

JULIANA ESCARIÃO DA NÓBREGA

Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

N754b
2012

Nóbrega, Juliana Escarião da, 1976-
Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais / Juliana Escarião da Nóbrega. – Viçosa, MG, 2012.
ix, 115f. : il. (algumas col.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Queijo - Análise. 2. Queijo - Microbiologia. 3. Leite - Bacteriologia. 4. Biodiversidade. 5. Queijo-de-minas. 6. Microbiologia dos laticínios. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.3

JULIANA ESCARIÃO DA NÓBREGA

**BIODIVERSIDADE MICROBIANA, DESCRITORES
FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DOS QUEIJOS
ARTESANAIS FABRICADOS NAS REGIÕES DA SERRA
DA CANASTRA E DO SERRO, MINAS GERAIS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.**

APROVADA: 28 de fevereiro de 2012.

**Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)**

**Florence Valence-Bertel
(Coorientadora)**

Luciana Rodrigues da Cunha

Uelinton Manoel Pinto

**Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira
(Orientadora)**

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que permeia e conduz tudo que existe.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela excelente formação e oportunidades concedidas.

À Universidade Federal da Paraíba pelo apoio e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos durante meu estágio no Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Rennes, França.

À professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, pela orientação e apoio.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho pelo seu empenho em tornar meu doutorado uma experiência proveitosa e coesa. Pelo seu apoio e disponibilidade, sobretudo durante meu período de estágio no exterior.

Ao professor Uelinton Manoel Pinto por sua valiosa contribuição.

À professora Luciana Rodrigues da Cunha por sua amizade, companheirismo e total apoio ao longo de toda minha estada na Universidade Federal de Viçosa.

À professora Valeria Paula Rodrigues Minim por sua imprescindível contribuição.

Aos produtores de queijos artesanais e aos técnicos da EMATER das regiões da Serra da Canastra e Serro pelo apoio ao longo de toda a pesquisa.

À todos os amigos do Laboratório de Culturas Láticas.

À toda equipe do INRA/Rennes, pelo acolhimento, atenção, paciência e ensinamentos, especialmente a Anne-Marie Renouard, Florence Valence-Bertel, Marie-Noëlle Madec, Paulette Amet, Sandrine Parayre, Sylvie Lortal e Victoria Chuat.

À Milene Therezinha das Dores pelo apoio, amizade e companheirismo.

