml}$ de amostra), da linhagem do tipo Paulista à temperatura de armazenamento de 12°C (média de 3 repetições).

Trat.	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	5	10	15	20	25
I	1,07	1,33	0,99	0,99	0,94	0,82
II	1,17	1,30	1,04	1,37	1,17	0,68
III	2,20	1,87	2,23	2,10	2,37	2,33
IV	1,77	2,10	2,27	2,33	2,23	2,27
V	2,93	2,37	2,33	2,87	2,97	2,73
VI	3,67	2,67	2,87	3,47	3,07	2,90