

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA ISOLADA DE  
QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ E DE  
SUAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS**

**JULIANE DÖERING GASPARIN CARVALHO**  
Farmacêutica – Mestre em Tecnologia de Alimentos

**ARNALDO YOSHITERU KUAYE**  
Orientador

**LAURA MARIA BRUNO**  
Co-orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do Título de  
Doutor em Tecnologia de Alimentos**

Campinas - SP  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C253c	<p>Carvalho, Juliane Döering Gasparin</p> <p>Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas / Juliane Döering Gasparin Carvalho – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye Co-orientador: Laura Maria Bruno Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. <i>Enterococcus faecium</i>. 2. <i>Streptococcus thermophilus</i>. 3. Lactobacilo. 4. Fermento láctico. 5. Queijo. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Bruno, Laura Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p> <p>(ckn/fea)</p>
-------	---

Titulo em inglês: Characterization of the latic microbiota isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Ceara and its technological properties

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, Starter culture, Cheese

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Walkíria Hanada Viotto

Izildinha Moreno

Maria Helena Castro Reis Passos

Renata Tiekko Nassu

Maria Fátima Borges

Data de defesa: 31/07/2007

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

**JULIANE DÖERING GASPARIN CARVALHO**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA ISOLADA DE QUEIJO DE  
COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ E DE SUAS  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS**

Tese apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do  
Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye, Presidente  
Universidade Estadual de Campinas

---

Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto  
Universidade Estadual de Campinas

---

Dra. Izildinha Moreno  
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL

---

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos  
Grupo de Vigilância Sanitária XVII, Campinas, SP

---

Dra. Renata Tiekou Nassu  
Embrapa Pecuária Sudeste

---

Dra. Maria Fátima Borges  
Embrapa Agroindústria Tropical



Cada homem deve pedir a Deus,

**Coragem e Energia** para mudar todas as coisas que podem ser mudadas,

**Serenidade** para aceitar o que não se pode modificar e

**Sabedoria** para distinguir umas das outras.

(Oração da serenidade)



**Dedico mais esta vitória**

**A toda minha família, especialmente,  
ao meu amado esposo Clodoaldo,  
aos meus diletos pais Luiz Daivo e Maria Helena  
e a minha querida irmã Heloíza.**





## **Agradecimentos**

A Deus por me conceder, além da vida, tantas realizações;

A minha família pelo amor, carinho e incentivo nas minhas escolhas;

Ao meu esposo Clodoaldo pelo amor, companheirismo, apoio e estímulo;

Ao prof. Dr. Arnaldo Y. Kuaye por toda orientação e confiança dedicadas a minha formação de pós-graduação;

À Dra. Laura Maria Bruno pela orientação, amizade e constante incentivo na realização deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto, Dra. Izildinha Moreno, Dra. Maria Helena Castro Reis, Dra. Renata Tieko Nassu e Dra. Maria de Fátima Borges pelas correções e sugestões na redação deste documento;

À Dra. Dirce Y. Kabuki pela amizade, disponibilidade e apoio prestado à distância;

À Msc. Ana Lourdes N. Gandara pelo apoio técnico e incentivo no início deste trabalho;

Às estagiárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Natália, Cristiane, Ana Amélia, Ana Paula, Ana Karine, Débora e Luise pela amizade e colaboração;

À Celina e Dieter pela grande amizade, apoio, acolhida em vossa casa e pelos momentos de descontração que marcaram nossa convivência;

Às colegas Maristela, Luciana e Alex-Sandra pelo apoio, amizade e convivência nos congressos em que participamos juntas;

A todos pesquisadores, funcionários, bolsistas e estagiários da Faculdade de Engenharia de Alimentos e da Embrapa pela convivência e dedicação durante todo este tempo;

À Embrapa Agroindústria Tropical pela acolhida e apoio técnico ao trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo suporte financeiro (Processo N° 140785/2004-2);

E a todos os demais não citados aqui, mas igualmente merecedores da minha eterna gratidão.



# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE SIGLAS	xxiii
RESUMO GERAL	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Objetivos	3
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
1. Queijo de Coalho	5
1.1. Aspectos da Produção de Queijo de Coalho no Ceará	7
1.2. Características Físico-Químicas do Queijo de Coalho	10
1.3. Características Microbiológicas do Queijo de Coalho	11
1.4. Características Sensoriais do Queijo de Coalho	13
2. Bactérias Ácido Láticas	15
2.1. <i>Lactococcus</i>	17
2.2. <i>Lactobacillus</i>	18
2.3. <i>Streptococcus</i>	19
2.4. <i>Leuconostoc</i>	21
2.5. <i>Enterococcus</i>	21
3. Fermento Lático e a Microbiota Lática de Queijos	24
4. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Ácido Láticas	26
4.1. Bacteriocinas com atividade contra <i>Listeria monocytogenes</i>	29

5. Referências Bibliográficas	31
-------------------------------	----

## **CAPÍTULO II**

<b>CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DA MICROBIOTA LÁTICA DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ</b>	43
--	----

Resumo	43
--------	----

1. Introdução	45
---------------	----

2. Material e Métodos	45
-----------------------	----

2.1. Seleção e Coleta de Amostras	44
-----------------------------------	----

2.2. Avaliação da Microbiota Lática	46
-------------------------------------	----

2.2.1. Preparação das amostras	46
--------------------------------	----

2.2.2. Isolamento e Contagem de bactérias ácido lácticas	47
--	----

2.2.3. Purificação e confirmação das bactérias ácido lácticas	47
---	----

2.2.4. Identificação das bactérias ácido lácticas	48
---	----

2.3. Análises Físico-Químicas	49
-------------------------------	----

2.3.1. Determinação de pH e acidez titulável	50
--	----

2.3.2. Determinação de atividade de água e de teor de umidade	50
---	----

2.3.3. Determinação de cloretos	50
---------------------------------	----

2.3.4. Análise estatística	51
----------------------------	----

3. Resultados e Discussão	51
---------------------------	----

3.1. Análises Físico-Químicas	52
-------------------------------	----

3.1.1. Atividade de água e de teor de umidade	53
---	----

3.1.2. pH e acidez titulável	55
------------------------------	----

3.1.3. Cloretos	56
-----------------	----

3.2. Avaliação da Microbiota Lática	57
-------------------------------------	----

3.2.1. População de bactérias ácido lácticas	57
--	----

3.2.2. Confirmação das bactérias ácido lácticas	59
---	----

Avaliação de produção de catalase	59
Verificação de morfologia dos microrganismos isolados	59
Avaliação de produção de ácido	61
3.2.3. Identificação das bactérias ácido lácticas	61
4. Conclusões	66
5. Referências Bibliográficas	67
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>EVOLUÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DURANTE O PROCESSAMENTO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL</b>	73
Resumo	73
1. Introdução	74
2. Material e Métodos	75
2.1. Coleta de Amostras	75
2.2. Avaliação da Microbiota Láctica	76
2.2.1. Preparação das amostras	76
2.2.2. Isolamento e contagem de bactérias ácido lácticas	76
2.2.3. Purificação e confirmação das bactérias ácido lácticas	77
2.2.4. Identificação das bactérias ácido lácticas	77
3. Resultados e Discussão	79
3.1. Processamento do queijo de Coalho artesanal	79
3.2. Avaliação da Microbiota Láctica	82
3.2.1. População de bactérias ácidos lácticas	83
3.2.2. Confirmação das bactérias ácido lácticas	84
<i>Avaliação de produção de catalase</i>	84
<i>Verificação de morfologia dos microrganismos isolados</i>	85
<i>Avaliação de produção de ácido</i>	86

3.2.3. Identificação das bactérias ácido lácticas	88
4. Conclusões	96
5. Referências Bibliográficas	97

## **CAPÍTULO IV**

<b>AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ</b>	103
Resumo	103
1. Introdução	104
2. Material e Métodos	106
2.1. Origem e critérios de seleção das culturas lácticas	106
2.2. Condições de manutenção e crescimento das culturas lácticas	106
2.3. Avaliação das propriedades tecnológicas	107
2.3.1. Avaliação da capacidade de acidificação	107
2.3.2. Avaliação da capacidade proteolítica	108
2.3.3. Avaliação da capacidade de formação de aroma e de tolerância ao NaCl	109
2.3.4. Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de enterococos	109
2.3.5. Avaliação de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas ativas contra <i>Listeria</i> spp.	110
<i>Culturas indicadoras e culturas testes</i>	110
<i>Avaliação de atividade antagonista</i>	111
<i>Avaliação da produção de bacteriocinas</i>	111
2.4. Pesquisa de <i>Listeria</i> sp.	112
2.5. Análise estatística	112
3. Resultados e Discussão	113

3.1. Avaliação das propriedades tecnológicas	113
3.1.1. Avaliação da capacidade de acidificação	113
3.1.2. Avaliação da capacidade proteolítica	117
3.1.3. Análise estatística para avaliação da capacidade de acidificação e proteolítica	120
3.1.4. Avaliação da capacidade de formação de aroma	122
3.1.5. Avaliação de tolerância da cultura ao NaCl	125
3.1.6. Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de <i>Enterococcus</i>	126
3.1.7. Avaliação de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas ativas contra <i>Listeria</i> spp.	128
4. Conclusões	131
5. Referências Bibliográficas	133
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	141
Conclusões Gerais	141
Sugestões para trabalhos futuros	142
<b>APÊNDICES</b>	
<b>APÊNDICE A</b>	
<b>RESULTADOS DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO E PROTEOLÍTICA</b>	145
<b>APÊNDICE B</b>	
<b>RESULTADOS DE TOLERÂNCIA AO NaCl, PRODUÇÃO DE AROMA E BACTERIOCINAS E DE IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS LÁTICAS</b>	150
<b>APÊNDICE C</b>	
<b>RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS E DE IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS LÁTICAS DO GÊNERO <i>Enterococcus</i></b>	153





# LISTA DE FIGURAS

## CAPITULO I

- Figura 1** Fluxograma geral de produção do queijo de Coalho no estado Ceará 9

## CAPITULO II

- Figura 1** Contagens de BAL isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal em meio M17, a diferentes temperaturas 57

- Figura 2** Contagens de BAL isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal em meio Rogosa, a diferentes temperaturas 58

## CAPITULO III

- Figura 1** Fluxograma de processamento do queijo de Coalho artesanal nas UP1 e UP2 80

- Figura 2** Contagens de BAL isoladas de amostras de leite, massa do queijo e de queijo de Coalho em diferentes meios e temperaturas 84

- Figura 3** Distribuição dos microrganismos na forma de cocos e de bastões isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho 86

- Figura 4** Distribuição de enterococos típicos e atípicos para as amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal 91

- Figura 5** Classificação dos lactobacilos segundo a temperatura de crescimento e produção de gás para as amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho 93

## CAPITULO IV

- Figura 1** Atividade proteolítica das culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, no período de 16 a 48h. 119

**Figura 2** Produção de aroma pelas culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* 124

**Figura 3** Tolerância das culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* a 3 e 4% de NaCl. 125

## **APÊNDICE A**

**Figura A1** Capacidade de acidificação de BAL isoladas de amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal, após 6 e 24h 145

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO I

<b>Tabela 1</b>	Atributos sensoriais que diferenciam as características dos queijos de coalho comercializados em Fortaleza, CE	5
<b>Tabela 2</b>	Características físico-químicas do queijo de Coalho produzido no estado do Ceará	10
<b>Tabela 3</b>	Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL	16
<b>Tabela 4</b>	Características que diferenciam as duas subespécies de <i>Lactococcus lactis</i>	17
<b>Tabela 5</b>	Presença de enterococos em queijos europeus	22
<b>Tabela 6</b>	Atividade de algumas bacteriocinas contra espécies de <i>Listeria</i>	31

### CAPITULO II

<b>Tabela 1</b>	Cepas de referência utilizadas na identificação das BAL	49
<b>Tabela 2</b>	Procedência e características das amostras de queijo de Coalho artesanal produzido no estado do Ceará utilizadas neste estudo	52
<b>Tabela 3</b>	Características físico-químicas das amostras de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará	53
<b>Tabela 4</b>	Produção de catalase pelos microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal	59
<b>Tabela 5</b>	Morfologia de microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal nos meios M17 e Rogosa	60
<b>Tabela 6</b>	Caracterização da capacidade de produção de ácido pelos microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal	61
<b>Tabela 7</b>	Distribuição dos gêneros de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal de acordo com a procedência das amostras	62
<b>Tabela 8</b>	Espécies de BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará	65

### CAPITULO III

<b>Tabela 1</b>	Cepas de referência utilizadas na identificação das BAL	79
<b>Tabela 2</b>	Temperaturas de cozimento do queijo de Coalho artesanal produzido em duas Unidades Produtoras de Jaguaribe	81
<b>Tabela 3</b>	Produção de catalase pelos microrganismos isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal	85
<b>Tabela 4</b>	Avaliação de produção de ácido pelos microrganismos isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho, através do tempo de coagulação do meio	87
<b>Tabela 5</b>	Diferenciação dos gêneros de BAL na forma de cocos	88
<b>Tabela 6</b>	Distribuição dos gêneros de BAL isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal	89
<b>Tabela 7</b>	Espécies de BAL isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal	94

### CAPITULO IV

<b>Tabela 1</b>	Cepas de referência utilizadas na avaliação de atividade acidificante	108
<b>Tabela 2</b>	Culturas lácticas que reduziram o pH do leite de 6,5 para 5,3 após 6h ou para 4,6 após 24h de incubação à temperatura de 30 ou 42°C	113
<b>Tabela 3</b>	Culturas lácticas que reduziram a acidez do leite de 0,2% para 0,5% após 6 h ou para 0,8% após 24h de incubação às temperaturas de 30 ou 42°C	116
<b>Tabela 4</b>	Seleção de culturas lácticas em relação a redução de pH ou características organolépticas indesejáveis à produção de queijo	117
<b>Tabela 5</b>	Valores médios para as análises realizadas para avaliação da capacidade de acidificação e proteolítica	121
<b>Tabela 6</b>	Produção de aroma pelas culturas lácticas dos gêneros <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i>	122
<b>Tabela 7</b>	Potencial patogênico das culturas do gênero <i>Enterococcus</i> .	127

<b>Tabela 8</b>	Atividade antagonista e produção de bacteriocinas por BAL contra <i>Listeria</i> spp.	129
-----------------	---	-----

## APÊNDICES

<b>Tabela A1</b>	Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de <i>Lactococcus</i>	146
<b>Tabela A2</b>	Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de <i>Lactobacillus</i>	147
<b>Tabela A3</b>	Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de <i>Streptococcus</i>	149
<b>Tabela B1</b>	Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de <i>Lactococcus</i>	150
<b>Tabela B2</b>	Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de <i>Lactobacillus</i>	151
<b>Tabela B3</b>	Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de <i>Streptococcus</i>	152
<b>Tabela C1</b>	Produção de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de <i>Enterococcus</i>	153



## Lista de Siglas

Aa	Atividade de água
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
LC	Leite Cru
LDR	Leite Desnatado Reconstituído
LP	Leite pasteurizado
MRS	Meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe
MQ	Massa do Queijo
NCDO	National Collection of Dairy Organisms
QC	Queijo de Coalho
QCA	Queijo de Coalho Artesanal
QCI	Queijo de Coalho Industrializado
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UP	Unidade Produtora





## RESUMO GERAL

O conhecimento da microbiota láctica dos queijos de Coalho produzidos de forma artesanal a partir de leite cru, e suas propriedades tecnológicas são fundamentais para preservar as características originais do produto tradicional em queijos de Coalho industrializados, elaborados com leite pasteurizado. Para alcançar este conhecimento, foi realizado um trabalho de pesquisa dividido em três etapas: I) caracterização físico-química de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará e de sua microbiota láctica; II) estudo do comportamento das bactérias ácido lácticas (BAL) durante o processamento do queijo; III) caracterização de propriedades tecnológicas das culturas lácticas isoladas a partir deles. As análises físico-químicas caracterizaram as amostras avaliadas como sendo queijo de médio conteúdo de umidade (42%), baixa acidez (0,24%), com pH de 6,30; elevada atividade de água (0,959) e teor de NaCl de 2,88%. Dentre as BAL (643) isoladas destas amostras, foram encontrados os gêneros *Enterococcus* (59,6%), *Lactobacillus* (22%), *Streptococcus* (12,8%), *Lactococcus* (1,7%) e *Leuconostoc* (0,6%). A identificação de gênero não foi conclusiva para 3,3% de isolados. As espécies prevalentes foram *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. O acompanhamento da evolução da microbiota láctica em amostras de leite cru, massa de queijo e do produto final, coletadas em duas unidades produtoras, revelou a presença de *Lactococcus* no leite e sua ausência no queijo. A presença de *Enterococcus* aumentou das amostras de matéria-prima para o queijo, indicando a transferência e multiplicação destes microrganismos ao longo do processamento. Estes resultados evidenciaram uma seleção de microrganismos resistentes às temperaturas elevadas no processamento do queijo, durante o cozimento da massa. Quanto às propriedades tecnológicas avaliadas, 15 isolados foram considerados produtores rápidos de ácido, com predominância dos *Lactococcus* e *Streptococcus* (40% cada). Os *Lactobacillus* exibiram maior variabilidade e extensão proteolítica, além de maior produção de aroma. As culturas analisadas mostraram boa tolerância a 3 e 4% de sal. As cepas de *Enterococcus faecium* apresentaram a maior produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp., com potencial de emprego na produção de queijo de Coalho, como cultura protetora.



## ABSTRACT

Understanding the lactic microbiota of the artisanal Coalho cheeses produced from raw milk, and its technological properties, is important to preserve the characteristics of the traditional product in the industrialized Coalho cheeses, elaborated with pasteurized milk. In order to achieve such knowledge, a research work was carried out in three stages: I) the physical-chemical characterization of the artisanal Coalho cheeses from Ceara-Brazil and its lactic microbiota, II) the study of the behaviour of the lactic acid bacteria (LAB) along the processing of cheese, III) characterization of technological properties of the lactic cultures isolated from the cheese. The physical-chemical analyses characterized the evaluated cheese samples with medium moisture content (42%), low acidity (0.24%), pH of 6.30, high water activity (0.959) and 2.88% NaCl content. Amongst the 643 LAB isolated from these samples, *Enterococcus* (59.6%), *Lactobacillus* (22%), *Lactococcus* (1.7%), *Leuconostoc* (0.6%) and *Streptococcus* (12.8%) genera were found. The identification was not conclusive for 3.3% of the isolates. The main species were *Lactococcus latis* subsp. *latis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium*. Following the evolution of lactic microbiota in raw milk, curd and cheese samples collected in two dairies, *Lactococcus* was found to be present in the milk, but absent in the cheese. The presence of *Enterococcus* increased from the raw material to the cheese samples, indicating the transference and multiplication of these microorganisms throughout the cheesemaking. Such results evidenced a selection of high temperature resistant microorganisms at the curd cooking stage of cheesemaking. According to the technological properties evaluated, 15 isolates were considered fast producers of acid, with predominance of the *Lactococcus* and *Streptococcus* (40% each). The *Lactobacillus* showed high variability and provided the widest range of proteolytic activity and production of flavour. The lactic cultures also showed good tolerance to 3 and 4 % of NaCl. Strains of *Enterococcus faecium* produced active bacteriocins against *Listeria* spp., with potential use in the production of Coalho cheese like protective culture.



# INTRODUÇÃO

Queijos são produtos lácteos fermentados elaborados a partir do leite de número limitado de mamíferos. Eles possuem grande diversidade de sabores, texturas e formas. A sua produção encontra-se distribuída por todo o mundo, seguindo princípios comuns a maioria das variedades.

No Brasil, são fabricados queijos de vários tipos, como o Minas Frescal, o queijo Prato e o queijo de Coalho, em grande parte do território nacional. O queijo de Coalho, em particular, é produzido tradicionalmente no Nordeste brasileiro, fazendo parte da culinária regional. Nos últimos anos, este produto começou a ser também produzido na região Sudeste, onde vem sendo cada vez mais apreciado como acompanhamento de churrascos e outras refeições.

Sua produção é expressiva para a economia rural do estado do Ceará, sendo fonte de renda e de trabalho para uma parcela considerável de pequenos e médios produtores (SEBRAE/CE, 1998). Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar em pequenos municípios localizados próximos às bacias leiteiras do estado.

A produção de queijo de Coalho artesanal é baseada em técnicas tradicionais, cuja matéria-prima utilizada é o leite cru. Atualmente, o queijo de Coalho vem sendo produzido em escala industrial, com emprego do processo de pasteurização do leite devido à exigência estabelecida pela legislação brasileira, com o intuito de garantir a segurança dos consumidores. Algumas indústrias também fazem a adição de fermento láctico comercial logo após o tratamento térmico do leite.

A pasteurização reduz grande parte da microbiota láctica natural do leite, responsável pelo desenvolvimento de características organolépticas próprias dos queijos, influenciando negativamente na qualidade do produto. O uso de fermento

lático comercial promove uma padronização cega no queijo de Coalho, sem recuperar a perda de características sensoriais ocasionada pelo efeito do tratamento térmico.

O desenvolvimento de um fermento láctico definido, elaborado a partir de bactérias ácido lácticas isoladas do próprio queijo se faz necessário para a obtenção de um produto seguro e de boa qualidade, sem promover mudanças fundamentais nas características do mesmo.

Na busca de um fermento láctico adequado para a produção do queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado, é importante conhecer a composição da microbiota láctica do queijo artesanal e as propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas a partir dele. Os queijos artesanais apresentam uma população microbiana típica e diferente, a qual está relacionada com a região de origem da matéria-prima e com a sua tecnologia de fabricação.

A identificação de BAL e a caracterização das propriedades tecnológicas de culturas isoladas de diversos tipos de queijos têm sido estudadas em todo mundo (ESTEPAR *et al.*, 1999; COGAN *et al.*, 1997; DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001). Em relação ao queijo de Coalho, há pouco conhecimento a cerca destes temas. Os trabalhos encontrados na literatura sobre a avaliação da microbiota láctica deste queijo (CARVALHO *et al.*, 2005) e de suas propriedades tecnológicas (CARVALHO *et al.*, 2006) são resultados preliminares originados durante esta pesquisa.

As informações levantadas, através deste trabalho de pesquisa, sobre a microbiota láctica natural de queijos tradicionais, a partir da avaliação de cepas selvagens de BAL, pretendem contribuir para a futura definição de um fermento láctico a ser empregado na produção do queijo de Coalho produzido com leite pasteurizado.

No contexto apresentado, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a

microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal e suas características tecnológicas, visando selecionar culturas lácticas para serem utilizadas na produção do queijo a partir de leite pasteurizado. Os objetivos específicos desenvolvidos foram:

- a) avaliar as características físico-químicas e a microbiota láctica presente em queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará;
- b) isolar e identificar a microbiota láctica presente em amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal produzido no Jaguaribe, a fim de acompanhar a evolução ocorrida com as BAL durante o processamento deste queijo;
- c) determinar as propriedades tecnológicas quanto à capacidade de acidificação, atividade proteolítica, produção de aroma, tolerância ao NaCl e produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp.





# CAPÍTULO I

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Queijo de Coalho

A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, define este produto como um queijo de consistência semi dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (SDA, 2001).

Como as características sensoriais do queijo de Coalho variam de acordo com o local em que ele é produzido, Nassu, Silva e Viotto (2004) definiram de forma consensual, através de *experts* da área de laticínios, os atributos que definem o queijo de Coalho consumido em Fortaleza, CE (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Atributos sensoriais que diferenciam as características dos queijos de coalho comercializados em Fortaleza, CE.

<b>Atributo</b>	<b>Queijos Característicos</b>	<b>Queijos Não Característicos</b>
Olhaduras	Poucas	Muitas ou nenhuma
Presença de casca	Sim	Não
Cor	Amarelo claro a escuro	Branco
Aroma	Levemente ácido	A leite, a manteiga, muito ácido
Sabor	Levemente ácido	Amargo, muito salgado, sem sabor
Textura	Firme, range nos dentes, borrachento	Quebradiço, muito mole

Fonte: Adaptado de Nassu, Silva e Viotto (2004).

Nesta mesma direção, Andrade e outros (2006) desenvolveram a terminologia descritiva de amostras comerciais de queijo de Coalho artesanal e industrializado, obtendo os seguintes termos, além dos citados acima: liberação de soro, para aparência; aroma de manteiga ou leite; sabor de manteiga e textura massenta<sup>1</sup>. Estes autores também concluem que mesmo entre os queijos de Coalho produzidos em uma mesma região existem variações entre as características sensoriais percebidas pelos consumidores.

O queijo de Coalho é obtido pela coagulação do leite, por ação do coalho ou de enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias ácido lácticas selecionadas (SDA, 2001). Ele é classificado como de médio (36,0-45,9%) a alto teor de umidade (46,0-54,9%), de massa semi-cozida ou cozida, semi-gordo (25,0-44,9%) ou gordo (45,0-59,9%) (MAARA, 1996).

A *Food Agriculture and Organization* - FAO (1990), em uma publicação sobre a tecnologia de produtos lácteos tradicionais produzidos em países em desenvolvimento, caracteriza o queijo de Coalho como um queijo semi duro, produzido nos estados do Nordeste do Brasil, principalmente no Ceará, Pernambuco, Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte, com leite cru. Este produto apresenta um sabor levemente salgado e acre, possui forma cilíndrica ou retangular, com peso entre 0,5 a 1,5kg, sendo consumido fresco ou curado.

O produto é bastante consumido pela população, em todas as faixas de renda, o que lhe confere significativa relevância econômica e social (SEBRAE/CE, 1998). Ao contrário de sua forma simples de produção, a utilização do queijo de Coalho é bastante variada, podendo ser consumido fresco, assado ou como ingrediente em diversos pratos regionais.

O queijo de Coalho no Ceará, por ser um produto muito difundido, pode ser encontrado facilmente para comercialização nas próprias unidades produtoras, em feiras, padarias, confeitarias, lojas de produtos típicos nordestinos, armazéns, mini

---

<sup>1</sup>dificuldade em lubrificar o alimento para deglutição, devido à adesão na boca.

e supermercados, bares, restaurantes, etc.

Nos últimos anos, o queijo de Coalho começou a ser produzido também na região Sudeste do Brasil, sempre a partir do leite pasteurizado, onde é muito consumido sob a forma de espeto para churrasco (PEREZ, 2005). No entanto, o queijo produzido no Nordeste apresenta características sensoriais distintas deste fabricado no Sudeste, provavelmente, por ser elaborado principalmente de leite cru.

### **1.1. Aspectos da Produção de Queijo de Coalho no Ceará**

As indústrias produtoras de queijos no Ceará, como em toda região Nordeste, estão divididas basicamente, em pequenas unidades artesanais e indústrias de médio porte. As primeiras atuam sem qualquer fiscalização, enquanto que as unidades de médio porte são regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura ou órgãos oficiais estaduais e municipais (NASSU *et al.*, 2001a).

A produção do queijo de Coalho é considerada tradicional no Ceará, estando concentrada em pequenos municípios da zona rural. De acordo com Fernandes e outros (1999) citados por Nassu e outros (2001a), a produção de queijos está situada em duas mesorregiões do estado do Ceará: o Vale do Jaguaribe (Limoeiro do Norte, Morada Nova, Jaguaribe, etc) e Sertões Cearenses (Tauá, Crateús, Quixadá, Quixeramobim, etc).

Um estudo realizado pelo SEBRAE/CE (1998) classificou a produção das queijarias do município de Tauá como baixa, uma vez que 70% delas produziam até 5kg/ dia. Já no município de Quixadá, 75% das queijarias foram classificadas como de média produção, por fabricarem até 15kg/ dia.

Jaguaribe é um município cearense, cuja atividade produtiva está baseada na produção de queijo de Coalho, cerca de 150kg/ dia (SEBRAE/CE, 1998). O

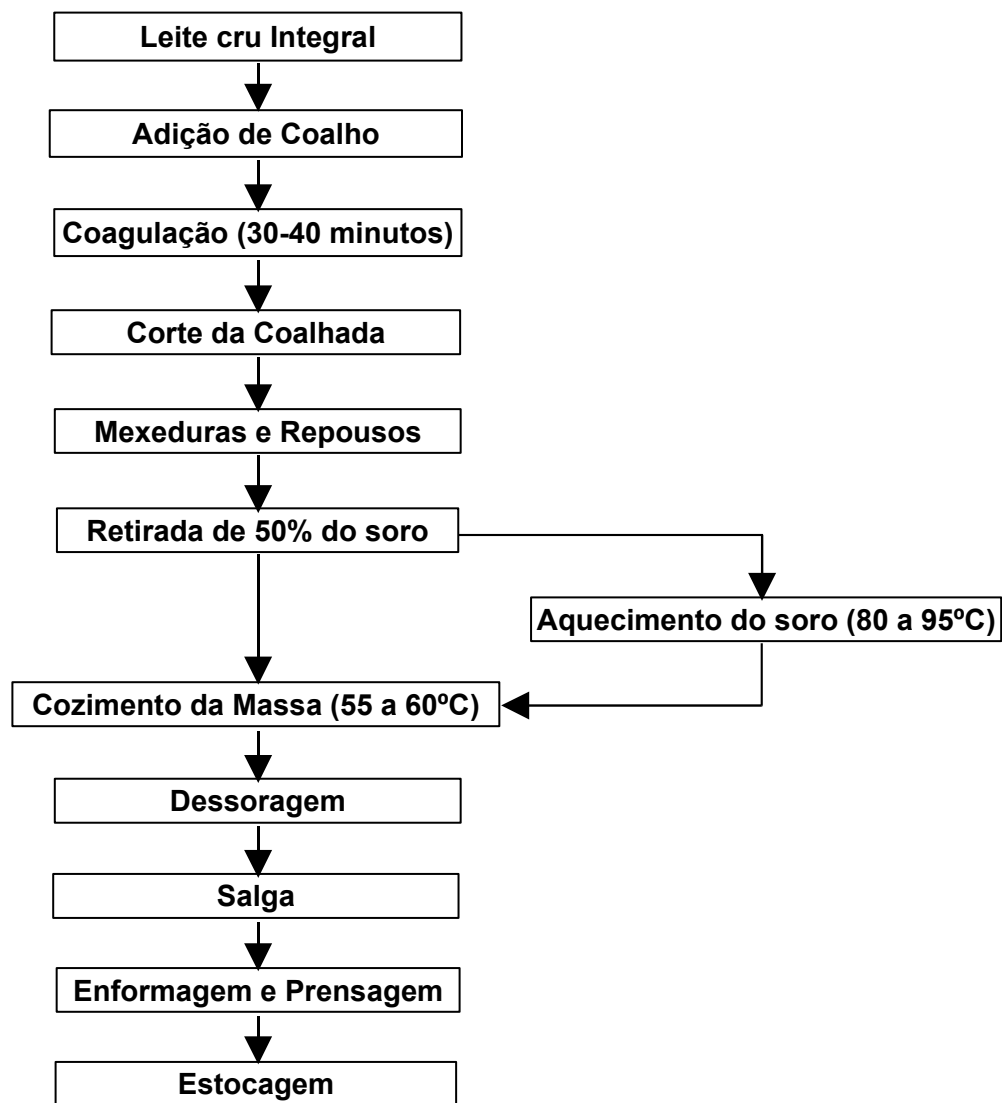
arranjo produtivo nesta região é composto em grande parte por várias micro e pequenas empresas, as quais fabricam seu produto isoladamente, utilizando processos artesanais com tecnologia bem simples, transmitida de geração a geração (AMARAL FILHO *et al.*, 2002).

Os produtores de queijo do Jaguaribe foram conquistando boa parcela do mercado do Ceará e consolidaram uma forte reputação do município, como o “grande produtor de queijo do Estado” (IPECE, 2004). Cerca de 80% dos produtores destinam sua produção à capital, Fortaleza (NASSU *et al.*, 2001a)

Das empresas formais e informais, uma parte produz regularmente e as demais estão sujeitas a sazonalidade da oferta de leite, cuja alta produtividade se verifica no período chuvoso (IPECE, 2004). A matéria-prima utilizada para a fabricação do queijo de Coalho no Jaguaribe é adquirida, em maior parte, de terceiros (NASSU *et al.*, 2001a); pequenos produtores do Jaguaribe ou municípios vizinhos, sendo complementada com o leite vindo do município de Morada Nova (AMARAL FILHO *et al.*, 2002).