À minha família pelo estímulo, compreensão e apoio, sobretudo a Judi e Plínio, presentes em todas as horas.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT..... | viii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Queijos artesanais no Brasil..... | 3 |
| 2.1.1 Queijo de Coalho..... | 4 |
| 2.1.2 Queijo de Manteiga..... | 5 |
| 2.1.3 Queijo Marajó..... | 7 |
| 2.1.4 Queijo Serrano..... | 8 |
| 2.1.5 Queijo Caipira..... | 9 |
| 2.1.6 Queijo Minas | 9 |
| 2.2 Bactérias lácticas em queijos..... | 14 |
| 2.2.1 <i>Lactococcus</i> | 15 |
| 2.2.2 <i>Lactobacillus</i> | 15 |
| 2.2.3 <i>Leuconostoc</i> | 16 |
| 2.2.4 <i>Enterococcus</i> | 18 |
| 2.2.5 <i>Streptococcus</i> | 18 |
| 2.3 Microbiota não láctica em queijos..... | 19 |
| 2.4 Metodologias para identificação de BAL..... | 21 |
| 2.4.1 Métodos fenotípicos..... | 21 |
| 2.4.2 Métodos genotípicos..... | 22 |
| 2.5 Análise sensorial em queijos..... | 23 |
| 2.5.1 Análise sensorial descritiva..... | 23 |
| 3. Referências..... | 26 |
| CAPÍTULO 1 - Diversity and dynamics of the microbial community of two Brazilian farmhouse cheeses by culture-dependent and culture-independent methods..... | 41 |
| Abstract..... | 41 |
| 1. Introduction..... | 42 |
| 2. Material and methods..... | 43 |
| 2.1. Sampling procedure..... | 43 |
| 2.2. Physico-chemical and microbiological analyses..... | 44 |
| 2.3. TTGE analysis of cheese bacteriological composition..... | 44 |
| 3. Results..... | 45 |
| 3.1. pH and Gross composition of cheeses..... | 45 |
| 3.2. Microbial diversity using plate counts..... | 46 |
| 3.3. TTGE identification of low-GC content genome bactéria..... | 48 |
| 4. Discussion..... | 50 |
| 5. References..... | 53 |
| CAPÍTULO 2 - Biodiversidade de cocos autóctones isolados em queijos artesanais produzidos em Minas Gerais, Brasil..... | 56 |
| Abstract..... | 56 |
| Resumo..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 58 |
| 2. Material e métodos..... | 59 |
| 2.1. Amostragem, análises microbiológicas e isolamento de bactérias..... | 59 |
| 2.2. Identificação das espécies isoladas..... | 59 |
| 2.3. Análise de PFGE..... | 60 |
| 3. Resultados..... | 61 |
| 3.1. Quantificação, isolamento e identificação dos cocos mesofílicos..... | 61 |
| 3.2. Diversidade genética de <i>Enterococcus faecalis</i> | 63 |
| 4. Discussão..... | 66 |
| 5. Referências..... | 69 |
| CAPÍTULO 3 - Perfil sensorial dos queijos Minas artesanal produzidos na região da Serra da Canastra e Serro, MG..... | 73 |
| Abstract..... | 73 |
| Resumo..... | 74 |
| 1. Introdução..... | 75 |
| 2. Material e métodos..... | 76 |
| 2.1. Amostras..... | 76 |
| 2.2. Características físicas e visuais..... | 76 |
| 2.3. Características físico-químicas e microbiológicas..... | 76 |
| 2.4. Análise Sensorial..... | 77 |
| 2.4.1. Recrutamento e pré-seleção dos julgadores..... | 77 |
| 2.4.2. Desenvolvimento da terminologia descritiva..... | 77 |
| 2.4.3. Treinamento da equipe..... | 78 |
| 2.4.4. Seleção dos provadores..... | 78 |
| 2.4.5. Análise das amostras..... | 78 |
| 2.4.6. Análise estatística..... | 79 |
| 3. Resultados e discussão..... | 79 |
| 3.1. Características físicas e visuais dos queijos Canastra e Serro..... | 79 |
| 3.2. Características físico-químicas e microbiológicas..... | 80 |
| 3.3. Análise sensorial dos queijos Canastra e Serro..... | 81 |
| 3.3.1. Seleção dos julgadores e desenvolvimento da terminologia descritiva..... | 81 |
| 3.3.2. Perfil sensorial do queijo Canastra..... | 82 |
| 3.3.3. Perfil sensorial do queijo Serro..... | 85 |
| 3.3.4. Comparação do perfil sensorial do queijo Canastra e Serro.... | 89 |
| 4. Conclusão..... | 92 |
| 5. Referências..... | 94 |
| 6. CONCLUSÕES GERAIS..... | 96 |
| ANEXOS..... | 98 |

RESUMO

NÓBREGA, Juliana Escarião da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Florence Valence-Bertel.

O objetivo deste estudo foi caracterizar os queijos artesanais produzidos nas regiões da Serra da Canastra e do Serro. Avaliaram-se suas características físicas, visuais e físico-químicas. Foram quantificados os principais grupos de bactérias lácticas e isolados 271 clones a partir do meio M17 incubado a temperatura de 24 °C/3dias. A biodiversidade dos *Enterococcus faecalis* presentes foi investigada por intermédio da PFGE. A diversidade microbiana também foi estudada pelo método cultura-independente TTGE. O perfil sensorial dos queijos Canastra e Serro foi determinado pelo uso da análise descritiva quantitativa. Cocos e lactobacilos mesofílicos formam a microbiota dominante nos queijos Canastra e Serro na estação da chuva e da seca. A biodiversidade destes produtos, acessada pela TTGE indicou que o queijo Canastra possui maior diversidade e apresentou um total de 10 diferentes bandas, 3 das quais estiveram presentes em todos os queijos avaliados. No perfil TTGE do queijo do Serro, 8 diferentes bandas foram encontradas sendo que 1 esteve presente em todas as amostras avaliadas. O resultado da identificação dos 271 isolados em meio M17 confirma os resultados da TTGE e aponta uma maior diversidade de espécies no queijo Canastra. As espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc fallax* foram as mais frequentes no queijo Canastra enquanto no queijo do Serro as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis* foram as que mais se

destacaram. Dezesete perfis de PFGE foram identificados entre os isolados de *Enterococcus faecalis*, sendo que as estirpes encontradas foram específicas da propriedade rural na qual o queijo foi fabricado. Os queijos Canastra e Serro apresentaram formato cilíndrico, sem abaulamento na superfície e na lateral. Observaram-se também poucas olhaduras, com distribuição uniforme, do tipo mecânica no queijo Canastra e do tipo mecânica e microbiana no queijo do Serro. Os queijos do Serro apresentaram maior acidez e umidade que os queijos Canastra. Dezesesseis atributos assinalam o perfil sensorial dos 2 queijos, são eles: cor da casca, uniformidade da cor da casca, rugosidade da superfície, cor da massa, aroma amanteigado, de coalhada, de curral e de ranço, elasticidade, dureza, friabilidade, adesividade, gosto salgado, amargo e ácido e sensação picante. Quando comparado as médias do queijo Canastra e Serro estes dois queijos diferiram em 11 atributos sendo que os atributos que melhor os diferenciaram foram: cor da casca, aroma de curral e de ranço e gosto ácido.

ABSTRACT

NÓBREGA, Juliana Escarião da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Microbial biodiversity, physicochemical descriptors and sensory characteristics of artisan cheeses produced in the Serra da Canastra and Serro regions, Minas Gerais.** Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-Advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Florence Valence-Bertel

The objective of this study was to characterize artisanal cheeses produced in the Serra da Canastra and Serro regions. We evaluated their physical, visual and physicochemical properties. We quantified the main groups of lactic bacteria and isolated 271 clones from the M17 medium, incubated at the temperature of 24°C/3days. The biodiversity of the *Enterococcus faecalis* was investigated by PFGE. The microbial diversity was also studied by TTGE, an culture-independent method. The sensory profiles of Canasta and Serro cheeses were determined by means of quantitative descriptive analysis. Cocci and mesophilic lactobacilli formed the dominant microbiota in Canasta and Serro cheeses during the rainy and dry seasons. The biodiversity of these products, accessed by TTGE, indicated that the Canastra cheese had the greatest diversity and it had a total of 10 different bands, 3 of them found in all of the evaluated cheeses. In the TTGE profile of the Serro cheese, 8 different bands were found, 1 of them was present in all evaluated samples. The results of the identification of the 271 isolates in M17 medium confirm the results of the TTGE and indicate a greater diversity of species in the Canastra cheese. The species of *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* and *Leuconostoc fallax* were the most frequent in Canastra cheese, while the species of *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus faecalis* were the most common in Serro cheese. Seventeen PFGE profiles were identified among the

isolates of *Enterococcus faecalis*, and the identified strains were specific to the farm where the cheese was made. The Canastra and Serro cheeses are characterized by cylindrical shape, without bulging on the surface and side, and uniform distribution of little eyelet holes of mechanical kind in Canastra cheese and mechanical and microbial kind in Serro cheese. The Serro cheeses had higher acidity and moisture level than the Canastra cheeses. We selected 16 attributes for the sensory characterization of the two cheeses: skin color; skin color uniformity; surface roughness; mass color; buttery, curd, barnyard and rancid aroma; elasticity; hardness; friability; stickiness; salty, bitter and sour taste; and spicy flavor. Evaluating the averages of Canasta and Serro cheeses data, they differed in 11 attributes, but the ones that best differentiated and distinguished them were: skin color, barnyard and rancid aroma, and sour taste.

1. Introdução Geral

A valorização do queijo artesanal constitui um eixo importante para o desenvolvimento de um grande número de propriedades rurais no Brasil e uma estratégia de valorização de recursos locais. No estado de Minas Gerais, a produção da variedade artesanal conhecida como queijo Minas artesanal é realizada, a partir de leite de vaca cru, em pequenas propriedades rurais com mão-de-obra familiar. Emprega tecnologia simples, que inclui a adição de fermento endógeno e coalho industrializado em leite recém-ordenhado, prensagem manual e salga a seco seguida de maturação por tempo variável, mas normalmente inferior a 30 dias.