A tecnologia de elaboração do queijo de Coalho artesanal provém de tradições arraigadas, sendo que algumas etapas a distinguem de outros queijos. Dentre elas, três podem contribuir efetivamente na definição das características do queijo: a utilização de leite cru, o cozimento da massa e a salga diretamente na massa. O fluxograma geral de produção do queijo de Coalho no estado do Ceará pode ser observado na **Figura 1**.

O cozimento da massa, um dos procedimentos mais importantes na produção do queijo de Coalho, é realizado pela remoção de parte do soro para ser aquecido, entre 85 a 100°C, sendo posteriormente reincorporado a mesma. Este procedimento também pode ser realizado com água quente ou vapor indireto até a obtenção de massa semi cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45° e 60°C). A temperatura de cozimento da massa varia muito de produtor para produtor (CARVALHO *et al.* 2005).



Fonte: Adaptado de Lima (1996)

**Figura 1** – Fluxograma geral de produção do queijo de Coalho no Ceará.

A salga deste queijo, geralmente é realizada pela adição de cloreto de sódio diretamente à massa. Esta prática tem o objetivo de evitar o estufamento precoce, que ocorre devido à produção de gás por coliformes, o qual é um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de queijo de Coalho do Ceará (Nassu *et al.* 2001a). A salga na massa também pode retardar o crescimento do fermento

lático, inibindo uma produção intensa de ácido (FOX *et al.*, 2000).

Uma técnica que ainda hoje é mantida em pequenas queijarias no Estado do Ceará, é o emprego de coalho natural do estômago de bezerro, salgado e seco. Este procedimento não é recomendado, em virtude do alto grau de contaminação microbiana que pode ocasionar. Na região do Jaguaribe, 50% dos produtores ainda fazem uso desta prática (SEBRAE/CE, 1998).

Em algumas unidades produtoras de queijo de Coalho artesanal, durante a elaboração do queijo, além de práticas de higiene inadequadas, são utilizados muitos equipamentos e utensílios de material que não atendem as normas para os padrões higiênico-sanitários (NASSU *et al.*, 2001a).

## 1.2. Características Físico-Químicas do Queijo de Coalho

Apesar do queijo de Coalho ser produzido há mais de um século, ainda hoje existe uma falta de padronização nas técnicas de elaboração do mesmo, o que acarreta em diferenças nas características físico-químicas do produto. A **Tabela 2** mostra resultados de análises físico-químicas realizadas por Nassu e outros (2001b) em 43 amostras de queijo de Coalho provenientes do Ceará.

**Tabela 2** – Características físico-químicas do queijo de Coalho produzido no estado do Ceará.

Análise	Mínimo	Máximo	Média
Umidade (%)	36,37	49,53	43,01
Gordura (%)	17,77	34,27	27,32
Gordura no extrato seco (%)	34,42	56,75	47,91
Proteína (%)	20,17	29,91	24,26
Cinzas (%)	3,45	5,96	4,41
pH	5,30	6,64	5,92
Acidez (%)	0,10	2,10	0,44
Cloretos (%)	0,72	3,29	1,91

Fonte: Adaptado de Nassu e outros (2001b).

Análises realizadas por outros pesquisadores (ARAÚJO; NASSU, 2002; FEITOSA, 1984) revelaram grande variação nos teores de umidade, proteína e gordura do queijo, indicando falta de padronização nas operações de elaboração do mesmo.

Do total de amostras avaliadas de queijo de Coalho por Nassu e outros (2001b), 81,4% foram classificadas como de médio conteúdo de umidade e 74,4%, como queijo gordo, quando comparadas com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo de Coalho. Em contrapartida, Sena e outros (2000) caracterizaram 81,6% das 70 amostras analisadas deste queijo como semi-gordo e Andrade Filho e Santos (1998) encontraram conteúdo de umidade variando de 56,55 a 88,50% em 15 amostras deste queijo.

A falta de uniformidade nas características físico-químicas do queijo de Coalho se deve também à ampla variação físico-química do leite utilizado na fabricação do mesmo (SENA *et al.*, 2000), o qual não sofre nenhum tipo de padronização. Sena e outros (2000) caracterizaram 81,6% das 70 amostras analisadas deste queijo como semi-gordo.

### **1.3. Características Microbiológicas do Queijo de Coalho**

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (MAARA, 1996). Apesar disso, somente as unidades produtoras sob inspeção é que promovem o tratamento térmico do leite. Em 85% dos casos, o leite usado na elaboração do queijo de Coalho não é pasteurizado (NASSU *et al.*, 2001b).

Além de ser fonte de bactérias ácido lácticas, o leite cru também é a principal fonte de microrganismos patogênicos nos queijos de Coalho artesanais. Contudo, a presença de patógenos em queijos fabricados com leite pasteurizado ocorre devido à contaminação pós-pasteurização (GRAPPIN; BEUVIER, 1997).

Benevides e outros (2001) detectaram maior contagem de estafilococos coagulase positiva nos queijos de coalho elaborados com leite cru do que nos produzidos com leite pasteurizado. Os autores observaram ainda que estes últimos queijos, quando armazenados sob refrigeração, foram os únicos que não apresentaram contagens destes microrganismos acima do limite estabelecido pela legislação brasileira.

Bruno e outros (2005) compararam a qualidade microbiológica de quatro amostras de queijo de Coalho artesanal (QCA), fabricados com leite cru, com a mesma quantidade do queijo industrializado (QCI), produzido com leite pasteurizado. Todas as amostras QCI e uma QCA apresentaram *Escherichia coli*, sendo que nesta mesma amostra QCA também foi detectada a presença de *Salmonella*. Em contrapartida, três amostras QCA e somente uma QCI apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva acima de  $10^7$  UFC/g.

Leite Junior e outros (2000) avaliaram a qualidade microbiológica do queijo de Coalho comercializado no estado da Paraíba, à temperatura ambiente e sob refrigeração. Das 31 amostras suspeitas para *S. aureus*, 9,7% apresentaram resultado positivo para coagulase. Florentino e Martins (1999) detectaram uma média de  $7,8 \times 10^5$  UFC/g de *S. aureus* e a presença de *Salmonella* em 30% de 40 amostras de queijo de Coalho, produzidas no estado da Paraíba.

Borges e outros (2005) analisaram o perfil de contaminação por *S. aureus* e ocorrência de enterotoxina estafilocócica na linha de produção de queijo de Coalho. A presença de *S. aureus* foi detectada em todas as amostras de leite cru (25/25) e em 12% (3/25) das amostras de queijo avaliadas. A presença de enterotoxina estafilocócica foi constatada em 20% (4/20) das amostras avaliadas.

A presença de *Listeria monocytogenes* foi também detectada no queijo de Coalho por Borges e outros (2003) em 2,3% (1/23) das amostras avaliadas. Branco e outros (2003) encontraram *L. monocytogenes* em 19% (16/84) de amostras industrializadas do mesmo queijo. Souza (2002) também verificou a



presença deste patógeno em 1,4% (10/70) de amostras de queijo de Coalho artesanal, comercializado na cidade de Fortaleza.

Feitosa e outros (2003) detectaram *Listeria* sp. em 9% das 11 amostras de queijo de Coalho provenientes do Rio Grande do Norte, contudo, a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada.

Borges (2006) avaliou dentre outros microrganismos, a presença de *Listeria monocytogenes* em uma indústria processadora de queijo de Coalho, no Ceará. De 100 amostras de produtos lácteos (leite cru, leite pasteurizado, coalhada e queijo) e de 165 amostras de ambiente (equipamentos, móveis, utensílios, pisos, drenos e paredes) foram obtidos 18 isolados característicos para *Listeria* sp. No entanto, destes, somente três foram confirmados como *L. monocytogenes* através do emprego de *kit API® Listeria*, contudo, não foram confirmados por meio da amplificação de fragmentos dos genes *hly* e *actA*, utilizando a técnica PCR. Este resultado indicou a ausência deste patógeno na linha de produção do queijo de Coalho analisada.

Segundo Andrade Filho e Santos (1998), o preparo do queijo de Coalho em condições higiênicas precárias e a sua conservação sem uso de refrigeração são responsáveis pela má qualidade microbiológica do produto, o que coloca a saúde do consumidor em risco.

#### **1.4. Características Sensoriais do Queijo de Coalho**

A pasteurização remove grande parte da microbiota láctica natural do leite, o que influencia negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). Por este motivo, a adição de fermento láctico comercial na elaboração de queijos, produzidos a partir de leite pasteurizado, tem ocasionado mudanças nas suas características sensoriais (ESTEPAR *et al.*, 1999). O uso de fermento láctico na produção de queijo de

Coalho com leite pasteurizado ocorre apenas nas indústrias de maior porte (NASSU *et al.*, 2001a; 2001b).

Benevides e outros (2000) compararam sensorialmente o queijo de Coalho produzido a partir de leite cru (LC) com o produzido a partir de leite pasteurizado (LP), adicionado de um fermento comercial, após 4, 30 e 60 dias de maturação. O sabor e a textura foram melhor avaliados para o queijo LC com 30 e 60 dias de cura. Já para os queijos LP, o parâmetro de maciez apresentou maior aceitação. Apesar de ambos apresentarem boa aceitação quando maturados por 60 dias, o queijo de Coalho LC foi preferido de forma geral. Também foi observada a preferência do queijo de Coalho LC após o 4º dia de fabricação.

Segundo Peláez e Requena (2005), as diferenças existentes entre a qualidade sensorial de queijos produzidos de leite cru e de leite pasteurizado dependem, principalmente, da diversidade e complexidade da microbiota presente no leite cru.

Nassu, Silva e Viotto (2004) também verificaram grande diversidade sensorial entre 20 amostras distintas de queijo de Coalho consumido em Fortaleza. Destas, sete amostras apresentaram atributos considerados característicos para o queijo da região, sendo três artesanais (leite cru) e quatro industrializadas (leite pasteurizado).

Cavalcante e outros (2004) elaboraram o queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado, inoculado com um *pool* de cepas de BAL isoladas de leite cru (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*). O produto apresentou boa aceitação pelos consumidores quando avaliado sensorialmente, o que demonstrou ser possível promover a sua padronização, melhorando a qualidade microbiológica do queijo.

A falta de uniformidade e garantia sanitária na produção de queijos artesanais, junto à necessidade de melhorar a qualidade organoléptica dos queijos

produzidos industrialmente, levou muitos pesquisadores a caracterizarem a microbiota láctica de queijos como 'Peñamellera' (ESTEPAR *et al.*, 1999), Valdeón (LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000), 'Sán Simon' (FONTÁN *et al.*, 2001) e Aspromonte (CARIDI *et al.*, 2003).

## **2. Bactérias Ácido Lácticas**

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza e predominam na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como leite, queijo, carne, frutas e vegetais (López-Díaz *et al.*, 2000).

Este grupo de bactérias possui as seguintes características comuns: são Gram positivas, não formadoras de esporos, não produtoras de catalase, oxidase e gelatinase, com morfologia de cocos ou bastões, não reduzem nitrato a nitrito, mas são capazes de utilizar o lactato. Crescem em condições anaeróbias, mas são tolerantes ao O<sub>2</sub>, sendo então chamadas de microaerófilas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; HASSAN; FRANK, 2001).

As BAL fermentam carboidratos e produzem ácido láctico, sendo os principais organismos responsáveis pela acidificação do queijo. Portanto, a primeira classificação atribuída a estes microrganismos foi baseada na forma do isômero de ácido láctico produzido. Se o ácido láctico produzido apresenta rotação óptica para direita, ele é denominado Dextrorrotatório (D) e se a rotação for para esquerda ele é denominado Levorotatório (L), sendo que se houver mistura dos dois (DL), é chamado de racêmico (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL podem também ser agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com os produtos de fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico a partir da glucose enquanto que as heterofermentativas produzem dióxido de carbono, ácido acético, etanol, etc, além de ácido láctico (CARR, CHILL; MAIDA, 2002).

Ainda, estes microrganismos podem ser divididos, de acordo com a temperatura de crescimento, em mesofílicos e termofílicos. Os mesofílicos crescem a uma temperatura ótima por volta de 30°C e os termofílicos crescem a uma temperatura ótima de 42°C (FOX *et al.*, 2000).

O grupo das BAL tem sido, nas últimas décadas, desmembrados para constituir novos gêneros, reagrupados e redenominados. De acordo com De Vuyst e Vandamme (1994), existem 12 gêneros de BAL considerados válidos: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidubacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*.

Destes gêneros, 5 são comumente encontrados em queijos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2000). A **Tabela 3** apresenta a classificação dos gêneros de BAL de acordo com sua morfologia, temperatura de crescimento e produto formado. A seguir serão descritas as características mais importantes que definem cada um dos gêneros que podem fazer parte da microbiota de queijos.

**Tabela 3** – Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.

Gêneros	Morfologia	T <sub>ótima</sub> de crescimento	Tipo de ác. láctico formado	Fermentação de açúcar
<i>Lactococcus</i>	Cocos/ cadeias	30°C	L(+)	Homo
<i>Streptococcus</i>	Cocos/ cadeias	42°C	L(+)	Homo
<i>Enterococcus</i>	Cocos/ cadeias	42°C	L(+)	Homo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos/ pares	30°C	D(-)	Hetero
<i>Lactobacillus</i>	Bastões/ pares	30 e 42°C	D(-), L(+) e DL	Homo e hetero

Fonte: Adaptado de Fox e outros (2000) e Carr, Chill e Maida (2002).

## 2.1. *Lactococcus*

Os lactococos são os microrganismos mesofílicos mais usados para a produção de ácido nas fermentações lácteas, pois são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Eles têm capacidade de crescer a 10°C, em pH ótimo de 6,0–6,5, mas não a 45°C. Em temperatura ambiente de 20-30°C, os lactococos levam de 10-20 h para fermentar o leite cru. O número aproximado de células viáveis necessárias para a coagulação do leite é de 10<sup>8</sup>/ ml (TEUBER, 1995). Klijn, Weerkamp e De Vos (1995) isolaram lactococos de diferentes fontes ambientais como solo e água de efluentes, indicando que estes microrganismos podem sobreviver fora do ambiente de laticínios.

Embora existam 5 espécies conhecidas, somente uma, o *Lactococcus lactis*, é significativa na fermentação dos produtos lácteos. Desta, as subespécies mais importantes são *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – esta subespécie confere melhor sabor ao queijo (FOX *et al.*, 2000). Por outro lado, a variante *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* é capaz de converter citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (HASSAN; FRANK, 2001). As subespécies referidas podem ser diferenciadas através das características apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4** – Características que diferenciam as duas subespécies de *Lactococcus lactis*.

Microrganismo	Metab. do citrato	Prod. de NH <sub>3</sub> da arginina	Cresc. em diferentes T(°C) e a [NaCl]				
			10	15	40	45	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	±	+	+	+	+	-	4%
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	±	-	+	+	-	-	2%

Fonte: Adaptado de Fox e outros (2000).

Os *Lactococcus* são geralmente predominantes em queijos frescos que não

sofrem cozimento da massa. Sua presença é reduzida durante o processo de cura, sendo que Fontán e outros (2001) e López-Díaz e outros (2000) verificaram seu desaparecimento em seis e oito semanas, respectivamente.

## **2.2. *Lactobacillus***

As bactérias deste gênero se apresentam na forma de bastões e são as mais tolerantes ao meio ácido (HAMMES; VOGEL, 1995). No leite, iniciam o crescimento, preferencialmente, em pH próximo de 5,5 – 6,2, reduzindo-o para valores abaixo de 4,0 (HASSAN; FRANK, 2001).

De acordo com Fox *et al.* (2000), os lactobacilos podem ser divididos em 3 grupos baseados no produto final de sua fermentação. O primeiro grupo é formado por lactobacilos termofílicos homofermentativos que utilizam apenas hexoses como fonte de carbono para produzir ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*).

No segundo grupo, estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos, que utilizam outras fontes de carbono além de hexoses (HASSAN; FRANK, 2001), sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub>, álcool e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este grupo inclui *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* que não são comumente encontrados no fermento láctico, mas estão associados à fermentação secundária, benéfica durante a cura do queijo (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Estes lactobacilos são chamados de NSLAB - *non starter acid lactic bacteria*, geralmente encontrados em fermentos lácticos artesanais (CROW; CURRY; HAYES, 2001; FOX *et al.*, 2000).

No terceiro grupo, estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono. Estes microrganismos podem produzir sabores indesejáveis e gás durante a cura do queijo (HASSAN; FRANK, 2001). Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis*

e o *Lactobacillus fermentum*, os quais também não são encontrados no fermento láctico (FOX *et al.*, 2000). Os lactobacilos heterofermentadores obrigatórios são detectados com menor frequência em queijos (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Os *Lactobacillus* foram classificados, originalmente, por Orla-Jensen, em 1919, o qual denominou o primeiro grupo de Thermobacteria, o segundo, de Streptobacteria e o último de Betabactéria (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; HAMMES; VOLGEL, 1995).

### **2.3. Streptococcus**

O gênero *Streptococcus* englobava todos os microrganismos que hoje fazem parte dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. O mesmo estava subdividido em quatro grupos diferentes, de acordo com suas características fisiológicas: lactis, enterococos, pyogenis e viridians ou oral. Os dois primeiros grupos se tornaram gêneros independentes e os dois últimos permanecem no gênero *Streptococcus* (HARDIE; WHILEY, 1995; HOLT *et al.*, 1994)

Muitas espécies deste gênero ainda estão sendo estudadas e reagrupadas de acordo com suas características taxonômicas, sendo que algumas delas são parasitárias do homem e outras são patogênicas. Por apresentarem características taxonômicas muito próximas, as espécies *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus thermophilus* foram, temporariamente, tratadas como uma única espécie: *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* e subsp. *thermophilus* (HARDIE; WHILEY, 1995).

*Streptococcus thermophilus* é a única espécie do gênero *Streptococcus* utilizada nas fermentações lácteas (HASSAN; FRANK, 2001). Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30

minutos (HARDIE; WHILEY, 1995).

Este microrganismo apresenta a habilidade de fermentar um pequeno número de carboidratos (HASSAN; FRANK, 2001), suporta uma concentração máxima de NaCl de 2,5% (FOX *et al.*, 2000) e possui atividade proteolítica limitada. O pH ótimo para o crescimento do *S. thermophilus* é de 6,5 (HASSAN; FRANK, 2001).

A maior parte dos produtos lácteos submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação é acidificada pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* spp. A elaboração de algumas variedades de queijos caracterizadas pela temperatura de cozimento elevada (50-55°C), como é o caso do queijo de Coalho, requer o uso de fermento termofílico que inclui estes microrganismos (MICHEL; MARTLEY, 2001).

Outra vantagem do uso combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* spp é que os lactobacilos termofílicos desempenham o importante papel de utilizar a galactose, a qual não é utilizada pelo *S. thermophilus*. Desta maneira, os lactobacilos termofílicos complementam a acidificação do queijo e reduzem o fenômeno de *browning* que ocorre quando este é aquecido (MICHEL; MARTLEY, 2001).

O *S. thermophilus* é um produtor rápido de ácido. Michel e Martley (2001) conseguiram reduzir, em 30 minutos, o tempo de acidificação do queijo Cheddar utilizando uma baixa quantidade de *S. thermophilus* (0,007%) junto com 1,7% de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Quando eles aumentaram a quantidade de inóculo de *S. thermophilus* para 0,17%, mantendo a mesma quantidade do outro microrganismo, o tempo de acidificação foi reduzido em aproximadamente 2h.



## 2.4. *Leuconostoc*

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são distinguidas das outras BAL por serem cocos heterofermentativos. Estas bactérias apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20-30°C. As duas espécies associadas aos produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* (FOX *et al.*, 2000).

Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como microrganismo aromatizante (HASSAN; FRANK, 2001). A produção de diacetil, CO<sub>2</sub> e acetoína a partir do citrato é responsável pela qualidade organoléptica, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (DELLAGLIO; DICKS; TORRIANI, 1995).

## 2.5. *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais frequentes em alimentos. São encontrados em grandes proporções no trato gastrointestinal de mamíferos e também no solo, superfície das águas e plantas. Os enterococos chegam aos alimentos através de contaminações intestinais ou ambientais e multiplicam-se durante a fermentação (GIRAFFA, 2003), ocorrendo em grandes números em produtos lácteos (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2001). Estes microrganismos sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremos (CARIDI *et al.*, 2003).

Os enterococos fazem parte das BAL do fermento láctico secundário. Eles são encontrados em muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa, a partir de leite cru e pasteurizado. Cogan e outros (1997) encontraram um número significativo de *Enterococcus* em queijos como Feta, Kasserli, Manchego, Majonero

e outros. López-Díaz e outros (2000) encontraram uma ampla variedade de espécies deste gênero no queijo Valdeón, sendo *E. faecalis* a espécie predominante. A **Tabela 5** apresenta uma lista de queijos europeus nos quais os enterococos foram estudados.

**Tabela 5** – Presença de enterococos em queijos europeus.

<b>Origem</b>	<b>Queijo</b>	<b>Tipo de leite</b>	<b>Referência</b>
Francês	Comté	Vaca	Bouton e outros (1998)
Francês	Roquefort	Vaca	Devoyod (1969)
Francês	Venaco	Cabra/ Ovelha	Casalta e Zennaro (1997)
Grega	Feta	Ovelha	Litopolou-Tzanetaki e outros (1993)
Grega	Kefalotyri	Ovelha	Litopolou-Tzanetaki e outros (1990)
Grega	Orinotyri	Ovelha	Prodromou e outros (2001)
Irlandês	Cheddar	Vaca	Gelsomino e outros (2001)
Italiano	Montasio	Vaca	Basso e outros (1994)
Italiano	Mozzarella	Vaca	Morea e outros (1999)
Italiano	Pecorino Pardo	Ovelha	Mannu e Paba (2002)
Italiano	Semicotto	Cabra	Suzzi e outros (2000)
Português	Serra da Estrela	Ovelha	Tavaria e Malcata (1998)
Espanhol	Armada	Cabra	Tornadijo e outros (1995)
Espanhol	Cebreiro	Vaca	Centeno e outros (1999)
Espanhol	Majonero	Cabra	Fontecha e outros (1990)
Espanhol	Manchego	Ovelha	Ramos e outros (1981)
Espanhol	Tetilla	Vaca	Menéndez e outros (2001)
Espanhol	San Simón	Vaca	García e outros (2001)

Fonte: Adaptada de Foulquié Moreno e outros (2006)

Nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano (FONTÁN *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2001).

A presença destes microrganismos em queijos produzidos com leite pasteurizado ocorre devido à sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10–45°C) e à sua resistência a altas temperaturas. Desta forma, os enterococos podem aumentar durante a refrigeração do leite e sobreviver à pasteurização. No entanto, a alta contaminação de enterococos em alguns queijos industrializados a partir de leite pasteurizado, geralmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a elaboração dos mesmos (GIRAFFA, 2003).

As espécies do gênero *Enterococcus* apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. Pesquisas realizadas por Durlu-Ozkaya e outros (2001) e Sarantinopoulos e outros (2001) mostraram que somente uma pequena parcela destas espécies promoveu a redução do pH do leite para 5,0–5,2, após 16–24h de incubação a 37°C. O *E. faecalis* tem maior poder de acidificação que o *E. faecium*. Suzzi e outros (2000) observaram que o *E. faecalis*, isolado de queijos artesanais italianos, reduziu o pH de leite desnatado a 4,5 após 24h de fermentação.

A influência positiva dos enterococos no queijo é devida ao desenvolvimento de características sensoriais, através de reações bioquímicas durante a cura: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Além disto, algumas espécies de *Enterococcus* podem produzir bacteriocinas, motivo pelo qual elas são aplicadas como fermento láctico primário. Contudo, o seu maior uso ainda é como fermento adjunto (GIRAFFA, 2003).

O *Advisory Committee on Novel Foods and Processors* – ACNFP permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento láctico em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003). No entanto, o uso de outras espécies de *Enterococcus* em queijos é questionado, pois há necessidade de mais estudos sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos deste uso (COGAN *et al.*, 1997).

### 3. Fermento Láctico e a Microbiota Láctica de Queijos

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros, espécies e cepas de BAL. Sua principal função é promover uma acidificação rápida durante o processo fermentativo e assim garantir a segurança do produto (BERESFORD; WILLIAMS, 2004, FERREIRA, 2006). A produção rápida de ácido pode ser influenciada pelo ecossistema do produto (CARVALHO *et al.*, 2006). No entanto, o uso do fermento láctico também tem a finalidade de alcançar as características sensoriais desejadas e os benefícios à saúde trazidos pelos probióticos (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Os fermentos lácticos tentam reproduzir a microbiota láctica de queijos e, portanto, são compostos de BAL iniciadoras ou culturas *starters* e microrganismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas. As BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante a elaboração do queijo e contribuem para o processo de cura. Já, os microrganismos secundários não contribuem na produção de ácido, mas geralmente estão envolvidos na definição das características sensoriais do queijo (BERESFORD *et al.*, 2001).

Os primeiros fermentos de composição conhecida começaram a ser distribuídos no início do século passado. Esta comercialização começou a partir da forma líquida, evoluindo à forma concentrada, para uso direto no tanque de fabricação. Os fermentos concentrados podem ser encontrados tanto na forma congelada como liofilizada (FERREIRA, 2006; TEUBER, 2000).

O fermento láctico pode ser classificado de acordo com a temperatura de crescimento, em mesofílico (26-30°C) e termofílico (42°C). Os fermentos mesofílicos incluem bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* e os fermentos termofílicos consistem de uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* spp. (HASSAN; FRANK, 2001). Contudo, esta distinção está perdendo parte do seu sentido a partir do momento que espécies mesofílicas e

termofílicas são encontradas juntas em fermentos mistos definidos para elaboração de queijos (PARENTE; COGAN, 2004).

O fermento mesofílico ainda pode ser agrupado em diferentes tipos, segundo a sua composição: “B ou L”, “BD ou LD”, “D” e “O”. As culturas do tipo “B ou L” contêm microrganismos produtores de ácido (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*) e uma espécie de *Leuconostoc* para produzir aroma e pouca quantidade de gás (FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001). Este fermento é utilizado na produção do queijo Cottage e em queijos duros, nos quais é desejável a produção de pequenas olhaduras (FERREIRA, 2001).

As culturas do tipo “BD ou LD” além de conter os microrganismos produtores de ácido que estão presentes no tipo “B”, contêm dois microrganismos produtores de aroma: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*. Assim, este fermento desenvolve maior quantidade de aroma e gás que o fermento do tipo “B” (FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001).

As culturas do tipo “D” contêm os mesmos produtores de ácido que estão presentes nos outros tipos de fermento e apenas o *L. diacetylactis* como produtor de aroma (HASSAN; FRANK, 2001). Por fim, o fermento láctico do tipo “O” só contém os microrganismos produtores de ácido, sendo muito usado na produção do queijo Minas Frescal ou nos queijos em que se deseja uma textura compacta e sem olhaduras (FERREIRA, 2001).

As informações sobre a microbiota natural de queijos artesanais podem contribuir para a definição de um fermento láctico que auxilie na padronização de um produto de qualidade e seguro, sem promover mudanças fundamentais nas características do mesmo (CARIDI *et al.*, 2003; DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001).

A sucessão da comunidade microbiana em queijos é influenciada pelas condições de cura e pela associação interativa entre os microrganismos. Esta

associação pode ser benéfica (cooperativa), neutra ou adversa (inibição) (PELÁEZ; REQUENA, 2005).

Caridi e outros (2003) verificaram que a população de BAL na forma de cocos, predominante no queijo italiano artesanal Aspromonte, reduziu no período final da cura (28 dias), enquanto aumentou o número de bactérias na forma de bastões. Isto ocorreu devido à capacidade dos lactobacilos de se desenvolverem em pH baixo.

Ao pesquisar a microbiota láctica natural do queijo espanhol Valdeón, López-Díaz e outros (2000) encontraram os seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. No acompanhamento dos diferentes estágios de elaboração deste queijo, foi possível notar que *Lactococcus* e *Enterococcus* dominavam no queijo fresco, e *Lactobacillus* e *Leuconostoc* se sobrepujavam durante a cura.

#### **4. Bacteriocinas Produzidas por Bactérias Ácido Lácticas**

As BAL produzem uma ampla variedade de compostos com atividade antimicrobiana, dentre eles as bacteriocinas. Segundo De Vuyst e Vandamme (1994), bacteriocinas são substâncias de natureza protéica, produzidas por muitas espécies de bactérias e que possuem atividade bactericida, particularmente contra espécies de bactérias intimamente relacionadas a elas.

Estas substâncias são promissoras para uso como conservantes biológicos, pois muitas delas apresentam estabilidade ao aquecimento, podendo ser utilizadas em combinação com o tratamento térmico. Elas também são biodegradáveis, destruídas por enzimas digestivas, seguras à saúde e ativas em baixa concentração (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

O espectro inibitório das bacteriocinas produzidas por BAL é restrito a

bactérias Gram positivas, pois sua ação ocorre por interferências na membrana citoplasmática dos microrganismos alvos. As bactérias Gram negativas são protegidas pela barreira lipopolissacarídica da membrana externa. Muitas bacteriocinas são ativas contra microrganismos deteriorantes e patogênicos encontrados em alimentos, incluindo *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre outros (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

De acordo com Hassan e Frank (2001) e Teuber (1995), as bacteriocinas produzidas por BAL podem ser divididas em três grupos bioquímicos:

- peptídeos que contêm lantionina (lantibióticos), como a nisina e a lacticina 481, sensíveis ao aquecimento em pH 9,4;
- proteínas pequenas que não contêm lantionina ou peptídeos, como as lactococinas A, B, G e M; e a diplococcina. Estas bacteriocinas são estáveis ao aquecimento;
- proteínas grandes termolábeis e ativas somente em valores baixos de pH, como a helveticina J e a caseicina 80.

A nisina é a bacteriocina mais extensivamente caracterizada. Ela possui *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*), sendo a única aprovada para uso como aditivo alimentar pelo FDA – *Food and Drug Administration* (MORENO *et al.*, 2000, O’SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002). Disponível comercialmente, ela pode ser utilizada em diferentes concentrações em queijos frescos e processados (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; TEUBER, 1995).

Várias cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* são produtoras de nisina (HASSAN; FRANK, 2001). No entanto, há uma grande variabilidade na produção natural desta bacteriocina, sendo que alguns isolados mostram uma fraca atividade inibitória (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

A subespécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pode produzir também outras

bacteriocinas. Moreno e outros (2000) detectaram a produção de bacteriocinas em 15 cepas de *Lactococcus lactis*. Somente uma destas cepas (ITAL383), entretanto, produziu uma bacteriocina com peso e espectro de atividade semelhantes ao da nisina.

A Lacticina 481, também produzida por *L. lactis* subsp. *lactis*, apresenta atividade contra alguns lactobacilos, leuconostocs e clostrídios (HASSAN; FRANK, 2001). Já a lacticina 3147, produzida pelo *L. lactis* subsp. *lactis* DPC 3147, isolado de grãos de kefir, inibe uma ampla faixa de bactérias Gram positivas, incluindo espécies de *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Esta cultura tem sido usada no controle de qualidade de queijos, com a finalidade de reduzir a população de BAL que não fazem parte do fermento láctico, durante o período de cura (ROSS *et al.*, 2000).

A produção de bacteriocinas pode se constituir em uma vantagem durante a competição bacteriana e permitir que as BAL predominem no leite cru. Rodríguez e outros (2000) confirmaram atividade inibitória de 24% de 1340 isolados de BAL de leite cru. Destas BAL produtoras de bacteriocinas, 67 foram identificadas como *Lactococcus*, 8 como *Enterococcus*, 5 como *Lactobacillus* e 2 como *Leuconostoc*. Através do uso da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia – PCR, foi verificado que 58% dos *Lactococcus* produziram nisina e 38% produziram lacticina 481.