A região da Serra da Canastra compreende 7 municípios que abrigam 1.529 produtores de queijo Minas artesanal que, nesta região, recebe o nome de queijo Canastra. Juntos, estes produtores fabricam por ano 5.787 toneladas deste produto. Dez municípios compõem a região do Serro. Protegida por uma Indicação de Procedência para a produção do queijo Minas artesanal, denominado queijo do Serro, esta região fabrica 3.106 toneladas anualmente deste queijo entre seus 881 produtores (EMATER, 2008).

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados nas regiões produtoras destes queijos, no intuito de diagnosticar as condições em que são produzidos, as etapas de fabricação e a forma como são maturados (Dores, 2007; Nóbrega, 2007; Martins, 2006; Ornelas, 2005; Pinto, 2004). Porém, poucas informações estão disponíveis quanto à biodiversidade encontrada nestes produtos e o que os diferenciam quanto as suas características sensoriais.

A caracterização dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Canastra e Serro poderá fornecer aos produtores destas regiões, descritores para os referidos produtos, facilitando assim o estabelecimento de normas e requisitos a serem seguidos para a sua produção. Este conhecimento é necessário para proteção e reconhecimento destes queijos

como produto tradicional, seguro e de qualidade. O objetivo deste trabalho foi determinar os descritores físico-químicos, microbiológicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e Serro, Minas Gerais.

2. Revisão de Literatura

2.1. Queijos artesanais no Brasil

Dados históricos apontam como provável marco inicial da indústria queijeira no Brasil a granja leiteira instalada nas cercanias do colégio fundado pelos jesuítas na cidade de São Salvador, Bahia. Esta informação consta na carta escrita pelo padre Manoel da Nóbrega ao padre provincial de Portugal no ano de 1552 (Dias, 2010). Todavia, somente no ano de 1888 foi instalada no Brasil uma indústria queijeira com moldes empresariais, no estado de Minas Gerais. Neste mesmo século (1897) surgiu no estado do Piauí a segunda queijaria brasileira e, primeira da região Nordeste. No ano de 1907 surge a terceira queijaria do país, no interior do Rio Grande do Sul.

Pela localização das 3 primeiras indústrias laticinistas implantadas no Brasil, presume-se que a produção de leite havia, já naquela época, se dispersado por quase todo o território nacional. Esta é uma característica da pecuária leiteira nacional apontada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cuja produção se dá em 554 microrregiões das 558 existentes no país. Outra característica marcante é que não há um padrão de produção. Existem, desde propriedades de subsistência, sem tecnologia apropriada e produção diária inferior a 10 litros, até produtores com tecnologias avançadas, cuja produção diária é superior a 60 mil litros (Zoccal et al, 2007).

A produção artesanal de queijos no Brasil, por seu caráter informal, constitui uma atividade muito pouco documentada. Porém, a prática queijeira, ao longo de sua história, se difundiu nas fazendas e pequenas propriedades rurais por todo território nacional, gerando produtos variados e muito apreciados por seus consumidores. É possível destacar-se, pelo menos um tipo de queijo artesanal em cada região geográfica do Brasil (Fig. 1). Queijos estes, cuja importância não se limita apenas as suas qualidades sensoriais, mas que refletem a história e a tradição de quem os produz em um conhecimento passado de geração em geração.

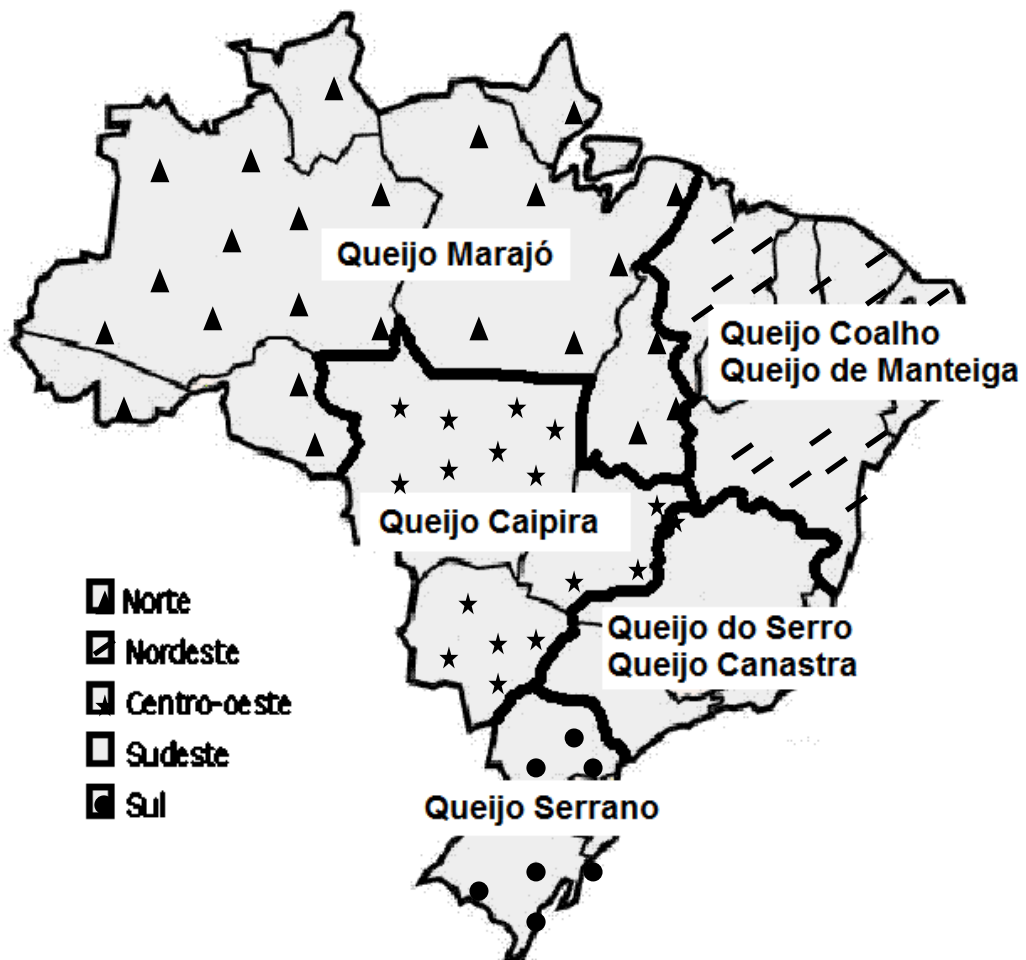


Figura 1. Mapa do queijo artesanal no Brasil por região geográfica

2.1.1. Queijo de coalho

O queijo de coalho é um produto tipicamente nordestino cuja apreciação pelos consumidores ultrapassa as barreiras geográficas da região que lhe deu origem. É produzido em todos os estados do Nordeste, no entanto, algumas regiões tem se destacado ao longo dos anos por fabricarem produtos com características sensoriais diferenciadas, a exemplo do Vale do Jaguaribe no Ceará, o Sertão do Seridó no Rio Grande do Norte e o Agreste em Pernambuco (Fontenele et al, 2010). Existe uma grande

carência de dados oficiais que reportem o volume de produção desse queijo, porém, alguns estudos apontam que em determinados estados, como no caso de Pernambuco (Escobar et al, 2001) a produção do queijo de coalho artesanal chega a consumir até 50% de todo o leite produzido. Este valor pode ser traduzido em, pelo menos, 400 mil litros de leite diariamente (Menezes, 2009).

Do ponto de vista tecnológico, o processo de fabricação do queijo de coalho é relativamente simples. O leite cru é coagulado enzimaticamente e não se faz uso de culturas iniciadoras ou fermentos endógenos. Entretanto, variações podem ser observadas no fluxograma de produção, dependendo do local onde o mesmo é fabricado. Nos dias de hoje, por exemplo, ainda é possível encontrar, em algumas fábricas, o uso do coalho natural, obtido do estômago de pequenos animais, em detrimento ao coalho industrializado (Nascimento et al, 2001).