Os lactobacilos usados no fermento láctico podem produzir diferentes bacteriocinas, mas com limitada faixa de atividade. O *Lactobacillus helveticus* produz a helveticina J e o *Lactobacillus plantarum*, que cresce bem em queijos, produz a pediocina AcH, bacteriocina ativa contra *L. monocytogenes* (HASSAN; FRANK, 2001).

Várias bacteriocinas produzidas por enterococos tem sido caracterizadas ao nível molecular e identificadas como pertencentes ao grupo dos lantibióticos ou da família da pediocina. Todas as enterocinas possuem estabilidade ao aquecimento,



a uma ampla faixa de pH e atividade contra *L. monocytogenes* (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002). No entanto, Moreno e outros (2003) observaram que o pH tem efeito sobre a produção de bacteriocinas pelos *Enterococcus*. Em pH 6,5, o *E. faecium* RZS C5 apresentou maior crescimento, porém a quantidade de enterocina produzida foi menor do que em pH 5,5.

Sarantinopoulos e outros (2002) verificaram que o *E. faecium* FAIR-E 198 produziu enterocina em meio MRS durante a fase exponencial de crescimento. Porém, a atividade da enterocina não foi constatada em leite desnatado acrescido de coalho, CaCl<sub>2</sub> e um fermento misto. O mesmo ocorreu com a inoculação deste microrganismo como fermento adjunto no queijo Feta, o que demonstra que a presença de coalho e de uma quantidade elevada de sal afetou o crescimento e produção de enterocina pelo *E. faecium* FAIR-E 198.

Em contraste, Moreno e outros (2003) observaram que o *E. faecium* RZS C5 e o DPC 1146 produziram enterocina durante todo o período de elaboração do queijo Cheddar. Isto indica que a contaminação do leite e do queijo pode ser controlada com uma produção estável de enterocinas. Assim, o uso de um fermento adjunto, aliado as boas práticas de fabricação, pode fornecer segurança microbiológica adicional à produção de queijos.

#### **4.1. Bacteriocinas com Atividade contra *Listeria monocytogenes***

O uso tradicional da nisina em queijos se dá pela prevenção do estufamento destes produtos através da formação tardia de gás pelos clostrídios (RODRÍGUEZ *et al.* 2000). Porém, *Listeria* sp. se apresenta como um problema sério de contaminação durante a elaboração e cura de queijos (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). Este fato contribuiu para o aumento de pesquisas de aplicação da nisina na inibição de *L. monocytogenes* em queijos como Camembert (MAISNIER-PATIN *et al.*, 1992), em queijos semi duros produzidos a partir de leite cru

(RODRÍGUES *et al.*, 2001) e de *L. innocua* em queijo Manchego (RODRÍGUEZ *et al.*, 1998).

A bacteriocina produzida pela cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL383 apresentou atividade inibitória contra todas as espécies de *Listeria* avaliadas, assim como a nisina produzida pela cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (MORENO *et al.*, 2000). Segundo Ross e outros (2000), a lacticina 3147 é efetiva em uma ampla faixa de pH, enquanto a nisina é ativa apenas em pH ácido. Estes resultados foram observados em um experimento onde se comparou a ação de um produtor de lacticina 3147 e outro produtor de nisina contra *L. monocytogenes* em superfície de queijo curado por fungos (pH entre 6,5 e 8,0).

Cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* são capazes de produzir bacteriocinas com atividade antilisteria quando crescem em leite e queijo (GIRAFFA, 2003). Segundo Moreno e outros (2003), as enterocinas são capazes de reduzir a contagem de *Listeria* de 2-9 ciclos logarítmicos, dependendo do produto e da enterocina testada. Os mesmos autores detectaram a produção de enterocinas por *E. faecium* RZS C5 e DPC 1146, com ação sobre a *Listeria*.

O *E. faecium* disponível para ser usado como fermento láctico pode produzir enterocina B, uma bacteriocina ativa contra mutantes de *L. monocytogenes* resistentes a nisina (HASSAN; FRANK, 2001).

Considerando que a legislação brasileira (ANVISA, 2001) estabelece a ausência de *L. monocytogenes* em 25g de queijo, o uso de um fermento láctico ou fermento adjunto, produtor de bacteriocina, durante a elaboração deste produto, apresenta grande importância com respeito à segurança microbiológica. Na **Tabela 6** estão apresentados alguns microrganismos produtores de bacteriocinas que possuem atividade contra *Listeria* spp.

**Tabela 6** – Atividade de algumas bacteriocinas contra espécies de *Listeria*.

<b>Microrganismo produtor</b>	<b>Bacteriocina</b>	<b>Inibição</b>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lacticina F	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lacticina M	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lacticina B	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina J	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina A	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericina Y 105	+
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Nisina	+
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Diplococcina	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Thermophilina 347	+
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Thermophilina A	-
<i>Propionibacterium thoenii</i>	Propionicina PLG-1	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina PA-1	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	+

Fonte: Adaptado de Hassan e Frank (2001).

A obtenção de bons resultados na inibição de *L. monocytogenes* e de outros patógenos com uso de bacteriocinas, necessita de um conhecimento detalhado da atividade destas substâncias contra cepas sensíveis a elas e sobre os fatores que podem limitar sua efetividade no alimento (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002).

## 5. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em 27 de agosto, 2001.

AMARAL FILHO, J.; AMORIM, M.; RABELO, D.; MOREIRAS, M. V. C.; ARAÚJO,

M. R.; ROCHA, G.; SCIPIÃO, C. **Núcleos e Arranjos Produtivos Locais: Casos do Ceará**. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará – IPECE. Texto apresentado no Seminário Internacional Políticas para Sistemas Produtivos Locais de MPME, realizado em Mangaratiba, RJ, março de 2002, p. 1-24. Disponível no site: [http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/artigos/ART\\_4.pdf](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/artigos/ART_4.pdf). Acesso em novembro/ 2006.

ANDRADE FILHO, J. B.; SANTOS, M. N. G. Avaliação microbiológica e físico-química de queijos artesanais tipo coalho comercializados no estado de Sergipe. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro: Comissão Organizadora do XVI CBCTA, 1998. p. 125-128.

ANDRADE, A. A. de; NASSU, R. T.; RODRIGUES, M. C. P.; SILVA, G. J. F. Da; FERNANDES, R. L. A.; SILVA, A. C. Desenvolvimento da terminologia descritiva de queijo de Coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 351, p. 314-317, Jul./Ago., 2006.

ARAÚJO, R. S.; NASSU, R. T. Caracterização físico-química de queijo de Manteiga, queijo de Coalho e Manteiga da Terra, produzidos nos estados do Rio Grande do Norte e do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 70-75, jun., 2002.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; RODRIGUES, M. C. P. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-206, jul./dez., 2000.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; FREITAS, A. N. M. Aspectos físicos-químicos e microbiológicos do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no Estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e**

**Processamento de Alimentos – B. CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 1, jan./jun., 139-153, 2001.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, jul., 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 287-317.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BORGES, M. F.; PEREIRA, J. L.; NASSU, R. T.; MIYA, N. T. N.; KUAYE, A. Y. Enterotoxina estafilocócica em queijo de Coalho industrializado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60. n. 345, p. 224-226, jul./ago, 2005.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de Coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 2006. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES; M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO; M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 209-430,

jul./dez., 2003.

BRUNO, L. M.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; CARVALHO, J. D. G. ANDRADE, A. A. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 131-149, Sep., 1999.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 201-209, Apr., 2003.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. New York, v. 28, n. 4, Dec., 2002

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ago., 2005.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Avaliação da capacidade de produção de ácido por bactérias ácido lácticas isoladas de leite e de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 61, n.351, p. 306-309, jul./ago., 2006.

CAVALCANTE, J. F. M.; SILVA, R. F. N.; ANDRADE, N. J. de; FURTADO, M. M.; CECON, P. R. Queijo coalho produzido com "pool" de culturas lácticas isoladas de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de**

**Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 211-214, Jul./Ago., 2004.

CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjunct in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7 , p. 275-283, Jul. , 2001.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Microbiology, Genetics and Application. London: Chapman & Hall, p. 1-12, 1994.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI. E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

FEITOSA, T. **Estudos tecnológicos, físico-químicos, microbiológicos, e sensoriais do queijo de Coalho do estado do Ceará**. Fortaleza, 1984. 96 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, dez., 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 112 p: Cadernos didáticos; 43.

FERREIRA, C. L. L. F. Bactérias do ácido láctico como fermentos funcionais. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, ano XV, n. 90, mar./abr., 2006.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de Coalho” produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 25-33, Feb. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Animal Production and Health – The thecnology of traditional milk products in developing countries**, Roma, 1990, v. 85. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t0251e/T0251E13.htm>. Acesso em novembro/2006.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, jan., 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 5. p. 54-97.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the



manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, Dec, 1997.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003. Review.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (eds). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The genus *Streptococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HOLT, J. G.; GRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. Cap. 17.

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ – IPECE. **Identificação de arranjos produtivos locais no Ceará**. Governo do Estado do Ceará. Disponível em [http://www.ipece.ce.gov.br/estudos\\_setoriais/ArranjosProdutivos](http://www.ipece.ce.gov.br/estudos_setoriais/ArranjosProdutivos). Acesso: maio de 2004.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; de VOS, W. M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 788-792, 1995.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D. de; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de Coalho” comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande

(PB). **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n. 73, p. 53-59, jun., 2000.

LIMA, M. H. P. **Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus***. 1996. 82 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.

MAISNIER-PATIN, S.; DESCHAMPS, N.; TATINI, S. R.; RICHARD, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* em Camembert cheese made with a nisina-producing starter. **Lait**, Paris, v. 72, n. 3, p. 249-263, 1992.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in Ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, Apr., 2001.

MICHEL, V.; MARTLEY, F. G. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese – production and fate of galactose. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 317-325, May, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA (MAARA). Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Characterization of bacteriocinas produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n. 3, p. 183-191, jul./ set., 2000.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAN, T. M.; DE VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese

manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 1., p. 73-84, Feb., 2003.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A. LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e Manteiga da Terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 89, p. 28-36, out., 2001a.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1**. Embrapa, Fortaleza, CE, p. 1-28, dez., 2001b. Disponível em: . <<http://www.cnpat.embrapa.br>>. Acesso em: 20/03/2004.

NASSU, R. T.; SILVA, M. A. A. P. da ; VIOTTO, W. H. Variações sensoriais em queijo de Coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, Recife. **Anais**. Recife: SBCTA, 2004. 2. CD-ROM.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, May.-Jun., 2002. Review.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. Starter Cultures: General Aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 23-147.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. jun./set., 2005. The fourth IDF Symposium on cheese: ripening characterization and technology.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de Coalho comercializado no município de Campinas, SP**. 2005. 122 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; NUÑES, M.; MEDINA, M. Inhibitory activity of a nisina-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 129-132, Jan., 1998.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLES, B.; GAYA, P.; NUÑES, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1-2, p. 7-15, Jan., 2000.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NUÑES, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 1, p. 131-137, fev., 2001. Short communications.

ROSS, R. P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F. COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n., p. 96-104, 2000.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, n. 1-2, p. 125-136, Jan., 2002.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, queijo de Coalho e queijo Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2001. Seção 1, p.13.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORREA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de Coalho comercializado em Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 41-44, jul., 2000.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de Coalho produzido no Ceará**. Serviço de apoio às micro e pequenas empresas do Estado do Ceará. Fortaleza, 1998.

SOUZA, R. A. **Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza-CE**. Fortaleza, 2002. 78 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-274, Aug., 2000.

TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

TEUBER, M. Fermented milk products. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. **The microbiological safety and quality of Food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. p. 535-589, 2000. v. 1.



## CAPÍTULO II

### CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA E FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ

#### Resumo

O presente trabalho trata da avaliação das características físico-químicas e da microbiota láctica de 12 amostras de queijo de Coalho artesanal, procedentes de duas regiões produtoras tradicionais no estado do Ceará: Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses. As análises físico-químicas envolveram a determinação de pH, acidez titulável, atividade de água, umidade e cloretos. A microbiota láctica foi avaliada através da contagem e isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL), em meios M17 e Rogosa, ambos incubados em temperaturas de 30 e 42°C; purificação e confirmação das BAL, com posterior identificação dos gêneros e espécies presentes no queijo. Os resultados caracterizaram o queijo de Coalho como de médio conteúdo de umidade (42%), baixa acidez (0,24%), com pH de 6,30; elevada atividade de água (0,959) e teor de NaCl de 2,88%. De um total de 811 isolados, 643 foram confirmados como BAL e submetidos à identificação. Os gêneros encontrados foram *Enterococcus* (59,6%), *Lactobacillus* (22%), *Lactococcus* (1,7%), *Leuconostoc* (0,6%) e *Streptococcus* (12,8%). Uma percentagem de 3,3% de isolados não foram identificados. *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* foram as espécies prevalecentes. A predominância de *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* termofílicos sugere que, durante o processamento do queijo de Coalho ocorreu uma seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, decorrente do cozimento da massa. A grande presença de *Enterococcus* pode indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção deste queijo.

## 1. Introdução

O queijo de Coalho é um dos produtos lácteos de maior tradição do Nordeste brasileiro. No Ceará, este queijo apresenta relevância econômica e social, sendo bastante consumido pela população, em todas as faixas de renda, e usado em muitos pratos da culinária regional.

A produção de queijo de Coalho no estado está concentrada em pequenos municípios da zona rural, situados, principalmente, no Vale do Jaguaribe e nos Sertões Cearenses. Na primeira região está localizado o município de Jaguaribe e na última estão inseridos os municípios de Tauá e Quixadá (NASSU *et al.*, 2001).

O processo de elaboração do queijo de Coalho artesanal utiliza o leite cru como matéria-prima e emprega técnicas tradicionais, transmitidas de geração em geração. Em consequência disto, ocorrem variações entre as diferentes regiões produtoras e de produtor para produtor, levando a uma falta de padronização no queijo obtido. Além disso, a procedência e a qualidade da matéria-prima utilizada na produção deste queijo também são fatores que influenciam no produto final.

Uma etapa considerada importante no processamento do queijo de Coalho é o cozimento sucessivo da massa, que consiste na remoção de parte do soro para ser aquecido entre 85 a 100°C. Após o aquecimento, o soro removido é reincorporado à massa que será semi cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45° e 60°C). A temperatura e o número de cozimentos aplicados à massa conferem diferentes características ao queijo (CARVALHO *et al.* 2005).

Além dos aspectos tecnológicos, vale ressaltar que as bactérias ácido lácticas (BAL) também desempenham um papel de suma importância no desenvolvimento de características individuais para cada tipo de queijo (BERESFORD *et al.*, 2001).

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente



(MAARA, 1996). Além disso, o Regulamento de Identidade e Qualidade de queijo de Coalho determina que a matéria-prima utilizada neste produto deve ser pasteurizada. A pasteurização promove a redução de grande parte da microbiota láctica natural do leite, o que influencia negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN; BEUVIER, 1997).

Por este motivo, a adição de fermento láctico comercial na elaboração de queijos, produzidos a partir de leite pasteurizado, tem ocasionado mudanças nas suas características organolépticas (ESTEPAR *et al.*, 1999). Muitas variedades de queijos perderam sua identidade no momento em que passaram a ser produzidos em escala industrial (PELÁEZ; REQUENA, 2005).

Neste contexto, as informações levantadas sobre a microbiota láctica natural de queijos tradicionais, a partir da avaliação de cepas selvagens de BAL, podem contribuir para a definição de um fermento láctico que auxilie na padronização de um produto seguro e de boa qualidade, sem promover mudanças fundamentais nas características do mesmo (CARIDI *et al.*, 2003; DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar as características físico-químicas e a microbiota láctica presente em queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre a população láctica natural deste queijo.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Seleção e Coleta de Amostras**

Com o intuito de levantar informações sobre os queijos disponíveis ao consumidor, uma pesquisa inicial foi realizada junto aos estabelecimentos comerciais onde o queijo de Coalho é comercializado na cidade de Fortaleza – CE. Dados como regularidade de oferta, tradição de venda, procedência e

identificação do produtor foram coletados e usados como base para a escolha das amostras. Após o levantamento dessas informações, 12 amostras de queijo de Coalho artesanal, produzido no Ceará, foram selecionadas para serem submetidas às análises de caracterização físico-química e de avaliação da microbiota láctica.

Em relação à procedência, foram coletadas amostras das duas regiões que apresentam maior produção de queijo no estado: o Vale do Jaguaribe e a os Sertões Cearenses – Quixadá e Tauá. Foi também constatado que algumas amostras não continham embalagem e rótulo e nenhuma delas apresentava selo de inspeção federal ou estadual.

As amostras selecionadas foram coletadas nos estabelecimentos comerciais, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram analisadas.

## **2.2. Avaliação da Microbiota Láctica**

### **2.2.1. Preparação das amostras**

As amostras de queijo de Coalho foram divididas em oito porções, sendo quatro delas retiradas, alternadamente, para posterior realização das análises físico-químicas. As quatro porções restantes de cada queijo foram subdivididas aleatoriamente, a fim de se obter uma alíquota de 25g, mensurada em balança semi analítica (Marte, AS1000C). As amostras foram homogeneizadas em um homogeneizador tipo *Stomacher* (Seward, 400) com 225ml de solução de citrato de sódio 2% (Vetec) aquecida a 45°C e, na sequência, foram realizadas diluições decimais em série, em solução peptonada a 0,1% (Merck) (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992; HARRIGAN, 1998).

### 2.2.2. Isolamento e Contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem e o isolamento das BAL foram efetuados após a inoculação de 1ml das diluições das amostras, em profundidade, com sobrecamada (HALL; LEDENBACH; FLOWERS, 2001), nos meios M17 ágar (Oxoid) e Rogosa ágar (Difco). O meio M17 foi utilizado para o isolamento de microrganismos na forma de cocos (CARIDI *et al.*, 2003), sendo as placas incubadas a 30 ou 42°C, por 48h. O uso de duas diferentes temperaturas de incubação teve a finalidade de selecionar bactérias mesofílicas e termofílicas.

O ágar Rogosa foi acidificado com ácido acético glacial para atingir o pH de 5,4, com a finalidade de isolar lactobacilos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004). As placas de ágar Rogosa foram incubadas por 5 dias, nas mesmas temperaturas usadas para as placas de M17. Posteriormente, uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias – UFC foi realizada. Foram escolhidas placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias; das quais 15–20 colônias foram coletadas aleatoriamente.

### 2.2.3. Purificação e confirmação das bactérias ácido lácticas

A purificação foi realizada pelo estriamento das colônias selecionadas, anteriormente, em meio Man, Rogosa e Sharpe – MRS ágar (Acumedia), seguida de incubação por 48h nas temperaturas de 30 ou 42°C, conforme temperatura usada na etapa de isolamento. Após a purificação, os isolados foram mantidos em MRS caldo (Acumedia), através de frequentes repicagens e submetidos aos testes de confirmação: coloração de Gram, para verificação da morfologia das células, reação de atividade da catalase e produção de ácido.

Para avaliação de produção de ácido, uma alíquota de 1% de cada isolado (previamente ativado em caldo) foi inoculada no meio leite tornassolado - *Litmus Milk* (BBL) e incubada a 35°C por 7 dias. A produção de ácido foi verificada pela

coagulação e redução do meio durante este período. Os microrganismos produtores de ácido, Gram positivos, catalase negativa, na forma de cocos ou bastões foram considerados bactérias ácido lácticas (HALL; LEDENBACH; FLOWERS, 2001).

#### 2.2.4. Identificação das bactérias ácido lácticas

A diferenciação de gênero para as BAL, com a morfologia de cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) foi efetuada com base nos testes de crescimento dos isolados nas seguintes condições: temperaturas de 10 e 45°C, pH de 4,4, e 9,6; teor de NaCl 6,5% e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose (HARRIGAN, 1998).

As BAL em forma de bastões (*Lactobacillus*) foram submetidas aos testes de crescimento nas temperaturas de 15 e 45°C, incubados por 5 e 2 dias, respectivamente, e de produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose (COGAN *et al.*, 1997).

O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado em Leite Desnatado Reconstituído – LDR a 10%. Os testes de crescimento em diferentes pH's e na presença de 6,5% de NaCl foram conduzidos no caldo APT (Himedia). Para o teste de produção de CO<sub>2</sub> foram usados o caldo MRS, suplementado com 5% de glucose e um tubo de durham invertido. Segundo Gibson e Abdel-Malek (1945), a quantidade de gás formada a partir da glucose depende da profundidade do meio contido no tubo, sendo recomendado o uso de 5-6ml de caldo por tubo. O caldo foi coberto com uma camada de 1cm de óleo mineral, para evitar a difusão do gás formado (SMIBERT; KRIEG, 1981).

A identificação das espécies para os diferentes gêneros encontrados foi realizada de acordo com os testes bioquímicos, utilizando o sistema API 50CH em conjunto com o meio API CHL (*BioMérieux*®, *Marcy-l'Etoile - France*) para lactobacilos e semelhantes e o sistema API 20 Strep (*BioMérieux*®, *Marcy-l'Etoile*

- France) para a maioria dos estreptococos, enterococos e microrganismos semelhantes.

A identificação de *Streptococcus thermophilus* não pôde ser feita através do API 20 Strep porque este só identifica espécies clínicas de *Streptococcus*. Desta maneira, para identificar esta espécie, foi realizado o teste de termorresistência, no qual uma alíquota de 1% de cada isolado foi inoculada em LDR 10% estéril, e submetida ao tratamento térmico de 60°C/ 30 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 42°C por 24-48h para verificação do crescimento de *Streptococcus thermophilus* (HARDIE; WHILEY, 1995).

As cepas utilizadas como padrões para a identificação de BAL foram da coleção de culturas da *American Type Culture Collection* – ATCC e da coleção da *Nacional Collection of Dairy Organisms* – NCDO (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Cepas de referência utilizadas na identificação das BAL.

Cepas de referência	Fonte
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NCDO 2003
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4256
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 9338
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8914
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NCDO 1968

### 2.3. Análises Físico-Químicas

As porções retiradas das amostras de queijo, de forma alternada, foram preparadas para análises físico-químicas de acordo com os métodos oficiais de análise da *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (AOAC, 1997). Após o queijo ser triturado e homogeneizado, o material foi submetido às determinações

de pH, acidez titulável, atividade de água, umidade e cloretos, com ensaios em triplicata.

#### 2.3.1. Determinação de pH e acidez titulável

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro digital (*Analyser*, modelo 300M), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, conforme a metodologia AOAC 935.17 (AOAC, 1997). A acidez das amostras de queijo, por sua vez, foi determinada pelo método titulométrico com solução de hidróxido de sódio (Vetec) 0,1N, seguindo a metodologia AOAC 920.124 (AOAC, 1997). Os resultados foram expressos em percentuais de acidez em ácido láctico (g/ 100g amostra).

#### 2.3.2. Determinação de atividade de água e de teor de umidade

A atividade de água foi determinada através do aparelho *Aqualab* (*Decagon Devices Inc*, modelo CX-2), previamente calibrado com sais saturados de  $K_2SO_4$  ou NaCl. A determinação de umidade foi realizada de acordo com a metodologia AOAC 948.12, que preconiza a secagem prévia das amostras em banho-maria a 100°C, seguida de secagem em estufa com circulação forçada de ar, a uma temperatura de 130°C até a obtenção de peso constante (AOAC, 1997).

#### 2.3.3. Determinação de cloretos

O teor de cloretos foi determinado diretamente na amostra pelo Método de Volhard conforme a metodologia AOAC 935.43 (AOAC, 1997). Os resultados foram expressos como porcentagens de cloreto de sódio.

#### 2.3.4. Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas receberam tratamento estatístico através do teste de Análise de Variância – ANOVA – para determinação de significância estatística. As médias obtidas para as amostras de queijo de Coalho artesanal avaliadas foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas citadas foram realizadas com o auxílio do *software* livre R, versão 2.4.0 (R DEVELOPMENT, 2006).

### 3. Resultados e Discussão

Das 12 amostras de queijo de Coalho artesanal analisadas, nove foram produzidas no Vale do Jaguaribe e três nos Sertões Cearenses (**Tabela 2**). As amostras procedentes de Jaguaribe apresentavam formato redondo enquanto que as dos Sertões Cearenses eram retangulares. Nenhuma destas amostras de queijo mostrou a presença de soro.

Todos queijos produzidos em Jaguaribe possuíam casca fina, sendo que quatro deles tinham uma textura macia, bem como o fabricado em Quixadá. Já, os queijos elaborados no Tauá apresentavam casca dura e textura mais firme, devido a maior cura. A presença de olhaduras foi verificada em todas as amostras analisadas, no entanto somente 25% delas mostraram esta característica em grande proporção (**Tabela 2**).

Das amostras produzidas no Jaguaribe, quatro continham embalagem e rótulo, assim como a amostra de Quixadá, e cinco não os continham, da mesma maneira que as amostras de Tauá (**Tabela 2**).

Embora apenas 41,7% dos queijos apresentassem embalagem e rótulo, o intervalo médio entre a fabricação e a análise das amostras estudadas foi estimado em seis dias. Para este cálculo foram retiradas duas amostras, QC8 e

QC13, procedentes do município de Tauá (Sertões Cearenses), para as quais não se tinha informações seguras o suficiente sobre a sua data de fabricação.

**Tabela 2** – Procedência e características das amostras de queijo de Coalho artesanal produzido no estado do Ceará utilizadas neste estudo.

Nº amostras	Códigos queijos	Procedência	Embalagem e Rótulo	Casca/ Textura	Cor/ Presença de olhaduras
1	QC1	Jaguaribe	Sim	Fina/ Firme	Amarelo-clara/ Poucas
2	QC2	Jaguaribe	Não	Fina/ Firme	Amarelo-clara/ Poucas
3	QC3	Jaguaribe	Sim	Fina/ Firme	Amarelo-clara/ Muitas
4	QC4	Jaguaribe	Sim	Fina/ Firme	Amarelo-clara/ Poucas
5	QC5	Jaguaribe	Sim	Fina/ Macia	Branca/ Poucas
6	QC6	Jaguaribe	Não	Fina/ Firme	Amarelo-clara/ Poucas
7	QC7	Quixadá	Sim	Fina/ Macia	Branca/ Poucas
8	QC8	Tauá	Não	Dura/ Firme	Amarela/ Muitas
9	QC9	Jaguaribe	Não	Fina/ Macia	Amarelo-clara/ Poucas
10	QC12	Jaguaribe	Não	Fina/ Macia	Amarelo-clara/ Poucas
11	QC13	Tauá	Não	Dura/ Firme	Amarela/ Muitas
12	QC14	Jaguaribe	Não	Fina/ Macia	Amarelo-clara/ Poucas

### 3.1. Análises Físico-Químicas

Os resultados de atividade de água, umidade, acidez titulável, pH e cloretos para as amostras analisadas são apresentados na **Tabela 3**. Os valores dos parâmetros físico-químicos avaliados mostraram pequeno espalhamento em torno das médias, indicado pela magnitude de seus respectivos desvios padrões.

A ANOVA revelou que os resultados físico-químicos obtidos para atividade de água, umidade, acidez titulável, pH e cloretos foram estatisticamente significativos em um nível de 95% de confiança.



**Tabela 3** – Características físico-químicas das amostras de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará.

<b>Amostras</b>	<b>Aa</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Acidez</b>	<b>pH</b>	<b>Cloretos (%)</b>
QC1	0,968 (0,001) <sup>a</sup>	40,93 (0,30) <sup>a</sup>	0,24 (0,00) <sup>a</sup>	6,51 (0,03) <sup>a</sup>	2,77 (0,14) <sup>a</sup>
QC2	0,953 (0,002) <sup>c</sup>	42,78 (0,02) <sup>c</sup>	0,22 (0,02) <sup>a</sup>	6,49 (0,01) <sup>a</sup>	2,73 (0,02) <sup>a</sup>
QC3	0,974 (0,003) <sup>d</sup>	48,23 (0,09) <sup>d</sup>	0,25 (0,72) <sup>a</sup>	6,39 (0,00) <sup>b</sup>	2,16 (0,02) <sup>e</sup>
QC4	0,946 (0,002) <sup>e</sup>	40,95 (0,34) <sup>a</sup>	0,37 (0,02) <sup>c</sup>	6,11 (0,02) <sup>c</sup>	3,50 (0,03) <sup>c</sup>
QC5	0,963 (0,000) <sup>b</sup>	45,26 (0,04) <sup>e</sup>	0,26 (0,02) <sup>a</sup>	6,20 (0,02) <sup>d</sup>	3,32 (0,24) <sup>cd</sup>
QC6	0,961 (0,001) <sup>b</sup>	42,25 (0,01) <sup>bc</sup>	0,27 (0,00) <sup>a</sup>	6,12 (0,02) <sup>c</sup>	3,03 (0,03) <sup>abd</sup>
QC7	0,967 (0,001) <sup>a</sup>	51,59 (0,05) <sup>f</sup>	0,16 (0,02) <sup>b</sup>	7,04 (0,01) <sup>e</sup>	2,99 (0,11) <sup>abd</sup>
QC8	0,954 (0,001) <sup>c</sup>	40,30 (0,21) <sup>a</sup>	0,25 (0,00) <sup>a</sup>	6,21 (0,01) <sup>d</sup>	3,16 (0,08) <sup>bd</sup>
QC9	0,957 (0,001) <sup>c</sup>	38,89 (1,02) <sup>g</sup>	0,23 (0,02) <sup>a</sup>	6,28 (0,01) <sup>f</sup>	3,12 (0,08) <sup>bd</sup>
QC12	0,961 (0,001) <sup>b</sup>	41,34 (0,07) <sup>ab</sup>	0,13 (0,02) <sup>b</sup>	6,39 (0,03) <sup>b</sup>	2,92 (0,10) <sup>ab</sup>
QC13	0,916 (0,001) <sup>f</sup>	28,80 (0,09) <sup>h</sup>	0,96 (0,02) <sup>d</sup>	5,54 (0,02) <sup>g</sup>	3,30 (0,10) <sup>cd</sup>
QC14	0,982 (0,002) <sup>g</sup>	42,63 (0,64) <sup>c</sup>	0,27 (0,02) <sup>a</sup>	6,35 (0,05) <sup>b</sup>	1,53 (0,04) <sup>f</sup>
<b>Médias</b>	<b>0,959 (0,017)</b>	<b>42,00 (5,49)</b>	<b>0,24 (0,06)*</b>	<b>6,30 (0,34)</b>	<b>2,88 (0,55)</b>

Resultados apresentados como média aritmética (desvio padrão).

\*Média sem o valor da amostra QC13.

Valores seguidos da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si para um nível de 5% de significância.

### 3.1.1. Atividade de água e de teor de umidade

A atividade de água (Aa) média para as amostras de queijo de Coalho artesanal foi de 0,959, e está dentro da faixa de variação de Aa para queijos citada pela literatura, a qual vai de 0,999 para os queijos frescos a 0,900 para os de cura prolongada (FOX *et al.*, 2000, GUINEE; FOX, 2004).

O valor médio obtido para Aa das amostras de queijo de Coalho artesanal reportado neste trabalho é aproximadamente o mesmo do valor (0,955) encontrado por Andrade (2006) em amostras de queijo de Coalho artesanal produzidas no Ceará e do valor (0,963) relatado por Nassu e outros (2006) para

Aa de queijos de Coalho produzidos no Rio Grande do Norte.

A Aa mínima para o desenvolvimento de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* é, respectivamente, 0,93, 0,98, 0,96. Em geral, a Aa ótima para o crescimento das BAL é de 0,990 (BERESFORD *et al.*, 2001). Os valores de Aa encontrados nas amostras de queijo de Coalho analisadas foram inferiores a 0,990 e provavelmente contribuem para o controle da atividade metabólica e multiplicação deste grupo de microrganismos neste tipo de queijo.