O tempo de mexedura, após a quebra da coalhada, o tipo de salga, a seco ou na massa, o tipo de prensagem, manual ou mecânica são exemplos da variabilidade no processo. Destaca-se também, a retirada e aquecimento de parte do soro que logo em seguida é reincorporado a massa, prática adotada por uma considerável parte dos produtores e, identificada por Nascimento et al. (2001) como uma mudança tecnológica que se reflete em um aumento da vida útil do produto quando comparado aos queijos de massa crua. O queijo de coalho é encontrado em formato retangular e cilíndrico com peso em torno de 1 kg (Bastos et al, 2010). A maturação é praticamente inexistente, sendo que alguns produtores mantêm o produto a temperatura ambiente até o momento da comercialização, enquanto que outros os mantêm sob refrigeração (Escobar et al, 2001; Pires et al, 1994, Aquino, 1983).

2.1.2. Queijo de manteiga

A origem do queijo de manteiga não está bem documentada, porém acredita-se que a mesma é consequência de adaptações de várias influências tais como a portuguesa e espanhola que introduziram o queijo precursor do queijo Coalho e africana, que trouxe para o Brasil o *Ghee*, produto originado da desidratação do creme de leite, conhecido no Nordeste como manteiga de garrafa ou manteiga da terra (Ventura, 1987).

O queijo de manteiga é uma importante alternativa para o aproveitamento do leite nas pequenas propriedades rurais no Nordeste do Brasil e constitui uma forma de conservação do leite e da manteiga que apresenta uma boa resistência as adversidades ambientais, sobretudo as altas temperaturas, típicas da região. Essa capacidade de conservação é devido ao intenso tratamento térmico empregado e do desenvolvimento de uma película oleosa que se forma quando o produto é colocado nas condições ambientes. Possui formato cilíndrico ou retangular, peso variável entre 1 e 15 kg e sua cor varia do branco-palha ao caramelo (Aquino, 2011; Cavalcante et al, 2005; Ventura, 1987).

A fabricação do queijo de manteiga no Nordeste se dá em maior escala nos estados de Alagoas, Sergipe, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Nassu et al, 2003). Este produto recebe outras denominações de acordo com o lugar específico onde é produzido, tais como queijo manteiga, requeijão crioulo, requeijão do Norte, requeijão do Nordeste e requeijão do sertão (Cavalcante et al, 2005; Ventura, 1987).

O queijo de manteiga artesanal é obtido a partir de leite cru, normalmente desnatado, deixado a coagular espontaneamente, cuja massa é submetida a dessoragem, lavagem e fusão. Assim como o queijo coalho, sua tecnologia de fabricação apresenta grande variabilidade (Ventura, 1987). Apresenta como etapas comuns: a coagulação microbiana do leite desnatado, dessoragem da massa, desacidificação e lavagem da massa com água e/ou leite, salga, fusão da massa com manteiga da terra e moldagem. Trata-se de um produto de consumo imediato e, normalmente é

armazenado a temperatura ambiente na própria sala de fabricação até o momento da comercialização (Aquino, 2011; Ventura, 1987).

2.1.3. Queijo do Marajó

O queijo do Marajó, obtido a partir do leite de búfala, representa uma importante atividade econômica em municípios localizados na ilha do Marajó, nos quais, vigoram a produção de forma artesanal (Blaskovsky et al, 2010). A história do búfalo doméstico no Brasil data de 1895 e teve como reduto inicial a ilha do Marajó no Pará, que abriga nos dias atuais, 62,3 % do rebanho brasileiro (Vieira et al, 2011; Sousa et al, 2002).

Estima-se que existam sessenta queijarias na ilha com produção de 500 a 1000 quilos de queijo/mês/queijaria e geração de 480 empregos diretos e indiretos (Silva e Oliveira, 2003). A fabricação desse produto já era uma tradição mesmo antes da introdução dos bubalinos, sendo fabricado naquela época, a partir do leite de vaca (Figueiredo, 2006). Este fato, aliado a semelhança de tecnologia com o queijo de Manteiga e a proximidade da ilha com a região Nordeste, indica a possibilidade destes produtos possuírem uma origem comum.