O teor de umidade das amostras de queijo de Coalho artesanal variou de 28,80 a 51,59%, com média de 42,0% (**Tabela 3**). Dentro desta faixa de variação, 75% das amostras foram classificadas como de média umidade (36 a 45,9%) conforme a Portaria nº 146 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA, 1996).

Resultados semelhantes foram relatados por Araújo e Nassu (2002), nos quais 81,4% de 43 amostras de queijo de Coalho produzidas no Ceará foram classificadas como de médio conteúdo de umidade. Andrade (2006) observou que 71,43% de sete amostras do mesmo tipo de queijo, incluindo artesanais e industrializadas, também apresentavam esta característica. Nassu e outros (2006) verificaram que 66,67% de seis amostras de queijo de Coalho produzidas no Rio Grande do Norte tinham médio conteúdo de umidade.

Em contrapartida, análises realizadas por Andrade Filho e Santos (1998) relataram conteúdo de umidade variando de 56,55 a 88,50% em 15 amostras de queijo de Coalho fabricadas em Sergipe, o que as classificou como queijo de muita alta umidade.

A única amostra caracterizada como de baixa umidade, QC13 (28,8%), foi procedente do município de Tauá (Sertões Cearenses), onde o queijo de Coalho é tradicionalmente submetido a um tempo de cura maior. O resultado obtido para

esta amostra não se encontra em conformidade com o conteúdo de umidade média (36 a 45,9%) a alta (46 a 54,9%), estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho (SDA, 2001).

Benevides e outros (2000) avaliaram a perda de umidade durante 90 dias de cura do queijo de Coalho elaborado a partir de leite cru e pasteurizado. Após 30 dias de cura, a amostra produzida com leite cru apresentava umidade de 22,21%. Este resultado sugere que a amostra QC13 poderia estar no momento da análise com um tempo de cura de, aproximadamente, 30 dias.

### 3.1.2. pH e acidez titulável

O valor médio de pH verificado para as amostras de queijo de Coalho artesanal foi de 6,30 (**Tabela 3**), sendo que o pH mínimo (5,54) foi observado na amostra QC13, que, como já foi mencionado anteriormente, poderia ter sido submetida a um maior tempo de cura. Durante a cura, as BAL produzem maior quantidade de ácido láctico reduzindo o pH do queijo.

O valor de pH do queijo de Coalho situa-se normalmente em torno de 6,0, no entanto, a amostra QC7 apresentou pH demasiadamente elevado (7,04). Isto pode ocorrer possivelmente em decorrência da presença de leveduras e fungos nos queijos, os quais possuem a capacidade de metabolizar ácido láctico, particularmente, na superfície do queijo (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Um outro fator que pode contribuir para elevação do pH é a proteólise do queijo devido à produção de compostos alcalinos durante a quebra de proteínas (FOX *et al.*, 2000).

A acidez titulável, expressa em percentual de ácido láctico, variou de 0,13 a 0,37%, com valor médio de 0,24% e desvio padrão igual a 0,06% (**Tabela 3**). Estes valores não incluem a acidez medida para a amostra QC13 (0,96%), descartada por diferir sensivelmente das demais amostras.

Embora Sena e outros (2000) tenham verificado um pH médio de 5,35 para as amostras de queijo de Coalho comercializadas no varejo de Recife, PE, Andrade (2006), que analisou amostras de queijo de Coalho produzido no Ceará, obteve valores médios de 6,33 para pH e 0,42% para acidez, em concordância com os resultados deste trabalho. Nassu e outros (2006), que encontraram valores médios de pH e acidez, respectivamente de 6,50 e 0,16% , para queijos produzidos no Rio Grande do Norte, também seguem no mesmo sentido.

### 3.1.3. Cloretos

O teor médio de cloreto de sódio verificado para as amostras de queijo de Coalho artesanal foi de 2,88%, com mínimo de 1,53% e máximo de 3,50% (**Tabela 3**). Segundo Guinee e Fox (2004), o conteúdo de sal em queijos varia de aproximadamente 0,7% para o Emmental a 6,0% para o Domiati.

Resultados similares aos encontrados neste trabalho foram relatados por Araújo e Nassu (2002), que constataram um valor médio de 3,29% de NaCl em queijos de Coalho produzidos no estado do Ceará, e por Nassu e outros (2006) que encontraram um conteúdo médio de NaCl de 2,51% em amostras deste mesmo tipo de queijo, elaborado no Rio Grande do Norte.

A concentração de sal é um fator que exerce grande influência na qualidade do queijo, pois desempenha funções como: preservação pela redução da atividade de água e expulsão do soro do queijo com conseqüente diminuição da umidade e inibição do crescimento microbiano; retardação da cura por inibir o crescimento de microrganismos e a atividade excessiva de enzimas, o que afeta no sabor e na textura dos queijos (GUINEE; FOX 2004).

Na relação entre o teor de sal e as BAL, baixos níveis de NaCl estimulam o crescimento das espécies de *Lactococcus*, porém, concentrações acima de 5% inibem fortemente os microrganismos deste gênero. A maioria das BAL

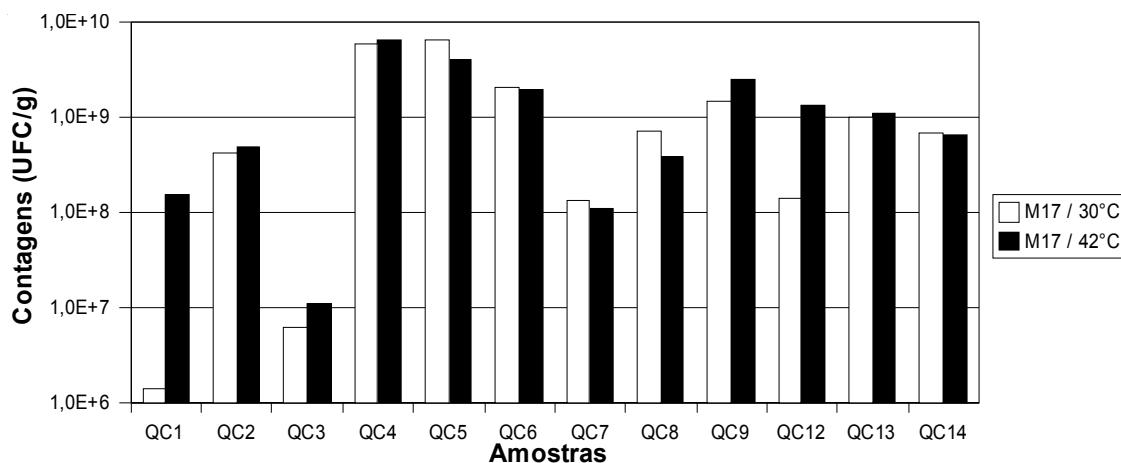
associadas à fermentação secundária dos queijos podem crescer a 6%, mas não a 8% (FOX *et al.*, 2000).

### 3.2. Avaliação da Microbiota Láctica

#### 3.2.1. População de bactérias ácido lácticas

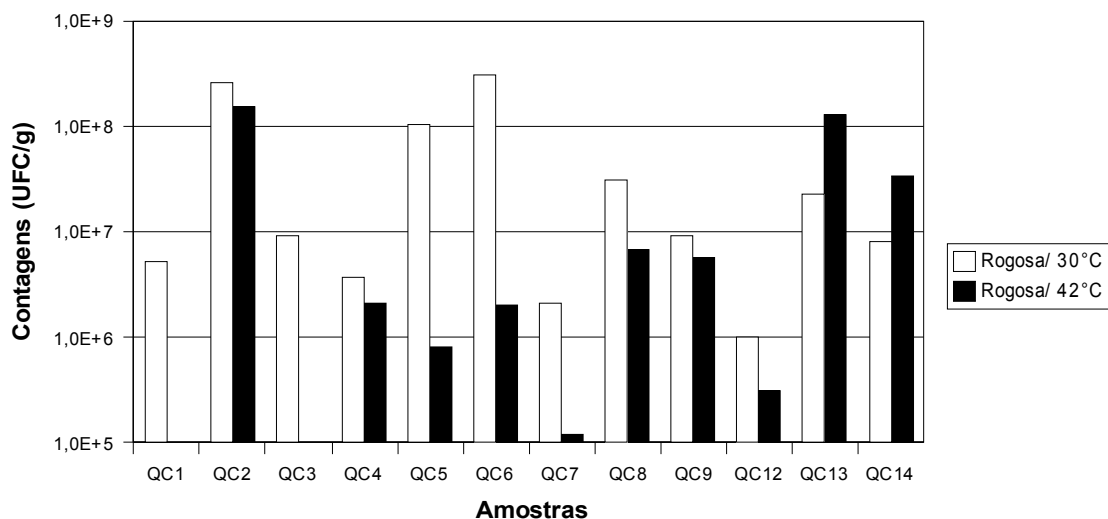
A população de BAL isolada nos meios de crescimento específicos, às temperaturas de incubação de 30 e de 42°C pode ser observada na **Figura 1**, para o meio M17, e na **Figura 2**, para o Rogosa. Os meios e as temperaturas empregados permitiram um bom crescimento microbiano, embora o meio M17 pareça ter sido mais apropriado que o Rogosa, por resultar em maior contagem de unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC/g), em ambas temperaturas.

Para cada amostra de queijo de Coalho foram realizadas contagens para as duas temperaturas avaliadas, resultando em 24 enumerações em cada meio. O crescimento microbiano foi observado para todas as amostras em meio M17, sendo 87,5% com contagens superiores a  $10^8$  UFC/g (**Figura 1**).



**Figura 1** – Contagens de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal em meio M17, a diferentes temperaturas.

Em meio Rogosa, somente 20,8% das amostras apresentaram contagens viáveis acima de  $10^8$  UFC/g. A maior parte das amostras (58,3%) mostrou uma contagem em torno de  $10^6$  e em 8,3% das amostras não foram detectadas células viáveis neste meio (**Figura 2**).



**Figura 2** – Contagens de bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de queijo de Coalho artesanal em meio Rogosa, a diferentes temperaturas.

As duas amostras que apresentaram um comportamento diferente das demais nos meios M17 e Rogosa foram: QC1 e QC3, ambas procedentes de Jaguaribe. Estes queijos exibiram menor contagem a 30°C no M17, quando comparados com as outras amostras, e não mostraram células viáveis a 42°C no meio Rogosa.

Torres-Llenez e outros (2006) também utilizaram diferentes meios (M17 e MRS) e temperaturas (30, 37 e 42°C) para o isolamento de BAL isoladas de um queijo fresco Mexicano, obtendo um bom crescimento em todas as combinações de meio e temperatura. Medina e outros (2001) não encontraram diferença significativa entre as contagens médias para as BAL nos meios M17, MRS e MSE

e Quadghiri e outros (2005) obtiveram contagens de  $10^8 - 10^9$  UFC/g para BAL isoladas de oito amostras de um queijo Marroquino, em MRS.

### 3.2.2. Confirmação das bactérias ácido Láticas

#### *Avaliação de produção de catalase*

Para os microrganismos isolados serem considerados BAL, eles devem ser Gram positivos, catalase negativa e produtores de ácido. Para o total de 811 isolados Gram positivos, grande parte mostrou-se catalase negativa (81,0%), 13,0% foram catalase positiva, sendo descartados, e 5,7% dos isolados não se desenvolveram nos meios de cultura utilizados, sendo considerados não cultiváveis (**Tabela 4**). O desenvolvimento de outros microrganismos, catalase positiva, além das BAL, ocorre devido ao uso de meios de cultura bastante ricos em nutrientes.

**Tabela 4** – Produção de catalase pelos microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal.

<b>Produção de Catalase</b>	<b>Nº de isolados</b>	<b>%</b>
Negativa	657	81,0
Positiva	108	13,3
Não Cultiváveis	46	5,7
<b>Total</b>	<b>811</b>	<b>100</b>

#### *Verificação de morfologia dos microrganismos isolados*

Microrganismos na forma de cocos foram predominantes (440) e isolados em quantidades similares nos meios M17 e Rogosa (**Tabela 5**). Este fato demonstra a baixa seletividade destes meios na discriminação dos

microrganismos na forma de cocos. No entanto, os microrganismos na forma de bastões e cocobacilos apresentaram preferência pelo Rogosa, pois a maior parte deles foi isolado neste meio, representando, respectivamente, 23,8% e 17,4%.

De acordo com Richter e Vedamuthu (2001), o meio M17 é mais específico para cocos, enquanto o Rogosa é parcialmente seletivo para o isolamento de lactobacilos porque o seu pH é reduzido pela adição de ácido acético, favorecendo o desenvolvimento destes microrganismos.

Por outro lado, os resultados obtidos por López-Dias e outros (2000) contradizem a especificidade do meio M17 para os cocos, pois 77,5% dos enterococos foram isolados a partir do meio Rogosa e somente 12,5% destes microrganismos foram isolados do M17.

A morfologia de 108 isolados não pôde ser determinada (**Tabela 5**) devido à fragilidade apresentada por estes microrganismos frente aos fatores do meio, quando colocados para se desenvolver individualmente.

**Tabela 5** – Morfologia de microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal nos meios M17 e Rogosa.

<b>Morfologia</b>	<b>Isolados em meio M17</b>	<b>%</b>	<b>Isolados em meio Rogosa</b>	<b>%</b>
<b>Cocos +</b>	223	52,5	217	56,2
<b>Bastões +</b>	31	7,2	92	23,8
<b>Cocobacilos +</b>	27	6,4	67	17,4
<b>NC</b>	38	8,9	8	2,1
<b>ND</b>	106	25,0	2	0,5
<b>Total</b>	<b>425</b>	<b>100,0</b>	<b>386</b>	<b>100,0</b>

NC – Microrganismos Não Cultiváveis.

ND – Não Determinado.

Os resultados observados neste trabalho corroboram os obtidos por Öner,



Karahan e Aloglu (2006), que verificaram a maior presença de microrganismos na forma de cocos, ao estudarem as mudanças ocorridas na microbiota de um queijo branco artesanal Turco, durante a sua cura. Caridi e outros (2003) constataram que a população de BAL na forma de cocos, predominante do queijo italiano artesanal Aspromonte, foi reduzida no final da cura (28 dias), enquanto a microbiota na forma de bastões aumentou no mesmo período.

#### *Avaliação de produção de ácido*

Dos 657 microrganismos Gram positivos, catalase negativa, na forma de cocos e bastões, 83% produziram ácido, coagulando e reduzindo o meio leite tornassolado em até sete dias. Dos isolados restantes, 14,9% foram considerados fracos produtores de ácido por não coagularem completamente o meio, no mesmo período e 2,1% não produziram ácido (**Tabela 6**). Desta forma, 643 isolados foram confirmados como BAL, e submetidos aos testes de identificação de gênero.

**Tabela 6** – Caracterização da capacidade de produção de ácido pelos microrganismos isolados das amostras de queijo de Coalho artesanal.

<b>Microrganismos</b>	<b>Nº de Isolados</b>	<b>%</b>
Produtores de ácido	545	83,0
Fracos produtores de ácido	98	14,9
Não produtores de ácido	14	2,1
Total	657	100,0

#### 3.2.3. Identificação das bactérias ácido Lácticas

A classificação para os gêneros das 643 BAL isoladas das amostras de queijos de Coalho artesanal, bem como sua distribuição de acordo com as regiões de procedência, pode ser observada na **Tabela 7**. Os enterococos que

apresentaram resultados diferentes aos citados na literatura para um dos testes de identificação foram considerados atípicos.

**Tabela 7** – Distribuição dos gêneros de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal de acordo com a procedência das amostras.

Gêneros	Vale do Jaguaribe	%	Sertões Cearenses	%	Total de Isolados	%
<i>Enterococcus</i>	121	26,9	37	19,1	158	24,6
Enterococos at.	159	35,4	66	34,0	225	35,0
<i>Streptococcus</i>	82	18,3	-	-	82	12,8
<i>Lactococcus</i>	4	0,9	7	3,6	11	1,7
<i>Leuconostoc</i>	4	0,9	-	-	4	0,6
<i>Lactobacillus</i>	66	14,7	76	39,2	142	22,0
NI	13	2,9	8	4,1	21	3,3
<b>Total</b>	<b>449</b>	<b>100,0</b>	<b>194</b>	<b>100,0</b>	<b>643</b>	<b>100,0</b>

NI – Não Identificados; at. - atípicos.

O gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal de Jaguaribe e dos Sertões Cearenses, representando 62,3% e 53,1% dos isolados identificados, respectivamente, incluindo os típicos e atípicos. Os *Enterococcus* são encontrados em alta densidade em muitos tipos de queijos, e parecem ter um papel muito importante no desenvolvimento de sabor e aroma nestes produtos (BERESFORD *et al.*, 2001).

A frequência de *Lactobacillus* foi mais elevada nas amostras procedentes dos Sertões Cearenses. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que o queijo de Coalho proveniente desta região é curado, o que favorece o desenvolvimento dos lactobacilos devido ao pH do queijo ser menor.

O gênero *Streptococcus* apresentou uma frequência de 18,3% nos queijos

de Jaguaribe, porém não foi detectado nas amostras procedentes dos Sertões Cearenses, assim como o gênero *Leuconostoc*. Os *Lactococcus* foram isolados dos queijos das duas regiões em baixa quantidade (**Tabela 7**). No total, 21 isolados não puderam ser classificados em nenhum dos gêneros, através dos testes realizados.

A presença dominante de isolados dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, e lactobacilos termofílicos mostra a prevalência de bactérias que se desenvolvem bem em temperaturas elevadas (42°C). Segundo Cogan e outros (1997), a presença de microrganismos mesofílicos e termofílicos no mesmo produto não é muito comum em queijos artesanais que são elaborados sem a adição de fermento láctico comercial.

A capacidade que os enterococos têm de se adaptar às condições adversas, como altas e baixas temperaturas e concentrações elevadas de sal, possibilita seu desenvolvimento em vários tipos de queijos. Assim como no queijo de Coalho, o gênero *Enterococcus* foi detectado também em outros queijos. Cogan e outros (1997) encontraram um número significativo de *Enterococcus* (25,5%), dentre os 2.823 isolados de BAL, oriundos de queijos europeus como Feta, Kasserli, Manchego, Majonero, Serra da Estrela e outros.

Zárate e outros (1997) verificaram que o *Enterococcus* prevaleceu na microbiota do queijo espanhol Tenerife durante todo o período de cura. Dos 60 isolados identificados ao longo do tempo, a população deste gênero cresceu de 28,4%, quando avaliado após o segundo dia de fabricação, para 49,0% no final da cura.

Medina *et al.* (2001) caracterizaram 250 cepas de BAL, isoladas de 4 amostras de um queijo artesanal Argentino. Os gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* foram identificados em 59 e 41%, respectivamente, destas amostras.

Em contrapartida, alguns dos gêneros que foram encontrados em pequena

quantidade no queijo de Coalho artesanal, predominam na população láctica de muitos outros queijos. Estepar *et al.* (1999) verificaram que o gênero dominante no queijo Peñamellera foi o *Lactococcus*, que alcançou quantidade máxima, após 3 dias no interior do queijo e 7 dias na sua superfície.

Fortina e outros (2003) detectaram que 67% dos 116 microrganismos na forma de cocos, isolados de um queijo artesanal protegido pela denominação de origem, foram representados pelo gênero *Lactococcus*. Marino, Maifreni e Rondinini (2003) relataram que o *Streptococcus thermophilus* predominou durante todo o período de cura do queijo Montasio.

Ouadghiri e outros (2005) avaliaram um total de 164 BAL isoladas de um queijo branco e macio Marroquino, denominado Jben, identificando 34% de *Lactobacillus*, 10% de *Enterococcus*, 2% de *Streptococcus* e as mesmas quantidades para *Lactococcus* e *Leuconostoc* (27%).

A identificação das espécies para os gêneros verificados no queijo de Coalho artesanal pode ser observada na **Tabela 8**. Dos 82 isolados identificados, 44 foram procedentes das amostras do Jaguaribe e 38 das amostras dos Sertões Cearenses.

Dentre os *Enterococcus* e *Lactobacillus*, as espécies predominantes foram *Enterococcus faecium* (68,0%) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (55,9%). *Streptococcus thermophilus* é a única espécie do gênero *Streptococcus* que consegue sobreviver ao tratamento térmico de 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995). As espécies para o gênero *Leuconostoc* não foram identificadas.

Os resultados da identificação das espécies para os gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* estão de acordo com os dados obtidos por Gobbetti e outros (1999). Marino, Maifreni e Rondinini (2003) também detectaram as espécies *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus durans* no queijo artesanal italiano Montasio.

**Tabela 8** – Espécies de BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará.

<b>Bactérias ácido lácticas</b>	<b>Nº Isolados</b>	<b>%<sup>a</sup></b>	<b>%<sup>b</sup></b>
<i>Enterococcus</i>	25	100,0	30,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	28,0	8,5
<i>Enterococcus faecium</i>	17	68,0	20,7
<i>Enterococcus durans</i>	1	4,0	1,2
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	11	100,0	13,4
<i>Lactobacillus</i>	34	100,0	41,5
<i>Lactobacillus brevis</i>	4	11,8	4,9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	11	32,4	13,4
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	19	55,9	23,2
<i>Streptococcus</i>	12	100,0	14,6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	11	91,7	13,4
<i>Streptococcus bovis</i> II	1	8,3	1,2
<b>Total</b>	<b>82</b>		<b>100,0</b>

<sup>a</sup> Percentagem de isolados identificados para cada gênero.

<sup>b</sup> Percentagem de identificados para o total de isolados.

As espécies identificadas para os *Lactobacillus* estão em concordância com os resultados de Williams, Choi e Banks (2002) e Sánchez e outros (2006), que observaram a ocorrência de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* em queijos produzidos com leite cru.

*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (55,9%) e *Lactobacillus plantarum* (32,4%) foram as espécies predominantes do gênero *Lactobacillus*, presentes nas amostras de queijo de Coalho artesanal produzidas no Ceará, assim como os resultados encontrados por Zaráte e outros (1997) para o queijo Tenerife. As espécies do gênero *Lactobacillus* encontradas neste trabalho fazem parte da microbiota secundária e chegam até os queijos através do leite cru e, principalmente, de contaminações vindas do ambiente de produção (CHAMBA; IRLINGER, 2004).

#### 4. Conclusões

Os resultados físico-químicos obtidos neste trabalho caracterizaram as amostras de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará como de médio conteúdo de umidade e de sal e atividade de água e pH elevados. Portanto, este queijo apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento microbiano.

O meio M17 apresentou um bom desempenho para o desenvolvimento microbiano, principalmente, para os microrganismos na forma de cocos, enquanto que o Rogosa foi mais favorável para o crescimento dos lactobacilos.

A avaliação da microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará resultou no isolamento e na identificação de número apreciável de bactérias ácido lácticas presentes no queijo. As amostras procedentes das regiões do Vale do Jaguaribe e dos Sertões Cearenses apresentaram diferenças quanto a composição de *Streptococcus* e na distribuição de *Lactobacillus*.

A predominância dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* sugere que, durante o processamento do queijo de Coalho, pode haver uma seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, na etapa de cozimento da massa.

A alta freqüência de *Enterococcus* pode ser decorrente da matéria-prima utilizada e indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção do queijo de Coalho artesanal. A aplicação de boas práticas de fabricação necessita ser intensificada e monitorada para que se reduzam os problemas de higiene, melhorando a qualidade microbiológica do queijo de Coalho oferecido para o consumo.

O conhecimento adquirido através da caracterização da microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará, especialmente pelo grande número de bactérias isoladas, contribuirá na seleção de um fermento láctico para a produção deste queijo a partir de leite pasteurizado.

## 5. Referências Bibliográficas

ANDRADE, A. A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de Coalho produzido no Ceará.** 2006. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,.

ANDRADE FILHO, J. B.; SANTOS, M. N. G. Avaliação microbiológica e físico-química de queijos artesanais tipo coalho comercializados no estado de Sergipe. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos.** Rio de Janeiro: Comissão Organizadora do XVI CBCTA, 1998. p. 125-128.

ARAÚJO, R. S.; NASSU, R. T. Caracterização físico-química de queijo de Manteiga, queijo de Coalho e Manteiga da Terra, produzidos nos estados do Rio Grande do Norte e do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p. 70-75, jun., 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed., Washington. 1997.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; RODRIGUES, M. C. P. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-206, jul./dez., 2000.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n.4-7, p. 259-274, Jul., 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry**,

**physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 287-317.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 201-209, Apr., 2003.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ago., 2005

CHAMBA, J.-F.; IRLINGER, F. Secondary and adjunct cultures. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 191-206.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.



FORTINA, M. G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P. L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 137-404, Aug., 2003.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Test for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap. 8, p.271-286.

GIBSON, T.; ABDEL-MALEK, Y. The formation of carbon dioxide by acid lactic bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of the detecting the process. **Journal of Dairy Research**, v. 14, p. 35-44, 1945.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 207-259.

GOBBETTI, M.; FOLKERTSMA, B.; FOX, P. F.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ANGELIS, M. DE; ROSSI, J.; KILCAWLEY, CORTINI, M. Microbiology and biochemistry of Fossa (pit) cheese. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 11, p.763-773, Nov., 1999.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, Dec., 1997.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological**

**Examination of Foods.** 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 19, p.201-207.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The Genus Streptococcus. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London: Chapman & Hall, 1995. V.2.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology.** 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 233-240, Apr. 2004. Short Communication.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, Dec., 2003.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 559-663, Apr., 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA (MAARA). Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A. LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e Manteiga da

Terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 89, p. 28-36, out., 2001.

NASSU, R. T.; ANDRADE, A. A. SILVA, A. C.; SILVA, G. J. F.; FERNANDES, R. L. A. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 351, p. 303-305, jul./ago., 2006.

ÖNER, Z.; KARAHAN, A. G.; ALOGLU, H. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal Turkish white cheese during ripening. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 449-454, Jun., 2006.

OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Bioersivity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 267-271, Oct., 2005.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. Jun./Sep., 2005. The fourth IDF Symposium on cheese: ripening characterization and technology.

R DEVELOPMENT Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**, reference index version 2.4.0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2006. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: dez. 2006.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 47, p.483-493.

SÁNCHEZ, I.; SESEÑA, S.; POVEDA, J. M.; CABEZAS, L.; PALOP, L. Genetic diversity, dynamics and activity of *Lactobacillus* community involvrd in traditional

processing of artisanal Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 265-273, Apr., 2006.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Instrução Normativa n° 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, queijo de Coalho e queijo Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2001. Seção 1, p.13.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORREA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de Coalho comercializado em Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 41-44, Jul., 2000.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. General characterization. In: GERHARDT, P. **Manual of Methods for General Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981.

TORRES-LLANEZ, M. J.; VALLEJO-CORDOBA, B.; DÍAZ-CINCO, M. E.; MAZORRA-MANZANO, M. A.; GONZÁLES-CÓRDOVA, A. F. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 9, p. 683-690, Sep., 2006.

WILLIAMS, A. G.; CHOI, S.-C.; BANKS, J. M. Variability of the species and strain phenotype composition the non-starter acid lactic bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. **Food Research International**, v.35, n. 5, p. 483-493, 2002.

ZÁRATE, V.; BELDA, F.; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v.7, n.10, p. 635-641, Oct., 1997.

## Capítulo III

### EVOLUÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA DURANTE O PROCESSAMENTO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL

#### Resumo

O processamento do queijo de Coalho artesanal foi acompanhado em duas unidades produtoras diferentes, localizadas na região de Jaguaribe, Ceará, com a finalidade de verificar a evolução da microbiota láctica durante a elaboração deste produto. Amostras de leite cru, da massa do queijo cozida e do produto final foram coletadas nas unidades produtoras, para o isolamento e identificação de bactérias ácido lácticas (BAL). O isolamento das BAL foi realizado em meios de cultivo M17 e Rogosa, incubados nas temperaturas de 30 e 42°C. Do total de 297 isolados Gram positivos, na forma de cocos (80,5%) e bastões (19,5%), 98,9% produziram ácido e foram considerados BAL, identificados a nível de gênero e espécie. Os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* foram detectados desde a matéria-prima até o produto final. O gênero *Lactococcus*, presente no leite cru, não foi encontrado nas amostras de queijo. Este fato evidenciou uma seleção de microrganismos resistentes às temperaturas elevadas no processamento do queijo, durante o cozimento da massa. O gênero dominante foi o *Enterococcus* (51,0%), dividido em enterococos típicos (56,0%) e atípicos (44,0%). Os *Lactobacillus* foram agrupados em mesofílicos e termofílicos, homo e heterofermentadores, de acordo com a temperatura de crescimento e a capacidade de produzir CO<sub>2</sub> a partir da glucose. Dentre as 50 espécies de BAL identificadas, as predominantes foram *Streptococcus thermophilus* (32,0%), *Lactococcus raffinolactis* (24,0%), *Enterococcus faecium* (16,0%) e *Lactobacillus plantarum* (8,0%).

## 1. Introdução

A produção de queijo de Coalho no Ceará é realizada há mais de um século em pequenos municípios da zona rural do estado. O Jaguaribe é um município cearense, cuja principal atividade produtiva é a fabricação de queijo de Coalho artesanal por micro e pequenas empresas, que empregam tecnologias simples, transmitidas de geração para geração.

Poucas empresas têm uma produção regular de queijo. A maioria delas está sujeita a sazonalidade da oferta de leite, cujo período de maior produtividade se verifica nos meses de fevereiro a abril. Segundo Nassu e outros (2001), a região do Jaguaribe apresenta uma produção diária média de 137,6 kg de queijo por produtor, dentre o período seco e chuvoso. A matéria-prima utilizada para a fabricação do queijo de Coalho no Jaguaribe é complementada com o leite vindo de municípios vizinhos.

A qualidade e procedência da matéria-prima utilizada na produção de queijos são fatores determinantes na definição das suas características. Por ser produzido a partir de leite cru, o processo fermentativo do queijo de Coalho é natural, dependendo somente da quantidade e da composição de bactérias ácido lácticas (BAL) presentes na matéria-prima.

Os queijos produzidos com leite cru possuem populações microbianas mais complexas do que os queijos produzidos com leite pasteurizado, as quais promovem diferenças fundamentais nas características sensoriais destes tipos de queijos (GRAPPIN; BEUVIER, 1997, PELÁEZ; REQUENA, 2005, SKEIE; ARDÖ, 2000).

De modo semelhante ao queijo de Coalho artesanal, muitas variedades de queijos europeus, como o Pecorino Sardo (Itália) e o Majorero (Espanha), são elaborados sem a adição de fermento láctico. Estes queijos contam com as BAL presentes no leite cru para baixar o pH, durante a sua produção, e desenvolver suas características sensoriais (BERESFORD *et al.*, 2001).

Além da complexidade microbiana existente no leite cru, fatores relacionados ao processamento do queijo também podem influenciar nas características do mesmo. Uma das etapas de elaboração que pode afetar as características do queijo de Coalho é o cozimento sucessivo da massa com soro aquecido, por aproximadamente 20 minutos, a uma temperatura que varia de 40° a 65°C (CARVALHO *et al.* 2005).

Considerando a diversidade da microbiota presente na matéria-prima, as condições ambientais, sanitárias e os diversos tipos de processamentos empregados na Região Nordeste, é comum observar grande variação na qualidade dos queijos artesanais. Diante dos fatores mencionados acima, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar a microbiota láctica presente em amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal produzido no Jaguaribe, a fim de acompanhar a evolução ocorrida com as BAL durante o processamento deste queijo.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta de Amostras**

As amostras de leite cru (LC1 e LC2), massa do queijo (MQ1 e MQ2) e queijo de Coalho (QC1 e QC2) foram coletadas durante o processamento do queijo de Coalho nas unidades produtoras identificadas como UP1 e UP2, situadas no município de Jaguaribe (**Figura 1**). As amostras da massa do queijo foram compostas por porções coletadas após cada cozimento, de modo a representar o processo de cozimento como um todo. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, no município de Fortaleza, onde foram analisadas.

## 2.2. Avaliação da Microbiota Láctica

### 2.2.1. Preparação das Amostras

As amostras de queijo de Coalho artesanal foram analisadas cinco dias após a sua fabricação. Elas foram divididas em porções, das quais foram retirados pequenos pedaços, aleatoriamente, a fim de se obter 25g de queijo. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em um homogeneizador tipo *Stomacher* (Seward, 400) com 225ml de solução de citrato de sódio 2% (Vetec) aquecida a 45°C. Na sequência, foram realizadas diluições decimais em série, em solução peptonada a 0,1% (Merck) (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992; HARRIGAN, 1998).

### 2.2.2. Isolamento e contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem e o isolamento das BAL foram efetuados após a inoculação de 1ml das diluições das amostras, em profundidade, com sobrecamada (HALL; LEDENBACH; FLOWERS, 2001), nos meios M17 ágar (Oxoid) e Rogosa ágar (Difco). O meio M17 foi utilizado para o isolamento de microrganismos na forma de cocos (CARIDI *et al.*, 2003), sendo as placas incubadas a 30 ou 42°C, por 48h. O uso de duas diferentes temperaturas de incubação teve a finalidade de selecionar bactérias mesofílicas e termofílicas.

O ágar Rogosa foi acidificado com ácido acético glacial para atingir o pH de 5,4, com a finalidade de isolar lactobacilos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004). As placas de ágar Rogosa foram incubadas por 5 dias, nas mesmas temperaturas usadas para as placas de M17. Posteriormente, uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias – UFC foi realizada. Foram escolhidas placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias; de onde 15–20 colônias foram coletadas aleatoriamente.



### 2.2.3. Purificação e confirmação das bactérias ácido lácticas

As colônias isoladas foram coletadas e estriadas no meio Man, Rogosa e Sharpe – MRS ágar (Acumedia), sendo incubadas por 48h, nas temperaturas de 30 ou 42°C, nas quais elas cresceram, para serem purificadas. Após a purificação, os isolados foram mantidos em MRS caldo (Acumedia), através de frequentes repicagens e submetidos aos testes de confirmação: coloração de Gram, para verificação da morfologia das células, reação de atividade da catalase e produção de ácido.

Para avaliação de produção de ácido, uma alíquota de 1% de cada isolado (previamente ativado em caldo) foi inoculado no meio leite tornassolado - *Litmus Milk* (BBL) e incubado a 35°C por 7 dias. A produção de ácido foi verificada pela coagulação e redução do meio após as primeiras 18h e a cada 24h, até completar o período de 7 dias. Os microrganismos produtores de ácido, Gram positivos, catalase negativa, na forma de cocos ou bastões foram considerados bactérias ácido lácticas (HALL; LEDENBACH; FLOWERS, 2001).

### 2.2.4. Identificação das bactérias ácido lácticas

A diferenciação de gênero para as BAL, com a morfologia de cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) foi efetuada com base nos testes de crescimento dos isolados nas seguintes condições: temperaturas de 10 e 45°C, pH de 4,4, e 9,6; teor de NaCl 6,5% e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose (HARRIGAN, 1998).

As BAL em forma de bastões (*Lactobacillus*) foram submetidas aos testes de crescimento nas temperaturas de 15 e 45°C, incubados por 5 e 2 dias, respectivamente, e de produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose (COGAN *et al.*, 1997).

O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado em Leite

Desnatado Reconstituído – LDR a 10%. Os testes de crescimento em diferentes pH's e na presença de 6,5% de NaCl foram conduzidos no caldo APT (Himedia). Para o teste de produção de CO<sub>2</sub> foram usados o caldo MRS, suplementado com 5% de glucose e um tubo de durham invertido. Segundo Gibson e Abdel-Malek (1945), a quantidade de gás formada a partir da glucose depende da profundidade do meio contido no tubo, sendo recomendado o uso de 5-6ml de caldo por tubo. O caldo foi coberto com uma camada de 1,0cm de óleo mineral, para evitar a difusão do gás formado (SMIBERT; KRIEG, 1981).

A identificação das espécies para os diferentes gêneros encontrados foi realizada de acordo com os testes bioquímicos, utilizando o sistema API 50CH em conjunto com o meio API CHL (*BioMérieux*®, *Marcy-l'Etoile - France*) para lactobacilos e semelhantes e o sistema API 20 Strep (*BioMérieux*®, *Marcy-l'Etoile - France*) para a maioria dos estreptococos, enterococos e microrganismos semelhantes.

A identificação de *Streptococcus thermophilus* não pôde ser feita através do API 20 Strep porque este só identifica espécies clínicas de *Streptococcus*. Desta maneira para identificar esta espécie, foi realizado o teste de termorresistência, no qual uma alíquota de 1% de cada isolado foi inoculada em LDR 10% estéril, e submetida ao tratamento térmico de 60°C/ 30 minutos. Em seguida, os tubos foram incubados a 42°C por 24-48h para verificação do crescimento de *Streptococcus thermophilus* (HARDIE; WHILEY, 1995).

As cepas utilizadas como padrões para a identificação de BAL foram da coleção de culturas da *American Type Culture Collection* – ATCC e da coleção da *Nacional Collection of Dairy Organisms* – NCDO (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Cepas de referência utilizadas na identificação das BAL.

<b>Cepas de referência</b>	<b>Fonte</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NCDO 2003
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4256
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 9338
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8914
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NCDO 1968

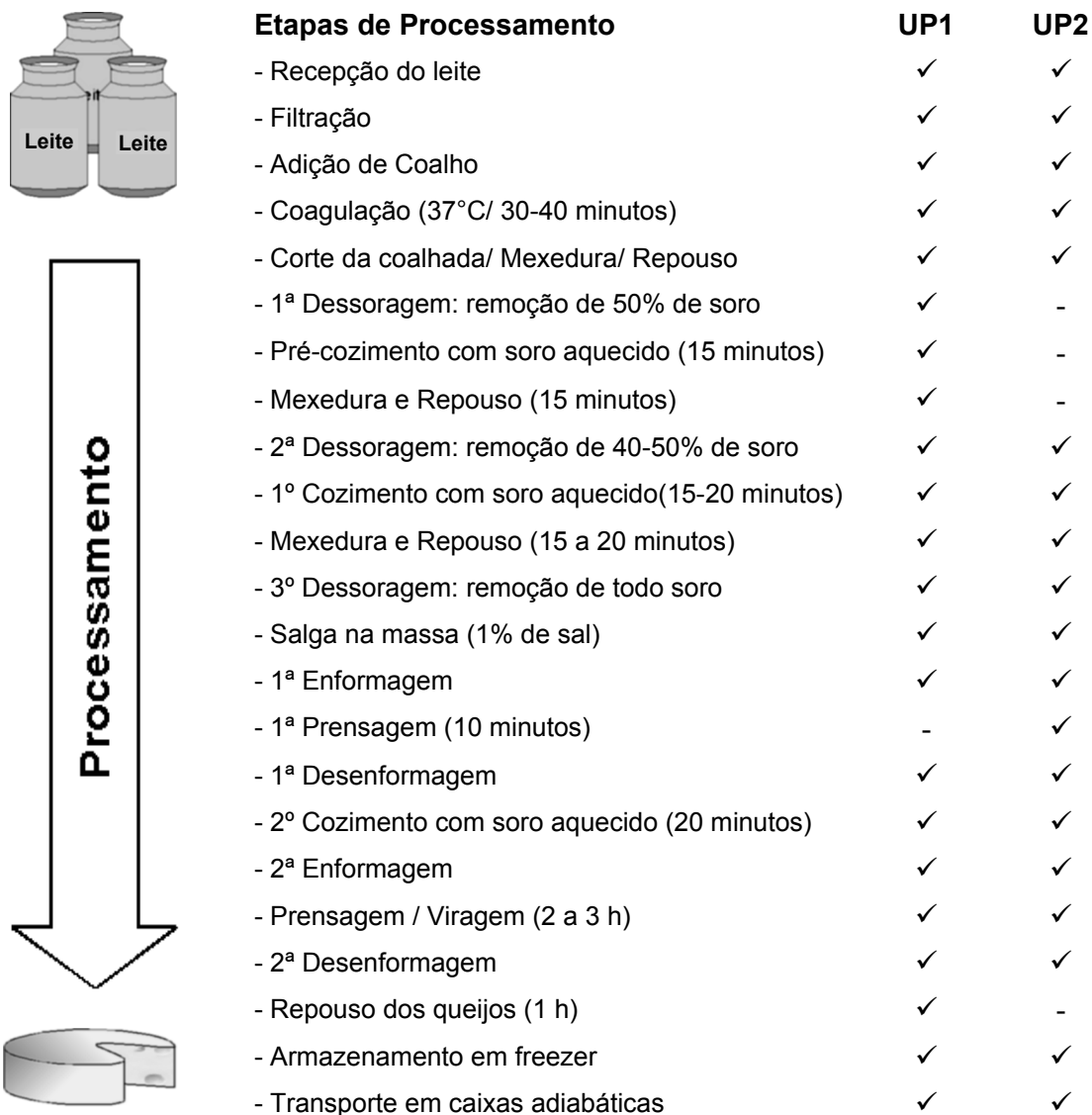
### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Processamento do queijo de Coalho artesanal**

O processamento do queijo de Coalho artesanal foi acompanhado, *in loco*, nas unidades produtoras UP1 e UP2. O fluxograma de elaboração do queijo utilizado por cada produtor, assim como suas etapas distintas podem ser observados na **Figura 1**.

Na UP1, a recepção do leite foi efetuada em uma plataforma própria e a sua filtração realizada em peneira de malha fina de plástico. Na UP2, a etapa de filtração foi feita em pano de algodão. As duas unidades produtoras usaram o coalho de origem bovina (pepsina – Coalhopar®).

A UP1 realizou três cozimentos, sendo o primeiro chamado pré-cozimento. No pré-cozimento, 50% do soro foi removido, aquecido até uma temperatura de 83°C e recolocado junto ao que restou no tanque com a massa do queijo cortada. Após a adição do soro aquecido, a temperatura do conjunto soro e massa do queijo baixou para 40°C.



✓ etapa realizada; - etapa não realizada.  
UP – Unidade Produtora

**Figura 1** – Fluxograma de processamento do queijo de Coalho artesanal nas UP1 e UP2.

No primeiro cozimento, a mesma operação do pré-cozimento foi efetuada pelas duas unidades produtoras, sendo que a temperatura média do soro mais a massa do queijo alcançou 55°C na UP1 e 65°C na UP2. O segundo cozimento foi feito com a adição do soro aquecido diretamente sobre os queijos, recém

desenformados, dentro de grandes recipientes de material plástico na UP1 e em grandes painéis de alumínio na UP2. Nesta etapa, foi possível mensurar a temperatura no soro e no centro do queijo durante o tempo de cozimento. As temperaturas foram verificadas no início do cozimento, após 10 minutos de imersão em soro aquecido e ao final de 20 minutos (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Temperaturas do segundo cozimento do queijo de Coalho artesanal produzido em duas Unidades Produtoras de Jaguaribe.

Tempo de cozimento (minutos)	Temperatura de cozimento (°C)					
	UP1			UP2		
	Soro	M. queijo <sup>a</sup>	$\Delta T$	Soro	M. queijo <sup>b</sup>	$\Delta T$
0	73	55	18	88	55	23
10	68	53	15	75	70	05
20	63	50	13	65	65	0

UP – Unidade Produtora; M. - Massa; <sup>a</sup> – queijo retangular; <sup>b</sup> – queijo redondo;  $\Delta T$  – variação de temperatura.

A UP1 produz queijos de Coalho redondos e retangulares (com peso aproximado de 500g e 1000g, respectivamente) enquanto que a UP2 produz este queijo somente na forma redonda (cerca de 500g). Os recipientes utilizados para o cozimento pela UP1 comportavam aproximadamente 40 queijos redondos ou 12 retangulares. O acompanhamento da temperatura da massa do queijo, no último cozimento, foi realizada no centro de queijos retangulares na UP1 e de queijos redondos na UP2.

Na etapa de cozimento, a variação de temperatura observada entre o soro e o centro da massa do queijo de Coalho foi, inicialmente, maior na UP2 (23°C) que na UP1 (18°C), no entanto após 20 minutos, as duas temperaturas entraram em equilíbrio na UP2, mas não na UP1 (**Tabela 2**).

O motivo pelo qual a variação de temperatura entre o soro e o queijo atinge

ou não o equilíbrio, é influenciado pela temperatura inicial do soro, além do tamanho dos recipientes, forma geométrica e quantidade de queijo submetida ao processo de cozimento. A falta de monitoração da temperatura durante esta etapa, não garante a padronização do processamento nas unidades produtoras e conseqüentemente pode ocasionar variações nas características do produto final. Sendo assim, o risco à saúde do consumidor deve ser considerado, pois o tempo de cozimento é insuficiente para a destruição de bactérias patogênicas.

A enformagem do queijo de Coalho foi realizada em fôrmas de PVC, com posterior prensagem em prensas de madeira e de aço inoxidável na UP1 e em prensas de madeira na UP2. Os dois estabelecimentos não utilizam embalagem. A UP2 imprime no queijo um símbolo à ferro quente, no intuito de diferenciá-lo dos demais queijos à venda no comércio.

Após a descrição das etapas consideradas mais importantes na elaboração do queijo de Coalho artesanal produzido em Jaguaribe, é possível notar que o fluxograma apresentado na **Figura 1** contém 18 das suas 23 etapas em comum às UP1 e UP2. Quatro etapas são realizadas somente pela UP1 e uma etapa é feita somente pela UP2. O fato dos sistemas de produção do queijo de Coalho artesanal apresentarem similaridade em grande parte das etapas nas duas unidades produtoras, localizadas na mesma região, evidencia a existência de traços culturais fortes na forma de elaboração deste queijo.

### **3.2. Avaliação da Microbiota Láctica**

Das seis amostras analisadas, duas corresponderam ao leite cru (LC1 e LC2), duas à massa do queijo (MQ1 e MQ2) e duas ao queijo de Coalho artesanal (QC1 e QC2), procedentes das duas unidades produtoras (UP1 e UP2) de Jaguaribe, Ceará.

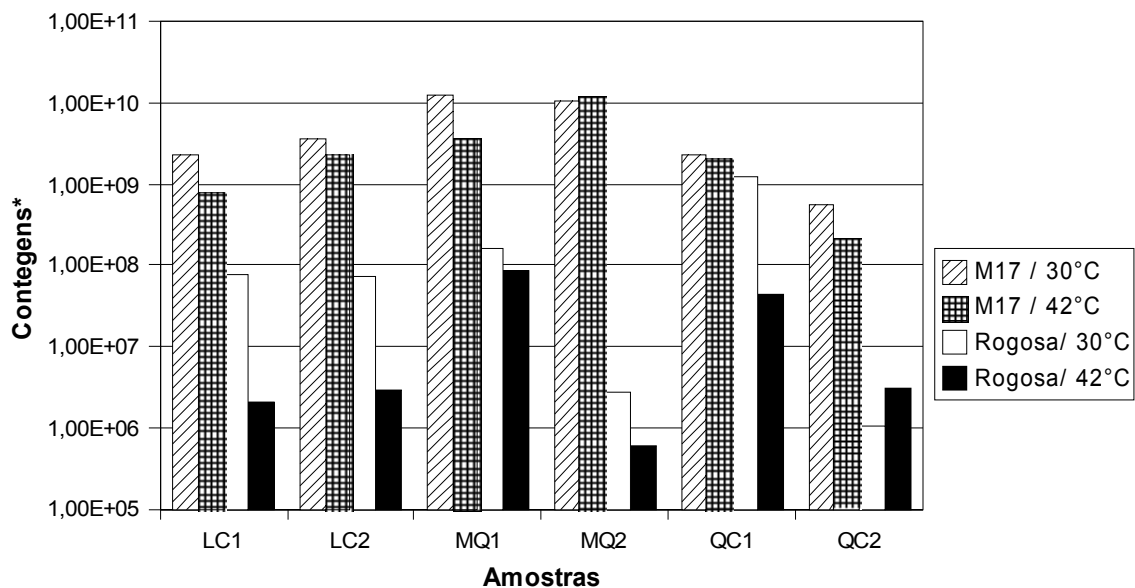
### 3.2.1. População de bactérias ácidos lácticas

As colônias desenvolvidas nas placas com meios de cultura M17 e Rogosa, apresentaram diferenças quanto a sua morfologia (redonda, oval, alongada, estrela, triangular), cor (branca e rósea), tamanho (pequeno, médio e grande), sendo que algumas possuíam halo. Zamfir e outros (2006) também visualizaram colônias com diferentes características ao avaliar a biodiversidade láctica de produtos lácteos romenos.

A enumeração das BAL isoladas nos meios específicos de cultivo M17 ágar e Rogosa ágar e incubadas às temperaturas de 30 e 42°C pode ser observada na **Figura 2**. Embora ambos os meios tenham permitido um bom desenvolvimento microbiano nas temperaturas empregadas, o meio M17 apresentou contagens superiores de unidades formadoras de colônias (UFC) em comparação ao meio Rogosa, indicando predominância de cocos.

As amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho apresentaram contagens com certa variação para os diferentes meios e temperaturas estudados, quando comparadas entre si. A maior variação de células viáveis foi verificada para amostras semeadas em meio Rogosa ( $10^5$  a  $10^9$  UFC/g), para ambas temperaturas analisadas.

As contagens realizadas no meio M17 alcançaram a ordem de grandeza de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC/g, nas diferentes temperaturas trabalhadas. Psoni, Tzanetakis e Litopoulou-Tezanetaki (2003) também detectaram bom crescimento no meio M17 ( $10^6$  UFC/g) durante a avaliação microbiológica do queijo grego Batzos. Zamfir e outros (2006) obtiveram contagens de células viáveis variando entre  $10^6$  a  $10^{10}$  UFC/ ml no meio M17, dentre amostras de leite cru e de queijos de diferentes regiões da Romênia.



\* UFC/ml para LC1 e LC2; UFC/g para MQ1, MQ2, QC1 e QC2.

**Figura 2** – Contagens de BAL isoladas de amostras de leite, massa do queijo e de queijo de Coalho em diferentes meios e temperaturas.

### 3.2.2. Confirmação das bactérias ácido lácticas

#### *Avaliação de produção de catalase*

Microrganismos com características de Gram positivos, catalase negativa e que produzem ácido são considerados BAL. Os resultados pertinentes à produção de catalase pelos microrganismos isolados podem ser observados na **Tabela 3**. Dos 406 microrganismos Gram positivos, a maioria foi catalase negativa (84,7%), sendo o restante descartado por ser catalase positiva (11,6%), ou por não se desenvolver nos meios de cultura utilizados (3,7%). Uma percentagem similar de microrganismos catalase positiva (10%) foi verificado por Estepar e outros (1999), na caracterização microbiológica do queijo artesanal Peñamellera .



**Tabela 3** – Produção de catalase pelos microrganismos isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal.

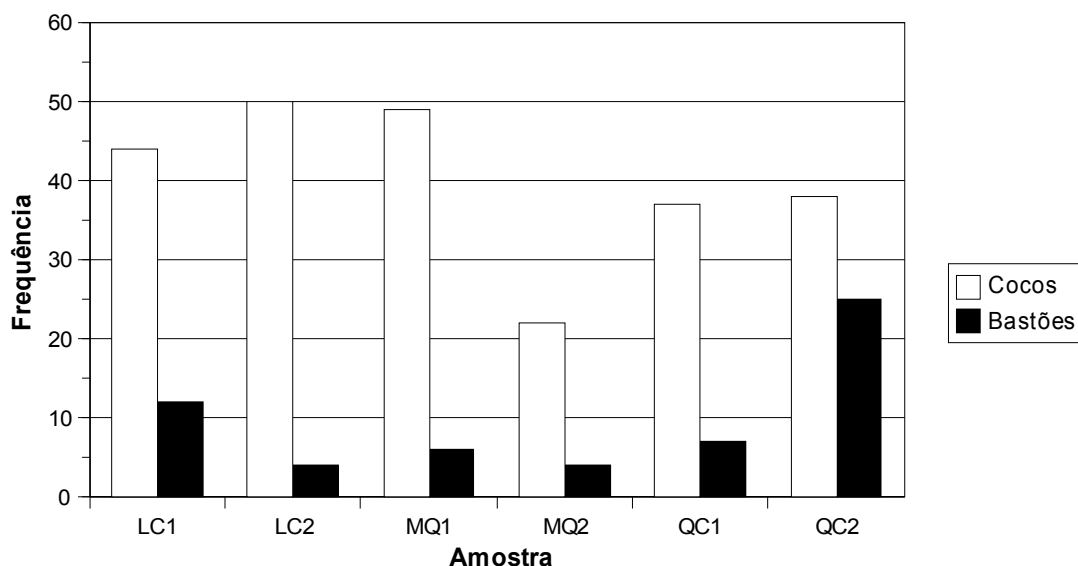
<b>Produção de Catalase</b>	<b>Nº Isolados</b>	<b>%</b>
Negativa	344	84,7
Positiva	47	11,6
NC	15	3,7
Total	406	100,0

NC – Microrganismos Não Cultiváveis

#### *Verificação de morfologia dos microrganismos isolados*

A distribuição de frequência dos microrganismos isolados na forma de cocos e de bastões das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal pode ser observada na **Figura 3**. A forma de cocos foi maioria dentre os microrganismos isolados para todas as amostras. A amostra QC2 apresentou uma maior quantidade de isolados na forma de bastão, em relação as demais amostras.

Durante a verificação da morfologia dos microrganismos, 46 isolados perderam a viabilidade às sucessivas repicagens em caldo MRS. Estes isolados também foram considerados não cultiváveis, devido a sua fragilidade frente aos fatores do meio, quando colocados para se desenvolver individualmente.



**Figura 3** – Distribuição dos microrganismos na forma de cocos e de bastões isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho.

#### *Avaliação de Produção de ácido*

O total de isolados não cultiváveis (61) somados aos microrganismos catalase positiva (47), representaram uma redução de 26,6% dos microrganismos isolados que prosseguiram no último teste de confirmação das BAL, a avaliação de produção de ácido.

A produção de ácido dos 298 microrganismos Gram positivo, catalase negativa, na forma de cocos e bastões avaliada através da coagulação e redução do meio leite tornassolado, após as primeiras 18 h, e a cada 24 h, durante sete dias pode ser observada na **Tabela 4**.

De acordo com Citti, Sandine e Elikier (1965), culturas lácticas que coagulam o leite em até 18 h podem ser consideradas células rápidas na produção de ácido; as células lentas necessitam mais de 48 h para produzir ácido. Neste sentido, grande parte das BAL isoladas das amostras coletadas durante o processamento

do queijo de Coalho artesanal foram rápidas produtoras de ácido no meio leite tornassolado (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Avaliação de produção de ácido pelos microrganismos isolados das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho, através do tempo de coagulação do meio.

TC (horas)	Leite cru	Massa queijo	Queijo	Total	
	N <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>	N	% <sup>b</sup>
18	46	28	17	91	30,5
24	12	16	11	39	13,1
48	22	13	40	75	25,2
72	8	9	9	26	8,7
96	2	6	0	8	2,7
144	0	4	4	8	2,7
168	14	2	6	22	7,4
> 168	2	3	20	25	8,4
NPA	0	1	3	4	1,3
Total	106	82	110	298	100,0

TC – Tempo de Coagulação; N<sup>o</sup> – Número de Isolados; NPA – Não Produziu Ácido;

<sup>a</sup> – Número de isolados para cada amostra conforme o tempo de coagulação;

<sup>b</sup> – Percentagem do número total de isolados para cada tempo de coagulação em relação ao número total de isolados submetidos a avaliação de produção de ácido;

Das 91 BAL com habilidade de coagular o leite tornassolado em até 18 h, 46 (50,5%) foram isoladas das amostras de leite cru (LC1 e LC2), 28 (30,8%) da massa do queijo (MQ1 e MQ2) e 17 (18,7%) das amostras de queijo de Coalho (QC1 e QC2). Isto indica que a matéria-prima utilizada pelas unidades produtoras continha um grande número de células com a característica de produzir ácido rapidamente.

Nesta mesma linha, das 39 BAL que coagularam o meio em 24 h, 12

(30,8%) foram procedentes das amostras LC1 e LC2, 16 (41,0%) das amostras MQ1 e MQ2 e 11 (28,2%) das amostras QC1 e QC2. Para as 75 BAL com tempo de coagulação de 48 h, 40 (53,3%) delas foram isoladas das amostras de queijo e uma quantidade menor (22/ 29,3%) das amostras de leite. Os quatro microrganismos que não produziram ácido, um isolado da massa do queijo e três do queijo, foram descartados.

Estes resultados demonstram que o número de BAL com a habilidade de produzir ácido rapidamente foi diminuindo da matéria-prima para o produto final, durante o processamento do queijo de Coalho artesanal. Este fato está relacionado com a etapa de cozimento e será discutido mais detalhadamente junto aos resultados de identificação.

### 3.2.3. Identificação das bactérias ácido lácticas

A identificação a nível de gênero das BAL na forma de cocos, isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal foi realizada conforme as características expostas na **Tabela 5**.

**Tabela 5** – Diferenciação dos gêneros de BAL na forma de cocos.

Testes	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Crescimento em:				
10°C	+	+	-	+
45°C	+	-	+	-
6,5% de NaCl	+	-	-	-
pH 9,6	+	-	-	-
pH 4,4	+	-	-	-
Prod. CO <sub>2</sub> a partir da Glucose	-	-	-	+

Fonte: Harrigan (1998).

A classificação e distribuição dos gêneros das 294 BAL isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho podem ser observadas na **Tabela 6**. O gênero predominante foi o *Enterococcus*, presente em 51,0% do total de amostras avaliadas, seguido pelos *Lactobacillus* (19,7%), *Streptococcus* (15,0%) e *Lactococcus* (14,3%).

**Tabela 6** – Distribuição dos gêneros de BAL isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal.

<b>Amostras</b>	<b><i>Lactococcus</i></b> Nº (%)	<b><i>Lactobacillus</i></b> Nº (%)	<b><i>Streptococcus</i></b> Nº (%)	<b><i>Enterococcus</i></b> Nº(%)
LC1	16 (38,1)	12 (20,7)	9 (20,5)	17 (11,3)
LC2	23 (54,8)	4 (6,9)	7 (15,9)	18 (12,0)
MQ1	0,0	6 (10,3)	14 (31,8)	35 (23,3)
MQ2	3 (7,1)	4 (6,9)	3 (6,8)	16 (10,7)
QC1	0,0	7 (12,1)	11 (25,0)	26 (17,3)
QC2	0,0	25 (43,1)	0,0	38 (25,3)
<b>Total</b>	<b>(42) 100</b>	<b>(58) 100,0</b>	<b>44 (100,0)</b>	<b>150 (100,0)</b>

Nº – Número de Isolados, LC – Leite Cru, MQ – Massa do Queijo e QC – Queijo de Coalho.

O gênero *Lactococcus* foi encontrado em maior quantidade nas amostras LC1 e LC2 e em pequena quantidade na amostra MQ2, mas não foi detectado nas amostras MQ1, QC1 e QC2. Este resultado indicou que o cozimento da massa, aplicado no processamento deste queijo, inativou os lactococos, os quais são pouco resistentes a temperaturas elevadas.

López-Díaz e outros (2000) também encontraram maior percentagem de *Lactococcus* no leite do que no queijo espanhol Valdeón. Porém, no processamento deste queijo não foi realizada a etapa de cozimento, sendo a evolução da microbiota durante a cura responsável pela redução destes microrganismos.

Os lactococos, geralmente, são considerados os principais responsáveis pela produção de ácido em queijos (PARENTE; COGAN, 2004). No presente trabalho, um maior número de células rápidas foram encontradas na matéria-prima. Dos isolados presentes no leite, tanto *Lactococcus* como *Streptococcus* estão entre os rápidos produtores de ácido; e apesar do gênero *Enterococcus* ser considerado como acidificante fraco, algumas cepas também podem apresentar esta característica, conforme relatado por Giraffa (2003).

O número de isolados de *Lactobacillus* aumentou da amostra de leite LC2 para a de queijo QC2, enquanto que o número de isolados de *Streptococcus* apresentou uma redução do leite para o queijo, nas amostras em questão.

O gênero *Enterococcus* apresentou desenvolvimento moderado durante o processamento, passando de 11, 3% e 12,0% nas amostras de leite LC1 e LC2, respectivamente, para 17,3% na amostra de queijo QC1 e 25,3% na QC2. Este resultado indica que grande parte dos *Enterococcus* presentes nas amostras de queijo advém da matéria-prima. A presença destes microrganismos no leite cru ocorre através da água e equipamentos contaminados (GELSOMINO *et al*, 2001), variando conforme as condições de higiene durante o processo de ordenha e a época do ano (FONTÁN *et al.*, 2001).

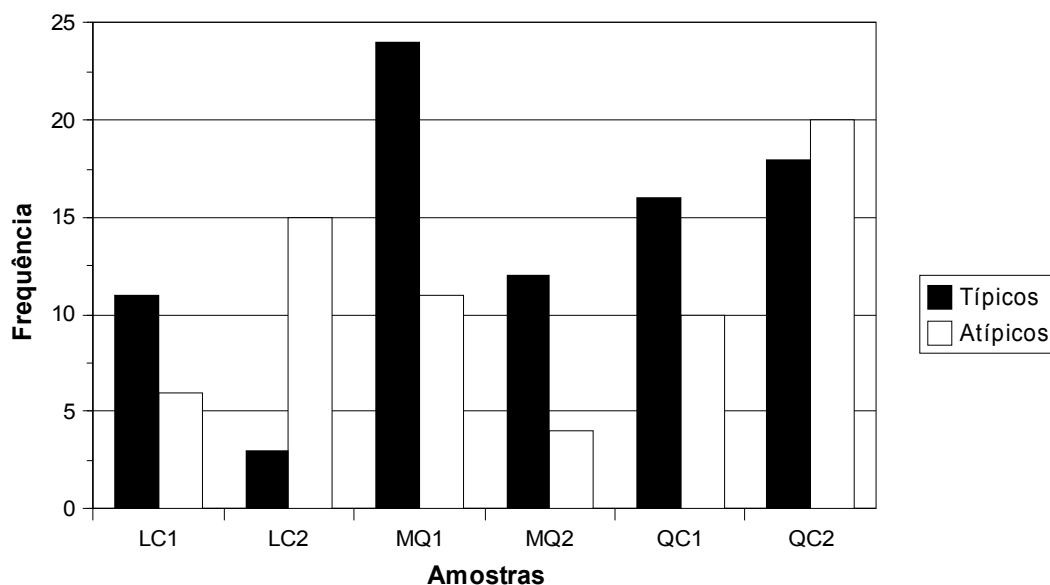
Resultados similares foram encontrados por Manopoulo e outros (2003), ao estudarem a evolução das populações microbianas, durante a produção de queijo Feta, em três diferentes indústrias.

A possibilidade de contaminação de enterococos durante o processamento e eventual cura do queijo está presente e deve ser considerada. Poznanski e outros (2004) relataram que, apesar da baixa quantidade de *Enterococcus* observada em duas amostras de leite – utilizado na produção de um queijo italiano tradicional – procedentes das regiões de Vanoi e Rolle, a microbiota do queijo produzido com o leite de Vanoi foi dominada por estes microrganismos. A origem dos enterococos ocorreu através de contaminação durante o processamento e a

cura do queijo.

Os 150 isolados do gênero *Enterococcus* foram subdivididos em enterococos típicos (56%) e enterococos atípicos (44%), sendo a sua distribuição nas amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho mostrada na **Figura 4**. Os enterococos que apresentaram resultados discrepantes em relação a um dos testes de identificação, apresentados na **Tabela 5**, foram considerados atípicos.

**Figura 4** – Distribuição de enterococos típicos e atípicos isolados das amostras de



leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal.

De acordo com Folquié-Moreno e outros (2006), existem algumas exceções para este gênero. Há espécies que não crescem a 45°C (*E. dispar*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis* e *E. sulfureos*) e outras que não crescem a 10°C (*E. cecorum* e *E. columbae*). Há também as que se desenvolvem pouco ou não se desenvolvem na presença de 6,5% de NaCl (*E. avium*, *E. columbae*, *E. cecorum* e *E. saccharominimus*).