O queijo do Marajó, também é denominado de queijo Marajó, queijo Marajoara ou requeijão Marajoara. Possui massa compacta, peso entre 1 kg e 10 kg, apresenta textura macia, superfície externa com coloração amarelo-esverdeada e parte interna com cor branca e aroma agradável, sendo levemente ácido e salgado. Seu consumo é imediato e a maior parte da produção é destinada a Belém, capital do estado do Pará (Lourenço, 1999). Pode ser definido como um produto obtido pela coagulação espontânea do leite de búfala, desnatado, não pasteurizado (Figueiredo et al, 2011). Destacam-se duas variedades deste queijo, o tipo creme (quando o cozimento da massa é feito adicionando-se o creme obtido do desnate) e o queijo tipo manteiga (quando em seu cozimento é adicionado a manteiga

propriamente dita) (Lourenço et al, 2002). Figueiredo et al (2011) apontam como grande entrave ao desenvolvimento da cadeia produtiva do queijo Marajó, a ausência de padrões e legislação específica, favorecendo desta forma a comercialização clandestina.

2.1.4. Queijo Serrano

O queijo Serrano é produzido em uma região conhecida como Campos de Altitude no sul do Brasil e abrange a área do Planalto Sul Catarinense, estado de Santa Catarina, e Campos de Cima da Serra no estado do Rio Grande do Sul, totalizando 32 municípios. Com uma tradição secular, o queijo Serrano é uma das principais fontes de renda das famílias de pequenos pecuaristas e costuma representar mais da metade da renda familiar total (Vitrolles, 2011; Menezes, 2009; Ide e Benedet, 2001).

Acredita-se que a história do queijo Serrano iniciou-se ainda no século XVIII no Rio Grande do Sul onde era utilizado como moeda de troca pelos tropeiros que desciam a serra nas suas incursões as outras regiões do estado e a Santa Catarina para adquirirem sal, açúcar, farinha de mandioca, entre outros mantimentos (Vitrolles 2011; Cruz et al, 2008). O queijo Serrano apresentava um formato circular e pesava até 20 Kg, requerendo um período de maturação que variava entre 2 a 6 meses (Menezes, 2009).

A tradição da produção do queijo Serrano foi transmitida de geração em geração, porém observa-se que ao longo dos anos, esta sofreu modificações (Córdova et al, 2010). No que diz respeito ao seu formato, hoje é possível encontrar o queijo Serrano no formato retangular e mesmo quadrado. Seu tamanho diminuiu e, cada peça do produto pesa entre 500 e 1500 g. O tempo de maturação também foi reduzido e usualmente, o queijo Serrano hoje é consumido após poucos dias (entre 5 e 15 dias) de maturação (Krone e Menasche, 2010; Menasche e Krone, 2010; Cruz et al, 2008).

Uma característica marcante na produção do queijo Serrano é o tipo de leite utilizado, obtido de raças bovinas especializadas na produção de carne, alimentadas com pastagens de campo nativo, cuja produção é inferior a 5 litros de leite por vaca/dia (Menasche e Kroner, 2010). No entanto, segundo Krone e Menasche (2010) é clara a preferência dos produtores ao bovino de corte em função da facilidade no manejo.

2.1.5. Queijo Caipira

A exploração pecuária no estado do Mato Grosso do Sul esteve sempre voltada à produção de carne, sendo que a baixa produtividade de leite era aproveitada para a produção de um queijo artesanal denominado entre os produtores de queijo Caipira, em um processo semelhante àquele descrito para o queijo Serrano no sul do país (Menezes, 2009). Não foi encontrado na literatura nenhum dado a respeito da sua produção e características, porém o fato de possuir legislação própria desde 2004 (Lei estadual 2.820, de 04 de maio de 2004), sugere se tratar de um produto já bem estabelecido na tradição e costumes local.