A variabilidade de características fenotípicas para o *Enterococcus* é muito alta e ocorre de acordo com a origem do isolado (GIRAFFA, 2002). Este fato pode levar pesquisadores a cometerem erros de identificação, transformando os enterococos atípicos em novas espécies (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

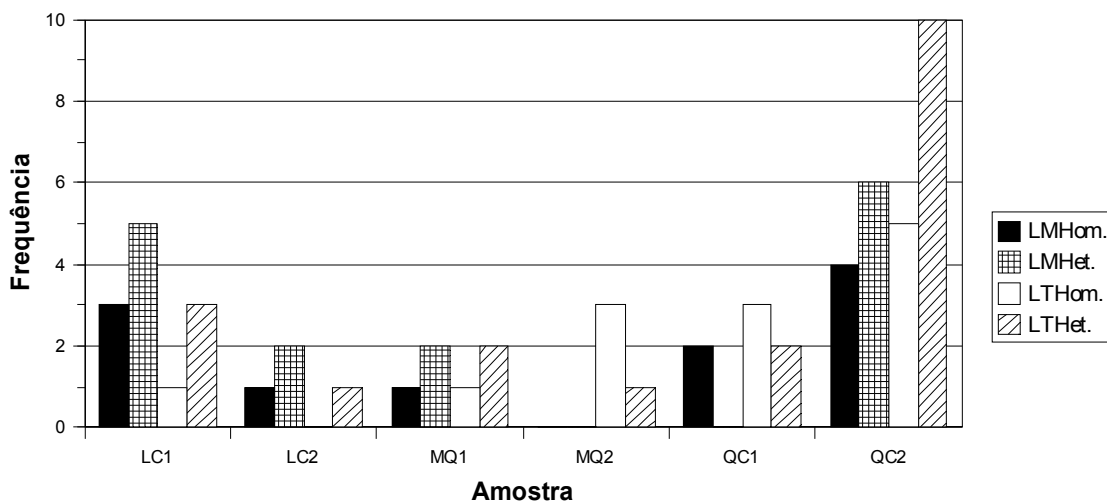
Dos 66 enterococos considerados atípicos, neste trabalho, 89,4% não cresceram à temperatura de 10°C. Os enterococos típicos apresentaram frequências superiores aos enterococos atípicos nas amostras da UP1, sendo o maior número deles detectado na amostra MQ1.

Os 58 isolados identificados como *Lactobacillus* foram agrupados ainda em lactobacilos mesofílicos e termofílicos, homofermentativos e heterofermentativos, de acordo com a temperatura de crescimento e capacidade de produzir CO<sub>2</sub> a partir da glucose. A classificação dos lactobacilos nos quatro grupos citados acima para as amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho pode ser observada na **Figura 5**.

Em relação à temperatura de crescimento, os lactobacilos mesofílicos predominaram nas amostras de leite, enquanto que os termofílicos prevaleceram nas amostras de queijo de Coalho. Este resultado enfatiza que a etapa de cozimento da massa, realizada durante o processamento do queijo de Coalho artesanal modifica a microbiota proveniente da matéria-prima, selecionando bactérias resistentes a temperaturas elevadas.

Os lactobacilos que só produzem ácido láctico (homofermentadores) e os que produzem, além de ácido láctico, outros ácidos orgânicos, CO<sub>2</sub>, álcool e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (heterofermentativos) foram encontrados em todas as amostras avaliadas, no entanto, os lactobacilos heterofermentativos dominaram a amostra QC2.





**Figura 5** – Classificação dos lactobacilos segundo a temperatura de crescimento e produção de gás para as amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho (LMHom. - Lactobacilos Mesofílicos Homofermentadores, LMHet. - Lactobacilos Mesofílicos Heterofermentadores, LTHom. - Lactobacilos Termofílicos Homofermentadores, LTHet. - Lactobacilos Termofílicos Heterofermentadores).

Conforme Beresford e Williams (2004), o gênero *Lactobacillus* foi subdividido em três grupos: homofermentadores obrigatórios, heterofermentadores facultativos e heterofermentadores obrigatórios. Os lactobacilos que são frequentemente recuperados de queijos são os heterofermentadores facultativos, pertencentes a microbiota secundária, sendo denominados *NSLAB*.

Há um grande número de trabalhos apresentados na literatura, que pesquisaram a população de lactobacilos da microbiota secundária, em queijos elaborados em países europeus como Ricotta Forte – queijo italiano (BARUZZI *et al.*, 2000), Cheddar (WILLIAMS; CHOI; BANKS, 2002), Noruegia – um tipo de queijo holandês (OSTLIE *et al.*, 2004) e Manchego – queijo espanhol (SÁNCHEZ *et al.*, 2006).

A identificação das espécies para os gêneros detectados nas amostras coletadas durante o processamento de queijo de Coalho artesanal, pode ser

observada na **Tabela 7**. Os 50 isolados selecionados para a identificação de espécie apresentaram capacidade de produzir ácido no leite tornassolado em até 18h, sendo 34% provenientes da amostra LC1; 14%, da LC2; 16%, da MQ1; 8%, da MQ2; 16%, da QC1 e 12% da amostra QC2.

**Tabela 7** – Espécies de BAL isoladas das amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal.

<b>Bactérias Ácido Lácticas</b>	<b>Nº Isolados</b>	<b>%<sup>a</sup></b>	<b>%<sup>b</sup></b>
<i>Enterococcus</i>	11	100,0	22,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	18,2	4,0
<i>Enterococcus faecium</i>	8	72,7	16,0
<i>Enterococcus durans</i>	1	9,1	2,0
<i>Lactococcus</i>	14	100,0	28,0
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	12	85,7	24,0
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	2	14,3	4,0
<i>Lactobacillus</i>	9	100,0	18,0
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	11,1	2,0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	3	33,3	6,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	44,4	8,0
<i>Lactobacillus paracasei subsp. paracasei</i>	1	11,1	2,0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	16	100,0	32,0
<b>Total</b>	<b>50</b>		<b>100,0</b>

<sup>a</sup> Percentagem de isolados identificados para cada gênero.

<sup>b</sup> Percentagem de identificados para o total de isolados.

As espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* que apresentaram maior frequência nas amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal foram *Enterococcus faecium* (72,7%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (85,7%) e *Lactobacillus plantarum* (44,4%).

Cavalcante (2005) também isolou as espécies *Lactococcus lactis* subsp.

*lactis*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* do leite cru do Vale do Jaguaribe, o qual é utilizado na produção do queijo de Coalho desta região.

Manopoulo e outros (2003), ao avaliarem as populações microbianas durante a produção de queijo Feta, em três unidades produtoras diferentes, relataram resultados semelhantes aos obtidos para *Enterococcus faecium* neste trabalho. O *E. faecium* é a espécie mais comum do gênero *Enterococcus* encontrada no trato intestinal dos bovinos (GELSOMINO *et al.*, 2001).

Resultados semelhantes aos observados para o lactobacilos heterofermentativo facultativo, *Lactobacillus plantarum*, são relatados na literatura. Zárate e outros (1997) detectaram maior quantidade desta espécie (56,9%) dentre os 54 lactobacilos identificados no queijo de leite de cabra Tenerife. Pérez Elortondo e outros (1998) também detectaram alta frequência de *L. plantarum* (30,4% de 43 lactobacilos) no leite de ovelha e no queijo Idiazábal, produzido a partir desta matéria-prima. Albenzio e outros (2001) observaram uma grande diversidade de cepas de *L. plantarum* no queijo Canestrato Pugliese.

A espécie *Lactobacillus crispatus* não parece ser comumente encontrada em produtos lácteos. Contudo, estudos estão sendo conduzidos com o intuito de usar este microrganismo como probiótico. O trabalho desenvolvido por Chen e outros (2007) indicou que o *L. crispatus* ZJ001, isolado do intestino de porcos, apresentou potencial como probiótico pela sua tolerância a ácido e sais biliares, alta capacidade de adesão e competição exclusiva contra *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium*.

O *Streptococcus thermophilus* foi a espécie predominante (32,0%) para o total de isolados identificados. Esta é a única espécie do gênero *Streptococcus* que permanece viável ao tratamento térmico de 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995). A confirmação deste resultado necessita, contudo, de uma avaliação molecular.

Este resultado corrobora os encontrados por Marino, Maifreni e Rondinini (2003), que acompanharam as mudanças ocorridas na microbiota do queijo artesanal italiano Montasio, desde a matéria-prima até o final da cura. O *S. thermophilus* foi encontrado em quantidade razoável no leite cru, sendo a espécie de maior frequência após 30 e 60 dias de cura.

Um estudo desenvolvido por Manopoulo e outros (2003), relatou algumas das mesmas espécies verificadas neste trabalho, porém em percentagens diferentes. Das 146 BAL isoladas de queijo Feta por estes pesquisadores, 39,7% foram identificadas como *S. thermophilus*; 15,7%, como *E. faecium* e 19,9%, como *L. plantarum*.

#### **4. Conclusões**

A identificação da microbiota láctica presente em amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal produzido em duas unidades produtoras de Jaguaribe, Ceará, foi realizada como parte deste trabalho para acompanhar a evolução microbiana de BAL, durante o processamento deste queijo.

A evolução do grupo de BAL durante o processamento do queijo de Coalho artesanal foi similar para os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*, diferindo para os *Lactobacillus* e *Streptococcus* nas duas unidades produtoras onde o queijo foi elaborado.

A diversidade de BAL presente nas amostras de leite cru foi diferente da verificada nas amostras de queijo de Coalho artesanal. Todos os gêneros identificados neste trabalho foram detectados nas amostras de leite, no entanto o *Lactococcus* não foi encontrado nas amostras de queijo.

A predominância de *Lactococcus* e lactobacilos mesofílicos nas amostras de leite e de *Enterococcus* (típicos e atípicos), *Streptococcus* e lactobacilos

termofílicos nas amostras de queijo indica que, durante o processamento do queijo de Coalho artesanal ocorreu uma seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, devido à etapa de cozimento da massa.

A identificação do gênero *Enterococcus* deve ser conduzida de forma cuidadosa, devido a presença de isolados atípicos que podem apresentar resultados diferentes dos citados na literatura para alguns testes.

A presença crescente de *Enterococcus* nas amostras examinadas durante o processamento do queijo de Coalho artesanal indica a transferência e multiplicação destes microrganismos da matéria-prima para o queijo. Boas práticas de fabricação devem ser efetuadas desde a obtenção do leite até o produto final, para que se alcance um produto com boa qualidade sanitária. No entanto, os resultados sugerem que os enterococos fazem parte da microbiota natural deste queijo e devem ter uma contribuição significativa nas características do mesmo.

## 5. Referências Bibliográficas

ALBENZIO, M.; CORBO, M. R.; REHMAN, S. U.; FOX, P. F.; DE ANGELIS, CORSETTI, A.; SERVI, A.; GOBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canastrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 35-48, Jul., 2001.

BARUZZI, F.; MOREA, M.; MATARANTE A.; COCCONCELLI, P. S. Changes in the Lactobacillus community during Ricotta forte cheese natural fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 807-814, Nov., 2000.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11,

n.4-7, p. 259-274, Jul., 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V.1, General Aspects, p. 287-317.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 201-209, Apr., 2003.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ago., 2005

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo Coalho com segurança alimentar**. 2005. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CHEN, X.; XU, J.; SHUAI, J.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; FANG, W. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, 2007. Artigo "In Press, corrected proof", disponível "online" em janeiro de 2007.

CITTI, J. E.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. Comparison of slow and fast acid producing *Streptococcus lactis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 48, n. 1, p. 14-18, Jan., 1965.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.;

COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v.18, n. 1, p. 25-33, Feb. 2001.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, Jan., 2006.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Test for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap. 8, p.271-286.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J.; COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2-3, p. 177-188, Dec., 2001.

GIBSON, T.; ABDEL-MALEK, Y. The formation of carbon dioxide by acid lactic bacteria and *Bacillus licheniformis* and a cultural method of the detecting the process. **Journal of Dairy Research**, v. 14, p. 35-44, 1945.

- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 732-738, 1997.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, V. 26, n. 2, p. 163-171, May, 2002.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec., 2003.
- GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, Dec, 1997.
- HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 19, p. 201-207.
- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The Genus Streptococcus. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995. V.2.
- HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.
- LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.
- MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2 , p. 233-240, Apr. 2004. Short Communication.



MANOPOULO, E.; SARANTIPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULO, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 153-161, Apr., 2003.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, Dec., 2003.

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A. LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e Manteiga da Terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n. 89, p. 28-36, out., 2001.

OSTLIE, H. M.; ELIASSEN, L.; FLORVAAG, A.; SKEIE, S. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Norvegia cheese during ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 287–299, Aug., 2004.

PARENTE, E.; COGAN, T. M. Starter Cultures: General Aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 123-147.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. Jun./Sep., 2005. The fourth IDF Symposium on cheese: ripening characterization and technology.

PÉREZ ELORTONDO, F. J.; ALDÁMIZ ECHOBARRIA, P.; ALBISU, M.; BARCINA, Y. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazabal ewe's milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 8, p. 725-732, Aug., 1998.

PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULO-TEZANITAKI, E. Microbiological

characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 575-582, Oct., 2003.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPPÀ, F.; COCCONCELLI, P. S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 141-151, Apr., 2004.

SÁNCHEZ, I.; SESEÑA, S.; POVEDA, J. M.; CABEZAS, L.; PALOP, L. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 265-273, Apr., 2006.

SKEIE, S.; ARDÖ, Y. Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese. **Lebensm.-Wiss. u. Technol.**, v. 33, p. 499-505, 2000.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. General characterization. In: GERHARDT, P. **Manual of Methods for General Bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981.

WILLIAMS, A. G.; CHOI, S.-C.; BANKS, J. M. Variability of the species and strain phenotype composition the non-starter acid lactic bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. **Food Research International**, v.35, n. 5, p. 483-493, 2002.

ZAMFIR, M.; VANCANNEYT, M.; MAKRAS, L.; VANINGELGEM, F.; LEFBVRE, K.; POT, B.; SWINGS, J.; DE VUYST, L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 487-495, Sep., 2006.

ZÁRATE, V.; BELDA, F.; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v.7, n.10, p. 635-641, Oct., 1997.

## CAPÍTULO IV

### PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NO CEARÁ

#### Resumo

Um total de 235 bactérias ácido lácticas (35 *Lactococcus*, 92 *Lactobacillus*, 44 *Streptococcus* e 64 *Enterococcus*), isoladas de amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará, foi avaliado pela capacidade de produzir ácido em 6 e 24h. Após esta avaliação, os isolados que não reduziram o pH do leite para baixo de 6,0, até 24h e aqueles que apresentaram características indesejáveis para o coágulo formado foram descartados. A partir daí, 25 *Lactococcus*, 27 *Streptococcus* e 42 *Lactobacillus* foram selecionados para avaliação das propriedades tecnológicas de atividade proteolítica, produção de aroma, tolerância ao sal e produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp. Os *Enterococcus* foram testados quanto a sua patogenicidade, sendo os não patogênicos (37) submetidos à avaliação da capacidade de produzir compostos antimicrobianos contra *Listeria* spp. Os resultados obtidos revelaram que o gênero *Lactococcus* (35) apresentou a maior percentagem (17,1%) de produtores rápidos de ácido; os *Lactobacillus* exibiram maior variabilidade e extensão proteolítica, além de maior produção de aroma. As 94 culturas lácticas analisadas mostraram boa tolerância ao sal, sendo que 98 e 87% delas suportaram, respectivamente, 3 e 4% de NaCl. Das 131 culturas avaliadas para atividade antagonista, 10% foram produtoras de bacteriocinas. As espécies das 13 culturas bacteriocinogênicas foram identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1), *Lactobacillus brevis* (1), *Lactobacillus crispatus* (2), *Streptococcus thermophilus* (2), *Enterococcus faecalis* (1) e sete como *Enterococcus faecium* (7).

## 1. Introdução

O queijo de Coalho é a variedade de queijo artesanal mais popular e difundida no Nordeste brasileiro. Ele apresenta sabor e aroma levemente ácidos e uma textura firme e borrachenta, que promove o ranger nos dentes quando o queijo é mastigado. Sua produção é realizada a partir de leite cru, através de coagulação enzimática, sem adição de fermento láctico.

As bactérias ácido lácticas (BAL) presentes na matéria-prima utilizada na produção do queijo de Coalho artesanal, provavelmente, estão associadas ao desenvolvimento de características próprias deste queijo. No entanto, a legislação brasileira, com o intuito de garantir a segurança dos consumidores, estabelece que o leite usado na produção de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (MAARA, 1996), pois o leite cru é uma das principais fontes de microrganismos patogênicos nestes tipos de queijos.

A pasteurização do leite, por sua vez, além de eliminar os microrganismos indesejáveis, também reduz grande parte da microbiota láctica do leite, influenciando negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN; BEUVIER, 1997)

A perda de características sensoriais em queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, pode ser amenizada pela adição de fermento láctico, logo após a etapa de pasteurização. Contudo, o uso de fermentos lácticos comerciais não consegue recuperar as características individuais e específicas do queijo elaborado com leite cru, acabando por promover uma padronização cega neste produto.

A seleção de um fermento láctico para a produção de queijos pode ser realizada através da avaliação de propriedades tecnológicas de BAL como produção de ácido láctico, produção de sabor e aroma desejáveis durante a cura, tolerância ao sal, produção de bacteriocinas, sensibilidade ao aquecimento,

resistência a bacteriófagos e outras (AYAD *et al.*, 2004; FOX *et al.*, 2000; HASSAN; FRANK, 2001).

Deste modo, a pesquisa das propriedades tecnológicas de BAL selvagens, isoladas de queijos produzidos com leite cru, pode auxiliar no desenvolvimento de novos fermentos lácticos, capazes de restaurar a diversidade de características de muitas variedades de queijos.

Um bom fermento láctico deve promover a acidificação rápida do leite, durante o processo fermentativo, e assim garantir a segurança do produto (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Não obstante, a capacidade de certos microrganismos produzirem substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, também tem sido estudada (AMMOR *et al.*, 2006; CARRASCO; SCARINCI; SIMONETTA, 2002; GONZÁLEZ *et al.*, 2007; HECHARD *et al.*, 1990; HERREROS *et al.*, 2005).

Dentre os patógenos veiculados por queijos, *Listeria monocytogenes* adquiriu importância devido aos diversos surtos ocorridos, inclusive com vítimas fatais. Este microrganismo apresenta capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e alta concentração de sal, constituindo uma grande ameaça à saúde pública (BAEK *et al.*, 2000). Desta forma, a busca de bacteriocinas efetivas contra *L. monocytogenes* se tornou um alvo a ser atingido (GIRAFFA, 1995; MURIANA, 1996; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

As bacteriocinas são promissoras para uso como conservantes biológicos, pois além de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, podem ser utilizadas em combinação com o tratamento térmico, uma vez que muitas apresentam estabilidade ao aquecimento. Também são biodegradáveis, destruídas por enzimas digestivas, seguras à saúde e ativas em baixa concentração (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

Neste contexto, foi realizado um extenso trabalho de pesquisa com as BAL

isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará, visando determinar suas propriedades tecnológicas quanto à capacidade de acidificação, atividade proteolítica, produção de aroma, tolerância ao NaCl e produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp. A avaliação destas propriedades permitirá a seleção de espécies de BAL para serem utilizadas na produção do queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Origem e critérios de seleção das culturas lácticas**

Um total de 912 BAL selvagens isoladas de amostras de leite cru (2), de massa do queijo (2) e de queijo de Coalho artesanal (14) produzido no estado do Ceará, pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, foram selecionadas de acordo com sua capacidade de coagular, reduzir e acidificar o meio *Litmus Milk* (BBL) em até 48h. Deste total, 235 culturas lácticas que conseguiram formar um coágulo liso e firme (35 *Lactococcus*, 92 *Lactobacillus*, 44 *Streptococcus* e 64 *Enterococcus*), foram submetidas aos testes de avaliação das propriedades tecnológicas.

### **2.2. Condições de manutenção e crescimento das culturas lácticas**

Os isolados foram mantidos congelados a -18°C, até o momento da avaliação das propriedades tecnológicas. Para o congelamento, uma quantidade de 10% das culturas lácticas, crescidas por 24h, foi inoculada em meio *Litmus Milk*, sem prévia incubação (DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001).

Após descongelados, os microrganismos selecionados foram ativados em caldo MRS (Acumedia) por 24h, nas temperaturas de 30°C (mesofílicos) ou de 42°C (termofílicos). Na sequência da ativação, as BAL foram transferidas para o

meio LDR – Leite Desnatado Reconstituído – a 10%, suplementado com 0,3% de extrato de levedura (BD) e 0,2% de glucose (Vetec), e incubados nas mesmas condições citadas acima (DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001).

Durante os testes para avaliação das propriedades tecnológicas, uma alíquota de 1% das culturas lácticas foi inoculada em 5ml de LDR (10%) e mantida a 4°C (COWMAN; SPECK, 1962). Antes de cada teste, os microrganismos foram ativados novamente, no mesmo meio, e incubados por 24h, nas temperaturas de 30 ou 42°C.

### **2.3. Avaliação das propriedades tecnológicas**

As culturas lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* foram submetidas à avaliação das propriedades tecnológicas de capacidade de acidificação, capacidade proteolítica, capacidade de formação de aroma, de tolerância ao sal e de produção de compostos antibacterianos e bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp. Os microrganismos do gênero *Enterococcus* foram testados quanto a sua patogenicidade e sua capacidade de produzir compostos antibacterianos e bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp.

#### **2.3.1. Avaliação da capacidade de acidificação**

Uma quantidade de 1% das culturas ativadas foi inoculada em 200ml de LDR (10%), tratado termicamente a 121°C/ 5 minutos e incubados a 30°C ou 42°C, de acordo com sua característica de crescimento. Para cada cultura, alíquotas de 30ml do meio LDR foram retiradas, em triplicata, no início e após os tempos de incubação de 6 e 24h, para avaliação da capacidade de acidificação (ESTEPAR *et al.*, 1999).

A habilidade das culturas lácticas de produzirem ácido foi mensurada através

do pH e da acidez titulável. A determinação de pH foi realizada em potenciômetro (Digimed, DM20), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. A acidez das amostras de queijo foi determinada pelo método titulométrico com solução de hidróxido de sódio 0,1N (Vetec), seguindo a metodologia AOAC 947.05 (AOAC, 1997).

O controle do experimento foi feito pela incubação de 200 ml do meio sem inóculo ou através da inoculação do meio com cepas de referência, pertencentes às coleções de culturas da *American Type Culture Collection* – ATCC e da *Nacional Collection of Dairy Organisms* – NCDO (**Tabela 1**).

**Tabela 1** – Cepas de referência utilizadas na avaliação de atividade acidificante.

<b>Cepas de referência</b>	<b>Fonte</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	NCDO 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8914
<i>Streptococcus thermophilus</i>	NCDO 1968

### 2.3.2. Avaliação da capacidade proteolítica

A atividade proteolítica foi mensurada pela liberação de tirosina a partir da hidrólise da caseína, de acordo com o método de Hüll (HÜLL, 1947; CITTI; SANDINE; ELLIKER, 1963), modificado. Alíquotas de 1% das culturas previamente ativadas em caldo MRS foram transferidas para meio LDR (10%) pasteurizado (63°C/ 30 minutos) e incubadas a 30 ou 42°C.

Decorrido o período de crescimento de cada isolado (16 – 48h), 3ml das culturas foram retiradas e misturadas a 3ml de água destilada e 10ml de ácido tricloroacético 0,72N (Vetec). Esta mistura foi homogeneizada durante 5 minutos e, após um repouso de 15 minutos, foi filtrada em papel Whatman n° 1. Do filtrado, foi retirada uma alíquota de 2ml, a qual foi adicionado 4ml de uma solução



composta de carbonato de sódio 15% (Qeel) e pirofosfato de sódio 2% (Vetec), aquecida a 40°C; e 1,2ml do reagente fenol Folin-Ciocalteau (Vetec).

A reação da tirosina com o reagente fenol produziu uma coloração azulada, para a qual a densidade ótica foi mensurada a 650nm, em espectrofotômetro (Varian, CARY 50). A calibração do espectrofotômetro foi realizada através de curva com concentrações entre 0,02 – 0,2mg de tirosina (Vetec). O branco foi realizado, utilizando filtrado de meio LDR pasteurizado sem inóculo. A atividade proteolítica foi expressa em µg de tirosina por ml de amostra por hora.

### 2.3.3. Avaliação da capacidade de formação de aroma e de tolerância ao NaCl

A avaliação da capacidade de produção de aroma foi realizada em tubo de ensaio contendo 2,5ml da cultura previamente ativada, 2,5ml de solução de NaOH 10N e 1ml de solução de creatina 1% (Sigma). Após agitação do tubo por 20 minutos, o aparecimento de coloração rósea indicou a presença de diacetil e acetil metil carbinol (FURTADO, 1990), compostos responsáveis pelo aroma em certos tipos de queijos. A produção de aroma foi classificada como forte, moderada, fraca ou ausente, de acordo com intensidade da coloração desenvolvida.

A tolerância das culturas lácticas ao cloreto de sódio foi avaliada com base no crescimento das mesmas em caldo APT, com concentrações de 3,0 e 4,0 % de NaCl (Vetec), incubados a 30 ou 42°C, por 24h.

### 2.3.4. Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de *Enterococcus*

O potencial patogênico das culturas de *Enterococcus*, previamente ativadas, foi avaliado pelos testes de atividade de hemolisinas e de termonucleases, e de produção de gelatinase (BROLAZO, 2003).

Para avaliação da atividade de hemolisinas, as culturas foram estriadas na

superfície de ágar BHI (Biobrás), suplementado com 5m% de hemácias de carneiro desfibrinadas e incubadas a 37°C por 48h. A atividade das hemolisinas foi verificada pela formação de halos de hemólise ao redor das estrias.

Para avaliação da atividade de termonucleases, foram feitos poços, com o auxílio de pipeta *Pasteur*, em ágar Bacto-DNAse (Acumedia) suplementado com 0,83 de solução de azul de toluidina (1%). Cada poço foi inoculado com 50µl de cultura, previamente submetida ao tratamento térmico de 100°C/ 15 minutos em banho-maria (Marconi, MA 159) e incubados a 37°C/ 24h. A atividade da termonuclease foi visualizada através de zonas de coloração rosa ao redor dos poços.

Para a avaliação de produção de gelatinase, as culturas foram inoculadas em tubos contendo ágar nutriente gelatina e incubadas a 21°C/ 7dias. A liquefação do meio indica reação positiva para gelatinase.

#### 2.3.5. Avaliação de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp.

##### *Culturas indicadoras e culturas testes*

A ativação da cultura do microrganismo indicador foi realizada através de duas repicagens consecutivas. Primeiramente, as cepas de *Listeria* foram inoculadas em 5ml de caldo TSB (Dfico), suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE). Após a incubação a 35°C/ 24h, uma alça destas culturas foi transferida para 10 ml de caldo TSB-YE, e incubada por mais 18h à mesma temperatura.

As culturas indicadoras utilizadas para avaliação de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas pelas BAL foram três cepas de *L. monocytogenes* (Scott A, C1 – 027 e C1 – 030) e uma de *L. innocua* ATCC 33090. As cepas de *L.*

*monocytogenes* C1 – 027 e C1 – 030 foram isoladas de uma amostra de queijo de Coalho artesanal e pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Legislação do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP.

As culturas testes foram BAL selecionadas através das propriedades tecnológicas analisadas anteriormente e ativadas por meio de duas repicagens consecutivas. Na primeira repicagem, uma alíquota de 50µl de cada cultura lática foi inoculada em 5ml de caldo MRS e incubada a temperatura adequada por 24h. Na segunda repicagem, um volume de 200µl de cada cultura, crescida por 24h, foi transferido para 20ml de caldo MRS e incubado nas mesmas condições da repicagem anterior.

#### *Avaliação de atividade antagonista*

A atividade antagonista das culturas testes, sobre as cepas de *Listeria* ssp. foi avaliada pela técnica de difusão em ágar, com modificações dos métodos de Benkerroum e outros (1993) e de Tagg e McGiven (1971). Alíquotas de 200µl das culturas indicadoras foram inoculadas, em profundidade, em 20ml de caldo TSB-YE com 0,9% de ágar. Após solidificação do meio, foram feitos poços de 5mm de diâmetro, com auxílio de pipetas *Pasteur* estéreis. Uma quantidade de 50µl de cada cultura teste foi inoculada, em duplicata, nestes poços. As placas foram mantidas a 4°C por duas horas para permitir a difusão das culturas testes no ágar e depois incubadas a 35°C/ 24h (COGAN *et al.*, 1997). A presença de zonas claras de inibição representaram a atividade antagonista das culturas testes contra *Listeria* ssp.

#### *Avaliação da produção de bacteriocinas*

As culturas de BAL que apresentaram atividade antagonista contra *Listeria* ssp. foram testadas para produção de bacteriocinas. Após a sua ativação, 20ml de cada cultura foram centrifugados a 7.500g/ 10 minutos/ 4°C (MORENO *et al.*,

2000), em centrífuga Biofuge Stratos (Heraeus Instruments).

Os sobrenadantes foram neutralizados a pH 6,5 com uma solução de NaOH 2,5N (GONZÁLEZ *et al.*, 2007). O ajuste do pH foi realizado com fita indicadora (Macherey-Nagel), com a finalidade de inibir a ação antagonista resultante da produção de ácido. Em seguida, os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membranas de acetato de celulose Millex GV (0,22µm).

Alíquotas de 1ml dos sobrenadantes neutralizados e esterelizados foram tomadas e adicionadas de 1ml de solução de catalase 0,1mg/ ml (C 9322 – Sigma), a fim de obter uma concentração final 100 – 250U de catalase por ml (GONZÁLEZ *et al.*, 2007). A catalase inibe a possível ação antagonista promovida pelo peróxido de hidrogênio.

As placas contendo as cepas de *Listeria* ssp. foram preparadas como descrito anteriormente, com pequenos poços, nos quais 50µl das soluções testes foram inoculados. Depois de mantidas a 4°C/ 2h, as placas foram incubadas a 35°C/ 24h. A produção de bacteriocinas foi confirmada pela presença de halo de inibição formado em torno do poço contendo a BAL.

#### **2.4. Pesquisa de *Listeria* sp.**

A presença de *Listeria* sp. foi determinada de acordo com o método preconizado por Pagotto e outros (2001) para 14 amostras de queijo de Coalho artesanal produzidas no Ceará, utilizadas para isolamento das BAL.

#### **2.5. Análise estatística**

Os resultados das análises para a capacidade de acidificação e proteolítica das culturas receberam tratamento estatístico através do teste de Análise de Variância – ANOVA – para determinação de significância estatística dos

resultados. As médias obtidas para as culturas lácticas testadas foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas citadas foram realizadas com o auxílio do *software* livre R, versão 2.4.0 (R DEVELOPMENT, 2006).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Avaliação das propriedades tecnológicas

##### 3.1.1. Avaliação da capacidade de acidificação

A capacidade de acidificação das culturas selecionadas, dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, avaliada através do pH mensurado após 6 e 24h de incubação, pode ser observada na **Tabela 2** e na **Figura A1** do **Apêndice A**.

**Tabela 2** – Culturas lácticas que reduziram o pH do leite de 6,5 para 5,3 após 6h ou para 4,6 após 24h de incubação à temperatura de 30 ou 42°C.

Gêneros	Nº isolados avaliados	Nº isolados que reduziram o pH para			
		≤ 5,3	%	≤ 4,6	%
<i>Lactococcus</i>	35	6	17,1	12	34,3
<i>Lactobacillus</i>	92	3	3,3	4	4,3
<i>Streptococcus</i>	44	6	13,6	20	45,5
Total	171	15	8,8	36	21,1

Para uma cultura láctica ser considerada produtora rápida de ácido, ela deve reduzir o pH do leite do seu valor normal (6,6) para 5,3 em 6h de incubação à temperatura adequada (COGAN et al. 1997). Esta característica pode ser atribuída a uma BAL iniciadora (BERESFORD, 2001). Após 24h de incubação, o valor de

pH do ponto isoelétrico da caseína (4,6) foi utilizado como base para a determinação da capacidade de produção de ácido.

Das 171 culturas avaliadas, somente 8,8% foram consideradas produtoras rápidas de ácido. Após 24 h, 21,1% destas cultas alcançaram o pH de 4,6, promovendo a coagulação do leite.

A maior percentagem (17,1%) de microorganismos considerados acidificantes rápidos foi encontrada dentre os *Lactococcus*. No entanto, as demais culturas de *Lactococcus* foram produtoras lentas de ácido (77,2%) ou reduziram pouco o pH do leite (5,7%) em 24 h (**Figura A1** do **Apêndice A**). Tais resultados corroboram os relatados por Cogan e outros (1997), os quais verificaram que microorganismos provenientes de queijos artesanais europeus apresentaram baixa produção de ácido. Durlu-Ozkaya e outros (2001) observaram que nenhuma das cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isoladas do queijo Beyaz, foi considerada rápida na produção de ácido.

A percentagem de acidificantes rápidos obtida neste trabalho para os *Lactococcus* (17,1%), foi maior do que a relatada (2%) por Ayad e outros (2004). Segundo estes pesquisadores, os lactococos selvagens possuem uma menor capacidade de produção de ácido.

Em contrapartida, Ballesteros e outros (2006) verificaram que os *Lactococcus* foram os microorganismos com maior capacidade de acidificação dentre os isolados do queijo Manchego. Medina e outros (2001) isolaram uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* capaz de baixar o pH do leite para 3,95 após 16h de incubação.

A maior parte dos *Lactobacillus* avaliados apresentou fraca capacidade de acidificação (**Tabela 2**). Embora após 24h, somente 4,3% tenham sido capazes de reduzir o pH do leite para 4,6 ou menos, 37 (40%) destes isolados produziram ácido na faixa de pH de 5,1 – 5,5 (**Figura A1** do **Apêndice A**).

Apesar de Cogan e outros (1997) terem encontrado 32% de *Lactobacillus* acidificantes rápidos em uma população de 401 isolados, 29, 4% das 17 culturas de *Lactobacillus* isoladas por Durlu-Ozkaya e outros (2001) não alteraram o pH do leite após 6h. Após 24h, 82,3% destas culturas baixaram o pH para a faixa de 5,0 – 5,5. Os lactobacilos toleram bem ambientes ácidos, no entanto estes microrganismos iniciam seu crescimento após as culturas iniciadoras baixarem o pH do meio por volta 5,5 (HASSAN; FRANK, 2001).

Das 44 culturas de *Streptococcus* avaliadas, somente seis (13,6%) foram acidificantes rápidas (**Tabela 2**). No entanto, dentre os 15 isolados que reduziram o pH para 5,3, *Streptococcus* e *Lactococcus* predominaram com 40% cada. Esse resultado difere do relatado por Cogan e outros (1997), que encontraram 53,0% de produtores rápidos dentre 528 *S. thermophilus* isolados de produtos lácteos.

A habilidade de produzir ácido pelos diferentes gêneros de BAL não é uma característica estável. Ela pode apresentar variações de acordo com diversos fatores, como gênero e espécie da cultura, ecossistema de origem do isolado, tratamento térmico do leite, temperatura e tempo de incubação, presença de antibióticos ou bacteriófagos, etc. De acordo com Durlu-Ozkaya e outros (2001), dentro de um mesmo gênero pode haver cepas com diferentes comportamentos quanto a esta característica.

Para avaliação da capacidade de produção de ácido das culturas lácticas através do teste de acidez titulável, foram relacionados os valores médios correspondentes ao pH alcançado por um microrganismo considerado acidificante rápido (5,3) e para o ponto isoelétrico da caseína (4,6). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, 0,5% de ácido láctico produzido pelas culturas lácticas foi equivalente a um valor de pH, aproximadamente de 5,3 e 0,8% de ácido láctico a um de 4,6.

A capacidade de acidificação das culturas lácticas analisada através da acidez titulável é apresentada na **Tabela 3**. Confirmando os resultados verificados

na avaliação do pH, somente 8,8% foi capaz de produzir 0,5% de ácido láctico em 6h.

Este resultado foi similar ao encontrado por Reinheimer e outros (1997), que verificaram uma produção de ácido láctico na faixa de 0,4 a 0,7%, em 24h, por culturas isoladas de fermento produzido a partir de leite. Badis e outros (2004) também verificaram que *Streptococcus* e *Lactobacillus* isolados de leite de cabra produziram acidez entre 0,6 e 0,8%, após 12h de incubação.

**Tabela 3** – Culturas lácticas que reduziram a acidez do leite de 0,2% para 0,5% após 6h ou para 0,8% após 24h de incubação às temperaturas de 30 ou 42°C.

Gêneros	Nº isolados avaliados	Nº isolados que reduziram acidez para			
		≈ 0,5 %	%	≈ 0,8 %	%
<i>Lactococcus</i>	35	8	23,5	12	35,3
<i>Lactobacillus</i>	92	3	3,2	5	5,4
<i>Streptococcus</i>	44	4	9,1	22	50,0
Total	171	15	8,8	39	22,8

O pequeno número de culturas com capacidade de acidificação rápida pode ser explicada pelas próprias características físico-químicas (pH elevado e baixa acidez), do queijo de Coalho artesanal, de onde elas foram isoladas (**Capítulo 2**).

A habilidade de produzir ácido rapidamente auxilia na atividade do coagulante, na expulsão do soro da coalhada e na segurança de queijos, por prevenir o crescimento de patógenos (DURLU-OZKAYA, *et al.* 2001; FOX *et al.* 2000). No entanto, esta característica também contribui para a modificação da textura e definição do sabor do queijo.

Para a fabricação de queijo de Coalho, culturas lácticas que produzam



quantidade moderada de ácido láctico, de modo a proporcionar sabor levemente ácido, sem alterar a textura borrachenta do produto são desejáveis. O papel da textura nas características do queijo de Coalho é discutido junto aos resultados de avaliação da capacidade proteolítica.

### 3.1.2. Avaliação da capacidade proteolítica

Para a avaliação da capacidade proteolítica foi realizada uma nova seleção de microrganismos, na qual foram eliminados todos os isolados que não reduziram o pH do leite para abaixo de 6,0, em até 24h. As bactérias que apresentaram características indesejáveis ao coágulo formado, tais como textura pouco firme e aroma desagradável também foram excluídas. Desta forma, foram selecionados 25 *Lactococcus*, 27 *Streptococcus* e 42 *Lactobacillus*, perfazendo um total de 94 microrganismos para avaliação da atividade proteolítica (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Seleção de culturas lácticas em relação a redução de pH ou características organolépticas indesejáveis à produção de queijo.

BAL	Nº Inicial	Isolados eliminados por apresentar		Nº isolados Selecionados
		pH > 6,0	C.O. indesejáveis	
<i>Lactococcus</i>	35	2	8	25
<i>Lactobacillus</i>	92	29	21	42
<i>Streptococcus</i>	44	8	9	27
Total	171	39	38	94

C.O. - Característica Organolépticas.

A atividade proteolítica das 94 culturas selecionadas foi mensurada pela formação de tirosina a partir da hidrólise da caseína (**Figura 1**). Quanto maior a concentração de tirosina, maior a capacidade proteolítica do microrganismo.

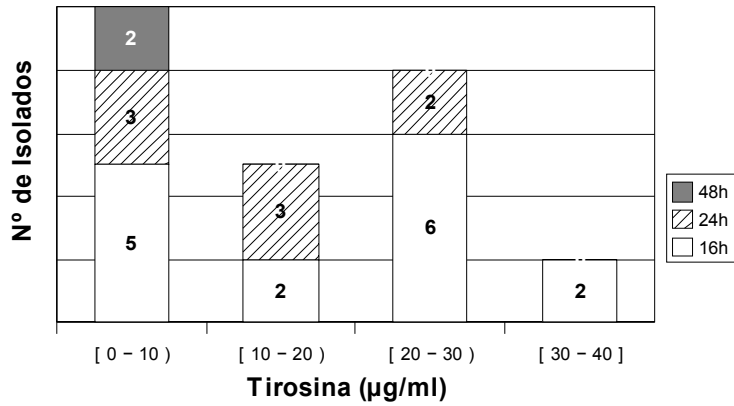
Aproximadamente 71% dos 94 isolados inoculados em LDR foram pouco proteolíticos, com baixa produção de tirosina (até  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), independentemente dos tempos de crescimento.

A atividade proteolítica máxima detectada para as 25 culturas de *Lactococcus* foi de  $39,4\mu\text{g}$  de tirosina por ml. No entanto, mais da metade delas (60%) produziram até  $20\mu\text{g}$  de tirosina por ml (**Figura 1 a**). Os *Streptococcus* foram os isolados menos proteolíticos, atingindo a concentração máxima de  $17,6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tirosina em 16 ou 48h (**Figura 1 c**).

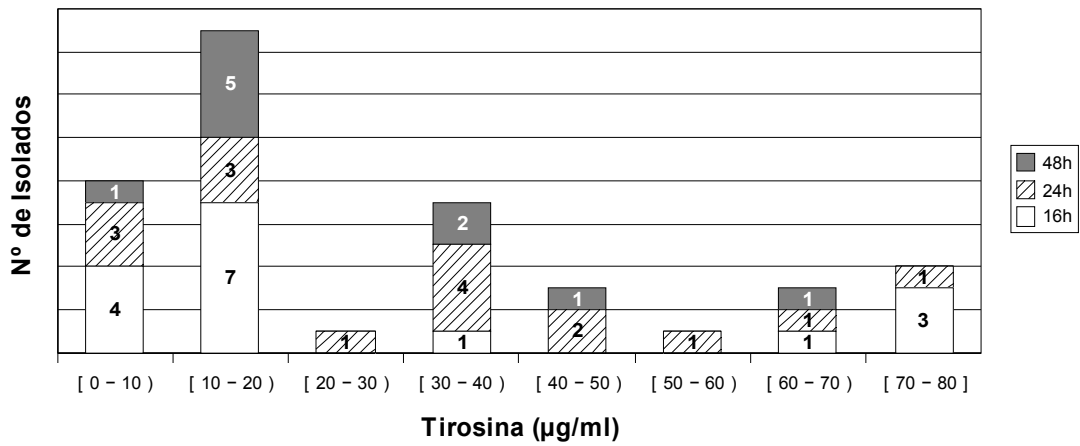
Os microrganismos do gênero *Lactobacillus* proporcionaram maior variabilidade e extensão na hidrólise da caseína. Dos 42 isolados avaliados, 54,8% exibiram fraca proteólise (até  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tirosina) e 16,7% deles alcançaram concentração entre 60 –  $80\mu\text{g}$  de tirosina por ml de leite por tempo de crescimento (**Figura 1 b**). Resultados similares foram relatados por Quiberoni e outros (1998), nos quais 56% dos 25 *Lactobacillus helveticus* analisados produziram até  $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tirosina em 24 horas.

A atividade proteolítica das culturas lácticas avaliadas neste trabalho foi superior à proteólise máxima ( $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  em 72h), observada por Badis e outros (2004) para *Lactobacillus helveticus*, ao avaliarem as propriedades tecnológicas de BAL pertencentes a 5 diferentes gêneros. Este valor foi considerado bastante baixo pelos referidos autores.

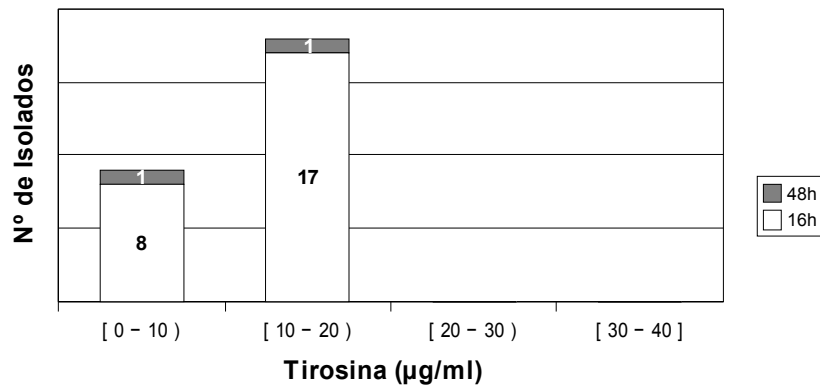
(a) *Lactococcus*



(b) *Lactobacillus*



(c) *Streptococcus*



**Figura 1** – Atividade proteolítica das culturas lácticas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, no período de 16 a 48h (Nº de isolados estão nas barras).

Por outro lado, a concentração de tirosina encontrada no leite inoculado com as culturas avaliadas neste trabalho, foi bastante baixa quando comparada com a faixa média de 154 – 191 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de tirosina produzida em 24h, observada por Reinheimer e outros (1995) durante a caracterização de culturas soro. Diferentes concentrações de tirosina são alcançadas porque a atividade proteolítica de um microrganismo é influenciada pelo tempo de incubação, capacidade fisiológica de crescimento de cada espécie, origem e tipo de cultura.

A proteólise é responsável pelo desenvolvimento de muitas características organolépticas nos queijos, principalmente nos curados. Um dos papéis mais importantes da proteólise está na produção de compostos voláteis, que contribuem para o sabor e aroma dos queijos (McSWEENEY, 2004).

O uso de microrganismos muito proteolíticos não é recomendado para produção de queijos consumidos ainda frescos, como ocorre com o queijo de Coalho, uma vez que a proteólise pode levar ao desenvolvimento de sabor amargo e ao amolecimento da textura.

O desenvolvimento destas características sensoriais são indesejáveis no queijo de Coalho, sobretudo, o amolecimento da textura, pois este queijo é muito consumido na forma assado e não deve derreter quando colocado sobre uma chapa aquecida. Os resultados obtidos para capacidade proteolítica mostram que as culturas avaliadas podem ser utilizadas na elaboração de um fermento láctico para a fabricação de queijo de Coalho.

### 3.1.3. Análise estatística para avaliação da capacidade de acidificação e proteolítica

A ANOVA determinou que os resultados obtidos para o pH, a acidez titulável e a concentração de tirosina foram estatisticamente significativos para um nível de confiança de 95%. As médias encontradas para acidificação e

capacidade proteolítica de 25 *Lactococcus*, 42 *Lactobacillus* e 27 *Streptococcus* foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de significância de 5% (**Tabela 5**).

Os resultados de pH e acidez titulável mensurados após 6 e 24h para cada cultura láctica selecionada, e as respectivas concentrações de tirosina ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) produzidas em diferentes tempos de crescimento, podem ser observados nas **Tabelas A.1, A.2 e A.3** do **Apêndice A**.

**Tabela 5** – Valores médios obtidos nas análises realizadas para avaliação da capacidade de acidificação e proteolítica.

Gênero	pH 6h	pH 24h	Acidez (%) 6h	Acidez (%) 24h	Tirosina $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
<i>Lactococcus</i>	5,9 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	0,3690 <sup>a</sup>	0,6565 <sup>b</sup>	15,92 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus</i>	6,1 <sup>b</sup>	5,1 <sup>b</sup>	0,3224 <sup>b</sup>	0,5912 <sup>b</sup>	29,51 <sup>b</sup>
<i>Streptococcus</i>	5,7 <sup>a</sup>	4,7 <sup>a</sup>	0,3948 <sup>a</sup>	0,7614 <sup>a</sup>	11,28 <sup>a</sup>
Média	5,9	4,9	0,3620	0,6697	18,90
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,033	0,046	9,47

<sup>a, b</sup> - Valores seguidos de letras distintas em uma mesma coluna diferem entre si para um nível de 5% de significância.

De acordo com os valores médios de pH e acidez para 6 e 24h, observados na **Tabela 5**, as culturas de *Streptococcus* foram mais eficientes na acidificação do LDR, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais gêneros. Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a atividade acidificante dos *Lactococcus* e *Lactobacillus*.

Além disso, os resultados discutidos anteriormente mostraram que 40% dos bons acidificantes (15) foram *Streptococcus*, os quais também foram encontrados em quantidade relevante nos queijos de Coalho (**Capítulos 2 e 3**). Assim, estes dados permitem indicar estas culturas como promissoras para compor um

fermento láctico, como culturas iniciadoras.

A concentração média de tirosina apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as culturas de *Lactobacillus* e os demais gêneros avaliados. *Streptococcus* e *Lactococcus* não exibiram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si para a avaliação da capacidade proteolítica. Esta propriedade tecnológica será útil, principalmente, na seleção de microrganismos para um fermento secundário.

Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) determinados entre as propriedades de acidificação (pH 6 e 24h, acidez 6 e 24h) e capacidade proteolítica variaram de 0,00 a 0,01 para as culturas de *Lactobacillus*, 0,00 a 0,04 para *Lactococcus* e 0,05 a 0,15 para *Streptococcus*. Estes resultados demonstram fraca correlação entre as propriedades avaliadas, corroborando os dados obtidos por Cogan e outros (1997) e Durlu-Ozkaya e outros (2001).

#### 3.1.4. Avaliação da capacidade de formação de aroma

A capacidade de produção de aroma foi avaliada através da produção de diacetil e acetoína (acetil metil carbinol), para o mesmo número de culturas lácticas para o qual foi estudada a atividade proteolítica. Dos 94 isolados avaliados, 64 foram produtores de aroma, representando 68,1% do total de microrganismos analisados (**Tabela 6**).

**Tabela 6** – Produção de aroma pelas culturas lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

Gênero	Nº de Isolados	Produtores de Aroma	%
<i>Lactococcus</i>	25	20	80,0
<i>Lactobacillus</i>	42	31	73,8
<i>Streptococcus</i>	27	13	48,1
Total	94	64	68,1

A intensidade da produção de aroma para as BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, apresentada de forma individualizada, após a inoculação em LDR, pode ser visualizada na **Figura 2**.

Dos 25 *Lactococcus* avaliados, grande parte não produziu aroma (44%) ou foi fraco produtor (36%). Somente 4% dos microrganismos deste gênero produziram aroma de forma intensa (**Figura 2 a**). Este resultado não concorda com os resultados relatados por Alonso-Calleja e outros (2002), que verificaram uma percentagem de 31% dos 45 *Lactococcus* isolados do queijo espanhol Valdeteja, como fortes produtores de diacetil e acetoína.

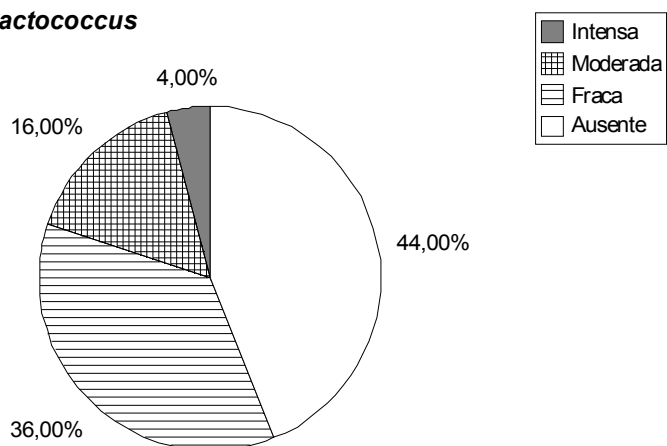
Os *Lactobacillus*, por sua vez, apresentaram o maior número de culturas classificadas como produtoras de aroma de intensidade moderada (33,3%) e de intensidade forte (9,5%), dentre os gêneros estudados (**Figura 2 b**).

Nenhum dos 27 *Streptococcus* analisados produziu aroma intenso e em mais da metade destas culturas (51,8%) foi detectada ausência da característica de produção de aroma (**Figura 2 c**). Este resultado aponta a necessidade do uso de outro microrganismo, provavelmente do gênero *Lactobacillus*, para atuar como cultura adjunta em um fermento para a produção do queijo de Coalho.

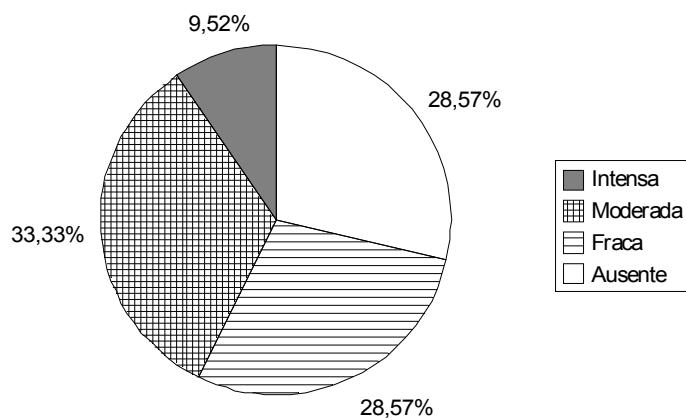
Os resultados obtidos neste trabalho diferem dos encontrados por Badis e outros (2004) ao compararem a atividade aromática produzida por *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e outros microrganismos. Estes autores detectaram uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como a maior produtora de diacetil, dentre as culturas avaliadas.

A produção de diacetil e a acetoína apresenta significativa contribuição no desenvolvimento de aroma e sabor de queijos pouco ou não curados (FOX *et al.*, 2000). Sua formação é realizada por BAL que metabolizam citrato, sendo responsáveis pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (HASSAN; FRANK, 2001).

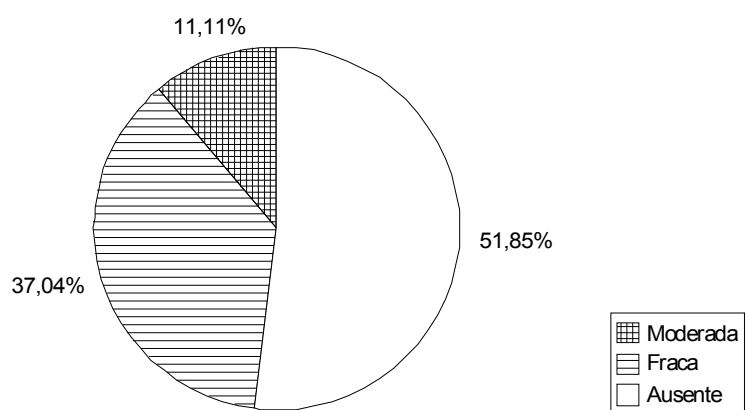
a) *Lactococcus*



b) *Lactobacillus*



c) *Streptococcus*



**Figura 2** – Produção de aroma pelas culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

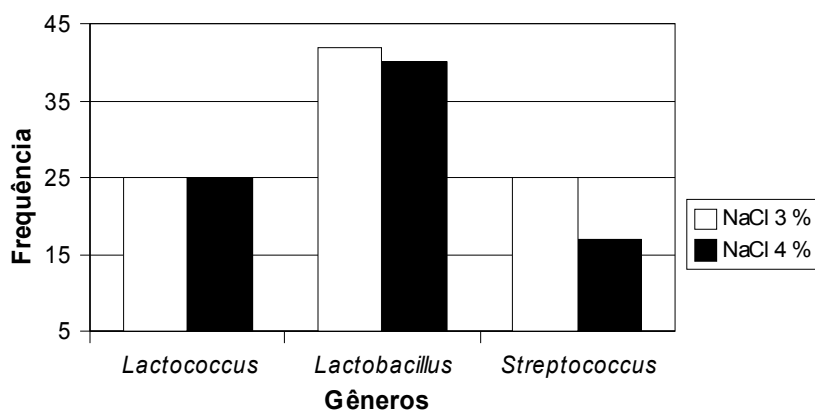


Estes compostos podem participar da qualidade organoléptica de queijos como o Manchego, Danbo (DELLAGLIO; DICKS; TORRIANI, 1995), Cottage, Fromage, Quark (FOX *et al.*, 2000), Miniago™, Petit Danimals™, Camembert / Brie (CHAMPAGNE *et al.*, 2006), Cheddar, Gouda, Suíço e queijos do tipo Holandês (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

### 3.1.5. Avaliação de tolerância da cultura ao NaCl

A tolerância ao sal foi avaliada para as 94 culturas lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (**Figura 3**). As concentrações de NaCl escolhidas para esta avaliação foram baseadas na percentagem máxima de cloretos (3,5%) obtida na caracterização físico-química do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará (**Capítulo 2**).

Todos os 25 *Lactococcus* avaliados apresentaram tolerância às concentrações de 3 e 4% de NaCl. As 42 culturas de *Lactobacillus* também suportaram bem as percentagens de NaCl testadas; todos se desenvolveram em 3% de sal e 95,2% deles cresceram em APT com 4% de sal.



**Figura 3** – Tolerância das culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* a 3 e 4% de NaCl.

Os *Lactobacillus* avaliados neste trabalho toleraram melhor o sal do que os caracterizados por Quiberoni e outros (1998). Das 25 culturas de *Lactobacillus helveticus*, 32% resistiram a 2% de NaCl, porém, somente 8% delas sobreviveram a concentração de 4%.

Os *Streptococcus* mostraram menor tolerância às concentrações de NaCl citadas anteriormente, dentre os gêneros estudados. Mesmo assim, 92,6% dos 27 isolados apresentaram crescimento em 3% de sal e 63% deles se desenvolveram em 4%.

As culturas iniciadoras e adjuntas selecionadas para a produção do queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado devem estar adaptadas às condições ambientais relacionadas com o processamento do queijo, portanto a tolerância ao sal é uma propriedade bastante importante.

#### 3.1.6. Avaliação do potencial de patogenicidade das culturas de *Enterococcus*

A patogenicidade das culturas de *Enterococcus* foi avaliada pelos testes de atividade de hemolisinas e de termonucleases e de produção de gelatinase. Dos 64 *Enterococcus* avaliados, todos apresentaram resultado negativo para atividade de termonucleases e produção de gelatinase, mas 27 foram positivos para a atividade de hemolisinas. Embora a  $\beta$ -hemólise seja apenas um fator de aproximação do potencial de patogenicidade, 42,2% dos isolados deste gênero foram considerados patogênicos (**Tabela 7**).

Dentre os isolados investigados, 37 apresentaram perfil não patogênico, sendo identificados como *Enterococcus faecium* (25), *Enterococcus faecalis* (9) e *Enterococcus durans* (2), além de um *Streptococcus bovis*. As espécies de *Enterococcus* consideradas patogênicas não foram identificadas.

**Tabela 7** – Potencial patogênico das culturas do gênero *Enterococcus*.

<i>Enterococcus</i>	Nº de Isolados	%
Não Patogênicos	37	57,8
Patogênicos	27	42,2
Total	64	100,0

Os resultados para patogenicidade concordam com os relatados por Giraffa e outros (1995) e Miguel, Teixeira e Noleto (1995), citados por Giraffa, Carminati e Neviani (1997). Giraffa e outros (1995) relataram atividade de termonucleases negativa para os 75 enterococos isolados de alimentos, mas 10% deles exibiram a produção de hemolisinas. Miguel, Teixeira e Noleto (1995) também encontraram resultado negativo para a termonuclease de 18 *Enterococcus* avaliados, sendo que somente um deles produziu  $\beta$ -hemólise.

*Enterococcus* podem ser patógenos oportunistas, causando infecções em pacientes imunocomprometidos. A espécie *E. faecalis* é predominantemente isolada entre os enterococos causadores de infecções em humanos, enquanto o *E. faecium* está associado com o restante destas infecções (FRANZ *et al.*, 2003).

Segundo Franz, Holzapfel e Stiles (1999), a preocupação para a saúde pública com a presença de *Enterococcus* em alimentos está relacionada ao seu habitat entérico, seu uso como indicadores de segurança alimentar e seu possível envolvimento em doenças transmitidas por alimentos. No entanto, por muito tempo estes microrganismos foram considerados de baixa capacidade patogênica, devido a falta de fatores potenciais de virulência quando comparados com patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

A presença de *Enterococcus* em produtos lácteos tem sido considerada como uma indicação de condições sanitárias insuficientes durante a produção e processamento do leite. Contudo, eles têm uma longa história de uso seguro em alimentos (SARANTINOPOULOS *et al.*, 2001), sendo empregados como fermento

lático em alguns queijos europeus, por conta da sua contribuição positiva no desenvolvimento de sabor e aroma (FRANZ, HOLZAPFEL; STILES, 1999).

### 3.1.7. Avaliação de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas ativas contra *Listeria* spp.

Embora a *L. monocytogenes* apresente um grande risco à saúde do consumidor e sua veiculação esteja bastante relacionada com produtos lácteos, este microrganismo não foi detectado entre as 14 amostras de queijo de Coalho artesanal avaliadas neste trabalho.

Este resultado difere dos de Branco e outros (2003) que encontraram *L. monocytogenes* em 19% (16/ 84) de amostras de queijo de Coalho industrializadas. Assim, uma possível explicação para ausência de *Listeria* nas amostras de queijo de Coalho artesanal analisadas pode ser a presença de culturas lácticas selvagens produtoras de bacteriocinas.

O resultados de atividade antagonista e de produção de bacteriocinas contra *Listeria* spp., para as culturas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e para os isolados não patogênicos do *Enterococcus* estão apresentados na **Tabela 8**.

As culturas de *Lactococcus* apresentaram maior variabilidade na produção de atividade antagonista contra as quatro cepas de *Listeria* spp. Dos 25 isolados avaliados, percentagens similares inibiram *L. innocua* (24%) e *L. monocytogenes* Scott A (20%). As cepas de *L. monocytogenes* C1 – 027 e C1 – 030 apresentaram maior sensibilidade aos compostos produzidos pelos *Lactococcus*, sendo impossibilitadas de crescer, respectivamente, por 36 e 44% destes isolados.

**Tabela 8** – Atividade antagonista e produção de bacteriocinas por BAL contra *Listeria* spp.

BAL	Nº Isolados avaliados	Espécies de <i>Listeria</i>			
		Li (Aa / Pb)	LmS (Aa / Pb)	Lm27 (Aa / Pb)	Lm30 (Aa / Pb)
<i>Lactococcus</i>	25	6 / 1	5 / 1	9 / 1	11 / 1
<i>Lactobacillus</i>	42	13 / 3	13 / 3	13 / 3	13 / 3
<i>Streptococcus</i>	27	1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
<i>Enterococcus</i>	37	8 / 8	8 / 8	8 / 8	8 / 8
Total	131	28 / 13	27 / 13	31 / 13	33 / 13

Aa / Pb – Atividade antagonista / Produção de bacteriocinas;

Li – *L. innocua* ATCC 33090, LmS – *L. monocytogenes* Scott A,

Lm27 – *L. monocytogenes* C1 – 027, Lm30 – *L. monocytogenes* C1 – 030.

Como apenas uma cultura de *Lactococcus* foi produtora de bacteriocina ou de composto similar, a propriedade antimicrobiana desenvolvida pelos outros isolados deste gênero pode ter sido devido a produção de ácido ou de outros compostos antagonísticos. Esta cultura foi identificada como *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (**Capítulo 2 e 3**).

Das 42 culturas de *Lactobacillus* avaliadas, 31% impediram o desenvolvimento das cepas de *Listeria* spp. envolvidas neste trabalho. Desta atividade antagonista, 23% ocorreu pela produção de bacteriocinas (**Tabela 8**). O restante do antagonismo provavelmente não ocorreu pela redução de pH, pois os *Lactobacillus* foram os microrganismos menos acidificantes neste trabalho. Dos *Lactobacillus* produtores de bacteriocinas um foi identificado como *Lactobacillus brevis* e dois como *Lactobacillus crispatus* (**Capítulo 2 e 3**).

As culturas de *Enterococcus* foram as que apresentaram maior poder de inibição contra as espécies de *Listeria* spp. Dentre os 37 *Enterococcus* considerados não patogênicos, 21,6% (sete *Enterococcus faecium* e um *Enterococcus faecalis*) impediram o crescimento das cepas de *Listeria* spp. Esta

ação inibitória foi desencadeada por bacteriocinas, porque os mesmos isolados que apresentaram atividade antagonista, também foram produtores de bacteriocinas ou metabólitos similares (**Tabela 8**).

Estes resultados corroboram os encontrados por Tarelli, Carminati e Giraffa (1994), os quais observaram que 21 dentre 116 *Enterococcus*, isolados de produtos lácteos, desempenharam atividade antagonista contra *L. innocua* e *L. monocytogenes*, através da produção de bacteriocinas.

Somente uma cultura de *Streptococcus thermophilus* (3,7%) apresentou efeito antimicrobiano contra as cepas de *Listeria* spp. Da mesma forma que os *Enterococcus*, a inibição do *Streptococcus* contra as cepas de *Listeria* spp. ocorreu pela produção de bacteriocinas (**Tabela 8**).

As zonas de inibição formadas pelo efeito antagonista das bacteriocinas produzidas pelas culturas lácticas testadas sobre as quatro cepas de *Listeria* spp. variaram de 2 a 7mm. O tamanho do halo de inibição representa o poder antimicrobiano do composto formado por uma cultura, sobre aquele determinado microrganismo. A única cultura de *Lactococcus* produtora de bacteriocina formou halo de 2mm contra as cepas de *Listeria* spp., evidenciando a baixa capacidade bacteriocinogênica deste gênero.

A maior parte dos *Lactobacillus* produziu halos de 2 a 3mm, porém o *Lactobacillus brevis* desenvolveu um halo maior (4mm) contra *L. innocua*. Este resultado foi diferente do encontrado por Hechard e outros (1990), que observaram zonas de inibição de até 10mm, promovidas por *Lactobacillus* produtores de bacteriocinas contra a *L. monocytogenes*.

O *Streptococcus thermophilus* e os *Enterococcus* apresentaram halos de 4 a 7 mm, mas nestes casos, os halos maiores foram formados contra as cepas de *L. monocytogenes* C1 – 027 e C1 – 030, as quais foram isoladas do queijo de Coalho artesanal. Este fato demonstrou que estes microrganismos podem auxiliar

na biopreservação do queijo de Coalho.

Outros trabalhos reportados na literatura apresentaram o efeito antagonista desenvolvido por culturas láticas sobre cepas de *L. monocytogenes*. Nascimento (2007) detectou forte ação inibitória de três culturas bacteriocinogênicas, *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 sobre a *L. monocytogenes* Scott A.

Carrasco, Scarinci e Simonetta (2002) encontraram nove culturas que exibiram propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram positivas, como a *L. monocytogenes*, e também contra algumas Gram negativas, dentre 27 BAL isoladas de queijos artesanais e de outros produtos lácteos comercializados na Argentina.

Para Herreros e outros (2005), dentre as culturas de *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* avaliadas, a cepa *Lactobacillus plantarum* TAUL 1539 mostrou o maior efeito antagonista contra vários microrganismos indicadores, contudo não foram ativos contra *L. monocytogenes*.

Os resultados das propriedades tecnológicas de tolerância ao NaCl, produção de aroma e bacteriocinas e da identificação de espécie referente a cada cultura avaliada, podem ser verificados nas **Tabelas B.1, B.2, e B.3** do **Apêndice B**. Os resultados de produção de bacteriocinas e identificação das culturas de *Enterococcus* podem ser observados na **Tabelas C.1** do **Apêndice C**.

#### **4. Conclusões**

As propriedades tecnológicas avaliadas neste trabalho caracterizaram as culturas láticas testadas, como pouco acidificantes e pouco proteolíticas, com capacidade fraca a moderada de produzir aroma, alta tolerância ao sal e capazes de produzir compostos antimicrobianos contra *Listeria* spp. Estas características

podem ser utilizadas para indicar culturas com potencial para compor fermentos lácticos destinados à elaboração do queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

Dentre as propriedades avaliadas, a capacidade de acidificação foi a que mais contribuiu na seleção de culturas apropriadas para o fermento láctico, sendo seguida pela capacidade proteolítica e de produção de aroma. A capacidade de tolerância ao sal demonstrou ser a característica menos seletiva, uma vez que os isolados avaliados praticamente não mostraram diferenças quanto a esta propriedade.

Um fermento láctico eficiente para a produção de queijos necessita, primeiramente, conter uma cultura iniciadora, ou seja, um microrganismo com boa capacidade de produzir ácido, pois o processo em si se beneficia desta característica. De acordo com os resultados obtidos, as culturas de *Streptococcus thermophilus* são as mais indicadas para assumirem o papel de iniciadoras.

Culturas para complementar o fermento destinado à produção de queijo de Coalho devem ser pouco acidificantes, apresentar de baixa a moderada capacidade proteolítica e produzir aroma. Alguns isolados do gênero *Lactobacillus*, como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus brevis* atenderam a estes requisitos.

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas pelas culturas lácticas avaliadas contra as cepas de *Listeria* spp. podem atuar como uma barreira no desenvolvimento destes microrganismos, atuando como conservantes biológicos no queijo de Coalho.

Considerando que as culturas de *Enterococcus faecium* apresentaram a maior produção de bacteriocinas ativas contra as cepas de *Listeria monocytogenes*, elas mostram grande potencial para serem usadas como bioprotetoras, com intuito de aumentar a segurança contra possíveis contaminações deste patógeno, durante a produção de queijo de Coalho.



Os enterococos fazem parte da microbiota natural do queijo de Coalho e devem ter contribuição significativa nas características do mesmo. No entanto, para que estas culturas sejam adicionadas a um fermento láctico é necessária a caracterização de suas propriedades tecnológicas, como acidificação, atividade proteolítica e capacidade de produzir aroma e aprofundamento nos estudos a respeito de sua patogenicidade.

## 5. Referências Bibliográficas

ALONSO-CALLEJA, C.; CARBALLO, J.; CAPITA, R.; BERNARDO, A. GARCÍA-LÓPEZ, M. Comparison of the acidifying activity *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 134-138, Fev., 2002.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v.17, p. 454-461, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed., Washington. 1997.

AYAD, E. H. E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v.21, n. 6, p. 715-725, Dec., 2004.

BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; HENNI, D. E.; TORNADIJO, M. E.; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 343-349, Out., 2004.

BAEK, S.-Y.; LIM, S. Y.; LEE, D. H.; MIN, K. H.; KIM, C. M. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 2, p. 186-189, Feb. 2000.

BALLESTEROS, C.; POVEDA, J. M.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; CABEZAS, L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 249-255, Apr., 2006.

BENKERROWM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W. E.; TANTAOUI-ELARAKI A. Methods to demonstrate bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 78-81, 1993.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n.4-7, p. 259-274, jul., 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V.1, General Aspects, p. 287-317.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES; M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO; M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 209-430, jul./dez., 2003.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados**. 2003. Dissertação (Meste em Genética e Biologia Molecular) Departamento de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual de Campinas.

CARRASCO, M. S.; SCARINCI, H. E.; SIMONETTA, A. C. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p.15-19, Apr., 2002.

CHAMPAGNE, C. P.; BARRETE, J.; ROY, D.; RODRIGUE, N. Fresh-cheesemilk fromulation fermented by a combination of freeze-dried citrate-positive cultures and exopolysaccharide-producing lactobacilli with liquid lactococcal starters. **Food Research International**, v. 39, n. 6, p. 651-659, Jul., 2006.

CITTI, J. E.; SANDINE, W. E.; ELLIKER, P. R. Some observations on the Hull method of measurement of proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaing, v. , n. 46, p. 337, Apr., 1963. Technical notes.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

COWMAN, R. A.; SPECK, M. L. Proteolytic activity and acid production of lactic streptococci after refrigered storage. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 5, May, 1962.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Microbiology, Genetics and Application. London: Chapman & Hall, p. 1-12, 1994.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI. E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied**

**Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 5. p. 54-97.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of Food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n.1/ 2, p. 1-24, Mar., 1999. Review.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/ 3 , p. 105-122, Dec., 2003. Review.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. Viçosa, 1990. 95 p. Dissertação (M. S.) Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potencial as anti-*Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v. 12, p. 291-299, Feb., 1995.

GIRAFFA, G.; PEPE, G.; LOCCI, F.; NEVIANI, E.; CARMINATI, D. Hemolytic activity, production of thermonuclease and biogenic amines by dairy enterococci. **Italian Journal Food Science**, v. 7, 339-347, 1995.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potencial technological uses. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 732-738, 1997.

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J.

M.; TORNADIJO, M. E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v. 18, n. 6, p. 716-722, Jun., 2007.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, Dec, 1997.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HECHARD, Y.; DHERBOMEZ, M.; CENATIEMPO, Y.; LETELLIER, F. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the "sadwich method". **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 185-188, Oct., 1990.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLES, L. CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**, v. 22, n. , p. 455-459, 2005.

HULL, M. E.; Studies in milk proteins. Colorimetric determination of the partial hidrolysis of the proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, 30, p. 881-884, Jul., 1947.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening: Introducional and Overview. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 347-360.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in Ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food**

**Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, Apr., 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA (MAARA). Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 183-191, set., 2000.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in foods. **Journal of Food Protection**, suplement, p. 54-63, 1996.

NASCIMENTO, M. da Silva do. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal**. 2007. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Health Products and Food Branch. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. Government of Canada, January 2001. Disponível em: <http://www.hc-sc.ca/food-aliment>. Acesso em set. 2001.

QUIBERONI, A.; TAILLIEZ, P.; QUÉNÉE, P.; SUÁREZ, V.; REINHEIMER, J. A. Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 591-596, Sep., 1998.

R DEVELOPMENT Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**, reference index version 2.4.0. R Foundation for Statistical Computing,

Vienna, Austria, 2006. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: dez. 2006.

REINHEIMER, J. A.; SUAREZ, V. B.; BAILO, N. B.; ZALAZAR, C. A.  
Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 7, p.796-799, Jul., 1995.

REINHEIMER, J. A.; BINETTI, A. G.; QUIBERONI, A.; BAILO, N. B.; RUBIOLO, A. C.; GIRAFFA, G. Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 1, p. 59-63, 1997.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 1, p. 131-137, Feb., 2001.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.  
Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGLES, W. J. M. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591-610, Aug., 2005.

TAGG, J. R.; McGIVEN, A. R. Assay System for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 943, May, 1971.

TARELLI, G. T.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 243-252, Jun., 1994.





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

### Conclusões Gerais

Um extenso trabalho de pesquisa foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal, produzido no Ceará, e suas características tecnológicas, visando selecionar culturas lácticas a serem utilizadas na produção do queijo a partir de leite pasteurizado, com intuito de preservar as características originais do produto tradicional, elaborado com leite cru.

Este trabalho, descrito nos capítulos anteriores, envolveu a caracterização físico-química e da microbiota láctica de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará; o estudo da evolução das bactérias ácido lácticas (BAL) durante o processamento do queijo; e a determinação de propriedades tecnológicas das culturas lácticas isoladas a partir deles. As principais conclusões constatadas durante esta pesquisa são descritas a seguir.

Os resultados físico-químicos caracterizaram as 12 amostras de queijo de Coalho artesanal avaliadas como de médio conteúdo de umidade e de sal e atividade de água e pH elevados. A microbiota láctica destas amostras foi composta, predominantemente, de *Enterococcus*, *Streptococcus* e lactobacilos termofílicos.

O estudo da evolução das BAL em amostras de leite cru (LC), massa de queijo (MQ) e do queijo de Coalho (QC), coletadas em duas unidades produtoras de Jaguaribe, CE, mostrou a predominância de *Lactococcus* e lactobacilos mesofílicos nas amostras LC e de microrganismos termofílicos nas amostras QC. Esta mudança na composição da microbiota láctica indica que durante o processamento do queijo de Coalho artesanal ocorreu uma seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, devido à etapa de cozimento da massa.

A presença crescente de *Enterococcus* nas amostras LC, MQ e QC indicou a transferência e multiplicação destes microrganismos da matéria-prima para o produto final. Boas práticas de fabricação devem ser efetuadas durante a elaboração do queijo, desde a obtenção do leite, para assegurar a qualidade sanitária do produto final. No entanto, os resultados encontrados neste trabalho mostraram que os enterococos fazem parte da microbiota natural deste queijo e podem contribuir para as características do mesmo.

As propriedades tecnológicas avaliadas neste trabalho caracterizaram as culturas lácticas testadas como pouco acidificantes e pouco proteolíticas, com capacidade fraca a moderada de produzir aroma, alta tolerância ao sal e capazes de produzir compostos antimicrobianos contra *Listeria* spp.

Tais propriedades permitem classificar algumas das culturas isoladas e analisadas neste trabalho como promissoras para a composição de fermentos lácticos destinados à produção de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

### **Sugestões para trabalhos futuros**

Este trabalho produziu conhecimentos originais sobre a microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. No entanto, os temas aqui abordados podem ter sequência e serem aprofundados em trabalhos futuros. Com o objetivo de contribuir para a continuidade das pesquisas são sugeridos a seguir:

- formulação de fermentos lácteos a partir das culturas estudadas neste trabalho, a fim de serem testados no processamento em escala experimental, do queijo de Coalho com leite pasteurizado. As características sensoriais deste queijo devem ser avaliadas e comparadas às do queijo artesanal tradicional;

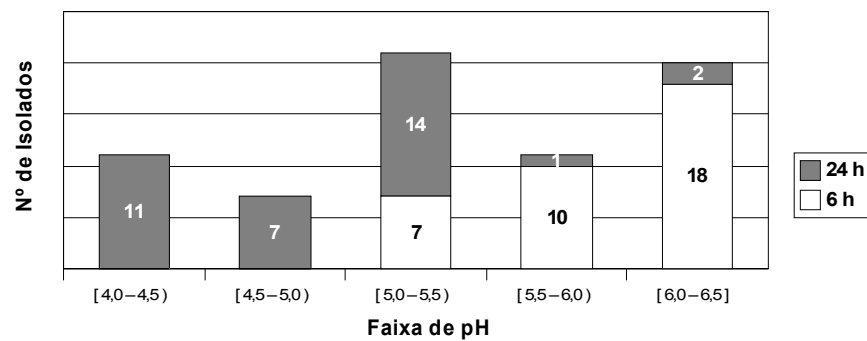
- caracterização genética das BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal para determinar o número de cepas distintas entre as espécies identificadas;
- isolamento e caracterização de bacteriófagos (vírus que se replicam dentro de células bacterianas) de queijos de Coalho produzidos no Ceará para posterior verificação de resistência das culturas lácticas examinadas neste trabalho a estes fagos;
- verificação da real contribuição das culturas do gênero *Enterococcus* nas características do queijo de Coalho, avaliando as propriedades tecnológicas de acidificação, atividade proteolítica e capacidade de produzir aroma;
- aprofundamento de estudos a respeito da patogenicidade das cepas de *Enterococcus* isoladas do queijo de Coalho, com detecção de genes envolvidos na expressão de fatores de virulência, avaliação da produção de aminas biogênicas e da resistência a antibióticos.
- caracterização das bacteriocinas ativas contra a *L. monocytogenes*, produzidas pelas culturas lácticas avaliadas neste trabalho, quanto ao seu espectro de atividade contra outros microrganismos deteriorantes e patogênicos, e quanto a sua sensibilidade a enzimas, diferentes pH e temperaturas elevadas.



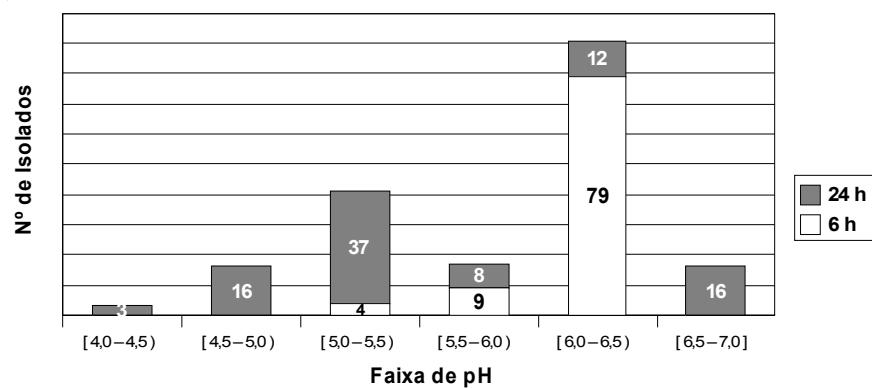
## APÊNDICE A

### RESULTADOS DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO E PROTEOLÍTICA

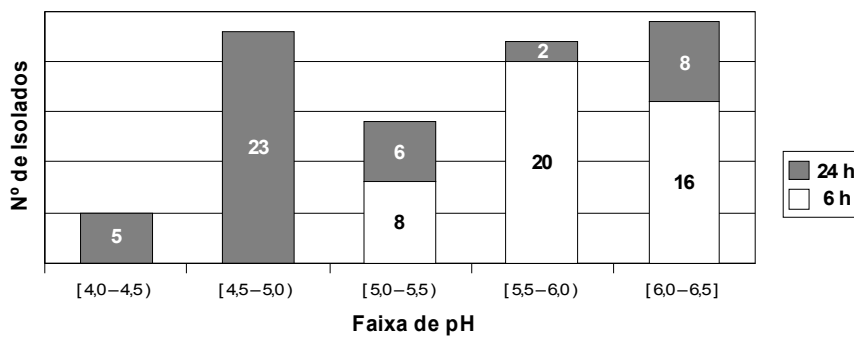
(a) *Lactococcus*



(b) *Lactobacillus*



(c) *Streptococcus*



**Figura A 1** – Capacidade de acidificação de *BAL* isoladas de amostras de leite, massa do queijo e queijo de Coalho artesanal, após 6 e 24 h.

**Tabela A.1** – Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24 h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de *Lactococcus*.

Cultura	Amostra	pH 6h	pH 24h	Acidez 6h	Acidez 24h	Proteólise <sup>a</sup> (TC)
134	QC1	6,1	4,6	0,2966	0,7265	6,68 (16)
378	QC7	6,3	5,4	0,2659	0,2851	27,52 (16)
414	QC9	5,6	4,4	0,4434	0,9826	4,45 (16)
453	QC8	6,1	5,2	0,3096	0,5376	10,14 (24)
456	QC8	6,2	5,3	0,2820	0,4926	28,76 (24)
457	QC8	6,0	5,3	0,3049	0,5226	9,51 (24)
466	QC8	6,2	5,2	0,3194	0,5946	4,93 (24)
468	QC8	6,3	5,7	0,3043	0,4511	39,45 (16)
613	L1	5,3	4,3	0,5213	1,0502	21,16 (16)
626	L1	5,7	4,8	0,3887	0,7943	3,13 (16)
633	L1	5,8	4,8	0,3530	0,7149	< LD (16)
635	L1	5,9	4,8	0,3438	0,7265	3,10 (16)
639	L1	5,8	4,8	0,3511	0,7202	12,32 (16)
674	L2	6,1	5,5	0,3276	0,4388	17,27 (24)
688	L2	6,1	5,4	0,3256	0,4823	13,81 (16)
698	MQ2	6,1	5,4	0,3109	0,4853	7,65 (48)
699	L1	6,1	5,4	0,3213	0,4591	5,10 (24)
718	L1	6,2	5,1	0,3180	0,5976	23,37 (16)
960	L1	5,4	4,3	0,5641	1,0399	22,03 (16)
962	L2	5,6	4,3	0,5059	1,0243	31,27 (16)
963	L2	5,7	4,4	0,4402	0,9994	23,86 (16)
969	L2	6,1	5,4	0,3373	0,4594	13,77 (24)
1033	QC13	5,0	4,4	0,6736	0,8435	24,71 (16)
1083	QC14	6,2	5,3	0,3437	0,5120	6,49 (48)
1113	QC15	6,3	5,4	0,2726	0,4720	21,68 (24)

L – Leite cru; QC – Queijo de Coalho; MQ – Massa do Queijo; TC – Tempo de crescimento em horas.

<sup>a</sup> – Expressa em µg de tirosina por ml por tempo de crescimento.

LD – Limite de detecção do método de Hüll (1,4 µg de tirosina por ml).

**Tabela A.2** – Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24 h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de *Lactobacillus*.

Cultura	Amostra	pH 6h	pH 24h	Acidez 6h	Acidez 24h	Proteólise <sup>a</sup> (TC)
176	QC4	6,5	5,3	0,3489	0,6165	8,37 (16)
270	QC4	6,2	4,8	0,2922	0,7172	11,66 (16)
275	QC4	6,1	5,0	0,3432	0,6602	23,34 (24)
373	QC7	6,1	5,4	0,3065	0,4297	13,89 (48)
455	QC8	6,0	5,4	0,3185	0,4718	12,84 (48)
460	QC8	6,2	4,8	0,3013	0,9157	5,97 (16)
461	QC8	6,1	5,2	0,3138	0,5620	8,35 (24)
470	QC8	6,3	5,5	0,3180	0,6099	68,53 (16)
472	QC9	6,2	5,7	0,3120	0,4015	44,33 (48)
483	QC9	6,2	5,2	0,3249	0,3110	13,46 (24)
485	QC9	6,3	5,4	0,2630	0,2893	9,42 (24)
605	QC10	6,1	4,8	0,3035	0,6781	11,30 (16)
620	L1	6,3	5,3	0,2689	0,4798	54,58 (24)
661	MQ1	6,3	5,1	0,2659	0,5538	9,60 (16)
682	L2	6,1	5,4	0,3558	0,4780	36,81 (24)
700	L2	6,1	5,4	0,3197	0,4506	18,23 (24)
780	L1	5,6	4,6	0,4045	0,8254	16,24 (16)
781	L1	5,4	4,5	0,4455	0,8576	13,81 (16)
787	L1	6,1	6,0	0,3025	0,4345	6,19 (24)
832	QC10	5,7	4,7	0,4123	0,7500	79,47 (24)
1018	QC13	6,0	4,8	0,3083	0,7278	8,91 (48)
1020	QC13	6,0	4,8	0,3067	0,7544	10,22 (48)
1022	QC13	6,1	4,7	0,3171	0,7632	75,78 (16)
1024	QC13	6,1	4,9	0,3224	0,6802	36,92 (48)
1042	QC13	6,1	4,8	0,2969	0,6922	2,72 (16)
1086	QC14	6,2	5,6	0,2916	0,4033	14,97 (48)
1101	QC13	6,1	5,4	0,3041	0,5125	68,78 (24)
1119	QC13	6,1	4,8	0,3549	0,7351	12,94 (16)
1120	QC13	6,2	5,3	0,2886	0,5046	12,21 (16)
1122	QC13	6,2	5,3	0,2947	0,4920	17,08 (48)
1123	QC13	6,1	5,2	0,3085	0,5567	34,17 (16)
1126	QC13	6,2	5,0	0,3230	0,6267	34,25 (48)
1127	QC13	6,2	5,1	0,3080	0,5997	79,55 (16)
1131	QC13	6,2	5,2	0,3123	0,5628	46,24 (24)
1132	QC13	6,2	5,2	0,3113	0,5275	78,88 (16)
1133	QC13	5,2	4,3	0,5034	0,9731	13,26 (24)
1134	QC13	6,2	5,3	0,3316	0,4944	39,06 (24)

**Tabela A.2** – Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24 h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de *Lactobacillus*. (Continuação).

Cultura	Amostra	pH 6h	pH 24h	Acidez 6h	Acidez 24h	Proteólise <sup>a</sup> (TC)
1135	QC13	6,2	5,3	0,3144	0,4819	38,46 (24)
1137	QC13	6,2	5,3	0,3130	0,4830	32,28 (24)
1179	QC14	6,1	4,9	0,3174	0,6810	44,31 (24)
1185	QC14	6,2	5,3	0,3010	0,4736	60,69 (48)
1191	QC14	6,2	5,1	0,2892	0,6125	11,37 (16)

L – Leite cru; QC – Queijo de Coalho; MQ – Massa do Queijo; TC – Tempo de crescimento em horas.

<sup>a</sup> – Expressa em µg de tirosina por ml por tempo de crescimento.

LD – Limite de detecção do método de Hüll (1,4 µg de tirosina por ml).



**Tabela A.3** – Valores médios de pH e acidez titulável (após a incubação de 6 e 24h a 30°C) e concentração de tirosina para as culturas de *Streptococcus*.

Cultura	Amostra	pH 6h	pH 24h	Acidez 6h	Acidez 24h	Proteólise <sup>a</sup> (TC)
34	QC2	5,5	4,7	0,3772	0,8163	12,94 (16)
50	QC2	5,3	4,5	0,4637	0,8491	12,02 (16)
54	QC2	5,4	4,5	0,4591	0,8540	10,81 (16)
65	QC3	5,8	4,6	0,3476	0,3639	9,41(16)
217	QC6	6,1	4,7	0,3371	0,7942	11,22 (16)
218	QC6	6,2	4,4	0,2924	0,9385	10,79 (16)
226	QC6	5,3	4,4	0,4803	0,8629	12,83 (16)
227	QC6	5,3	4,5	0,4773	0,9233	12,56 (16)
295	QC6	5,2	4,5	0,5618	0,9028	11,94 (16)
628	L1	5,7	4,7	0,3711	0,7784	14,95 (16)
717	MQ2	5,8	5,1	0,3186	0,5586	6,61 (16)
776	L1	5,6	4,7	0,3800	0,7348	13,79 (16)
777	L1	5,7	4,6	0,3893	0,8932	8,45 (16)
785	L1	5,8	4,7	0,3593	0,7806	14,87 (16)
786	L1	5,6	4,6	0,4147	0,8281	14,21 (16)
798	MQ1	5,6	4,5	0,3901	0,8347	14,10 (16)
799	MQ1	5,7	4,5	0,3912	0,8581	14,67 (16)
801	MQ1	5,6	5,0	0,4025	0,6502	< LD (16)
802	MQ1	5,3	4,5	0,4961	0,7624	17,56 (16)
805	MQ1	5,8	4,6	0,3727	0,8039	15,45 (16)
813	MQ1	6,0	5,4	0,3359	0,4759	6,20 (16)
831	QC10	6,0	5,2	0,3493	0,5319	< LD (16)
839	QC10	5,5	4,6	0,4578	0,8008	1,76 (16)
878	QC10	6,3	5,5	0,3101	0,4858	11,3(16)
895	MQ2	5,8	4,6	0,3898	0,8223	6,17 (16)
1065	QC14	6,2	4,6	0,2970	0,8493	2,49 (16)
1147	QC12	5,6	4,7	0,4370	0,8043	14,85 (16)

L – Leite cru; QC – Queijo de Coalho; MQ – Massa do Queijo; TC – Tempo de crescimento em horas.

<sup>a</sup> – Expressa em µg de tirosina por ml por tempo de crescimento.

LD – Limite de detecção do método de Hüll (1,4 µg de tirosina por ml).

## APÊNDICE B

### RESULTADOS DE TOLERÂNCIA AO NaCl, PRODUÇÃO DE AROMA E BACTERIOCINAS E DE IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS LÁTICAS

**Tabela B.1** – Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de *Lactococcus*.

Cultura	Amostra	3% NaCl	4% NaCl	Aroma <sup>a</sup>	Bacteriocinas	Espécie
134	QC1	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
378	QC7	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
414	QC9	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
453	QC8	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
456	QC8	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
457	QC8	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
466	QC8	+	+	++	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
468	QC8	+	+	++	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
613	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
626	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
633	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
635	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
639	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
674	L2	+	+	-	-	<i>Lc. raffinolactis</i>
688	L2	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
698	MQ2	+	+	+++	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
699	L1	+	+	++	-	<i>Lc. raffinolactis</i>
718	L1	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
960	L1	+	+	++	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
962	L2	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
963	L2	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
969	L2	+	+	+	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
1033	QC13	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
1083	QC14	+	+	-	-	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
1113	QC15	+	+	-	+	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

<sup>a</sup> – Produção de diacetil e acetoina: (-) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte.

**Tabela B.2** – Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de *Lactobacillus*.

Cultura	Amostra	3% NaCl	4% NaCl	Aroma <sup>a</sup>	Bacteriocinas	Espécie
176	QC4	+	+	-	-	<i>Lb. brevis</i>
270	QC4	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
275	QC4	+	+	++	-	<i>Lb. plantarum</i>
373	QC7	+	+	+++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
455	QC8	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
460	QC8	+	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
461	QC8	+	+	+	-	<i>Lb. brevis</i>
470	QC8	+	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i>
472	QC9	+	+	++	+	<i>Lb. brevis</i>
483	QC9	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
485	QC9	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
605	QC10	+	-	-	-	<i>Lb. crispatus</i>
620	L1	+	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
661	MQ1	+	+	-	-	<i>Lb. brevis</i>
682	L2	+	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i>
700	L2	+	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i>
780	L1	+	+	++	+	<i>Lb. crispatus</i>
781	L1	+	+	+	+	<i>Lb. crispatus</i>
787	L1	+	+	++	-	<i>Lb. plantarum</i>
832	QC10	+	+	-	-	<i>Lb. plantarum</i>
1018	QC13	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1020	QC13	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1022	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1024	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1042	QC13	+	+	+++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1086	QC14	+	+	+++	-	<i>Lb. brevis</i>
1101	QC13	+	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1119	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i>
1120	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1122	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1123	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1126	QC13	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1127	QC13	+	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1131	QC13	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1132	QC13	+	+	+++	-	<i>Lb. plantarum</i>
1133	QC13	+	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1134	QC13	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1135	QC13	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1137	QC13	+	-	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1179	QC14	+	+	++	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1185	QC14	+	-	-	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
1191	QC14	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>

<sup>a</sup> – Produção de diacetil e acetoína: (-) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte.

**Tabela B.3** – Tolerância a 3 e 4% de NaCl, produção de aroma e de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de *Streptococcus*.

Cultura	Amostra	3% NaCl	4% NaCl	Aroma <sup>a</sup>	Bacteriocinas	Espécie
34	QC2	+	-	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
50	QC2	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
54	QC2	+	-	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
65	QC3	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
217	QC6	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
218	QC6	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
226	QC6	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
227	QC6	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
295	QC6	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
628	L1	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
717	MQ2	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
776	L1	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
777	L1	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
785	L1	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
786	L1	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
798	MQ1	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
799	MQ1	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
801	MQ1	+	-	-	+	<i>Str. thermophilus</i>
802	MQ1	+	-	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
805	MQ1	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
813	MQ1	+	+	++	-	<i>Str. thermophilus</i>
831	QC10	+	+	+	-	<i>Str. thermophilus</i>
839	QC10	+	-	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
878	QC10	+	+	++	-	<i>Str. thermophilus</i>
895	MQ2	-	-	++	-	<i>Str. thermophilus</i>
1065	QC14	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>
1147	QC12	+	+	-	-	<i>Str. thermophilus</i>

<sup>a</sup> – Produção de diacetil e acetoína: (-) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte.

## APÊNDICE C

### RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS E DE IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS LÁTICAS DO GÊNERO *Enterococcus*

**Tabela C.1** – Produção de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de *Enterococcus*.

Nº Isolados	Amostra	Cultura	Espécie	Bacteriocinas
1	QC3	82Ec	<i>Streptococcus bovis</i> II	-
2	QC1	138Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
3	QC4	168Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	+
4	QC6	308Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
5	QC6	320Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
6	QC7	350Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
7	QC7	354Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
8	QC8	393Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
9	QC9	419Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
10	QC9	422Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
11	QC9	424Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
12	QC9	427Ec	<i>Enterococcus durans</i>	-
13	QC8	462Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
14	QC9	492Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
15	QC9	514Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
16	QC9	515Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
17	QC9	529Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
18	QC7	547Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
19	QC7	551Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
20	QC10	573Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
21	QC10	574Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
22	MQ1	645Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
23	QC11	755Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
24	QC11	756Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
25	QC10	858Ec	<i>Enterococcus durans</i>	-
26	MQ2	910Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
27	QC11	940Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+

**Tabela C.1** – Produção de bacteriocinas e identificação das espécies das culturas de *Enterococcus*. (Continuação)

<b>N° Isolados</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cultura</b>	<b>Espécie</b>	<b>Bacteriocinas</b>
28	QC11	946Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
29	QC11	951Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
30	QC11	953Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	+
31	QC12	1011Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
32	QC13	1039Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
33	QC14	1071Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
34	QC12	1160Ec	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
35	QC12	1163Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
36	QC14	1181Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-
37	QC14	1196Ec	<i>Enterococcus faecium</i>	-