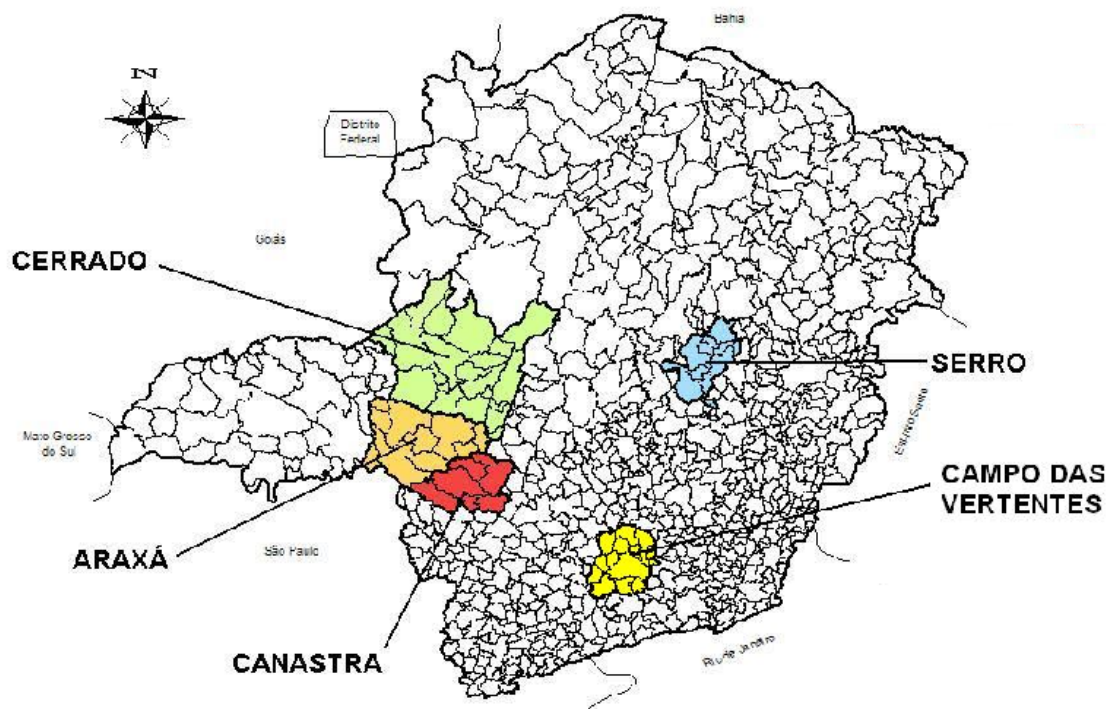
2.1.6. Queijo Minas artesanal

Documentos do início do século XVIII demonstram, já naquela época, a prática da fabricação artesanal de queijo em Minas Gerais. Exploradores portugueses que partiram para as regiões das minas no Brasil Central em busca de ouro levaram a prática da elaboração do queijo, baseado na técnica portuguesa do queijo Serra da Estrela, desenvolvendo, sobretudo o chamado Queijo Minas a partir do leite de vaca cru (Meneses, 2006; Saint-Hilaire, 1975). Após a decadência da mineração, o queijo se estruturou na economia local, e sua prática, transmitida por diversas gerações,

transformou-se em uma herança culturalmente difundida na região (Menezes, 2009).

O início do século XXI, aproximadamente três séculos após o começo da fabricação do queijo Minas, ficou marcado na história desse produto por várias ações importantes que tem colaborado para o fortalecimento da cadeia produtiva como um todo. Em 2001, o Ministério Público interditou a comercialização do queijo artesanal gerando uma grande mobilização por parte dos produtores que contaram com o apoio de diversas entidades públicas e privadas. Como resultado desse movimento, inúmeras ações tiveram início, dando origem a elaboração, aprovação e regulamentação da Lei Estadual nº 14.185, em 31 de janeiro de 2002, legislação específica para o queijo artesanal.

Destaca-se também o importante estudo histórico, agrogeológico e edafoclimático, para identificação e caracterização das regiões tradicionalmente produtoras do Queijo Minas Artesanal no estado, realizado pela EMATER-MG. Foram identificadas inicialmente 4 regiões (Araxá, Canastra, Cerrado e Serro) que se estendem por 47 municípios. Mais recentemente, no ano de 2009, foi identificada oficialmente a região de Campos das Vertentes, composta por 15 municípios, como também produtora do queijo Minas artesanal, totalizando 62 municípios no estado de Minas Gerais, reconhecidamente tradicionais na produção deste produto (Fig. 2). Juntas, estas regiões contam com 9.445 produtores que fabricam 29.005 toneladas de queijo por ano e geram 26.792 empregos diretos (EMATER, 2008; EMATER, 2004; EMATER, 2004a). Porém, o número de municípios aptos a produzirem o queijo Minas artesanal foi ampliado para aproximadamente 600 municípios, desde janeiro de 2011, com a entrada em vigor da Lei estadual nº 19.492 que considera queijo Minas artesanal o queijo produzido no estabelecimento rural que produziu o leite, sem que, a propriedade em questão esteja situada em regiões anteriormente definidas como tradicionais.



Fonte: EMATER, 2008

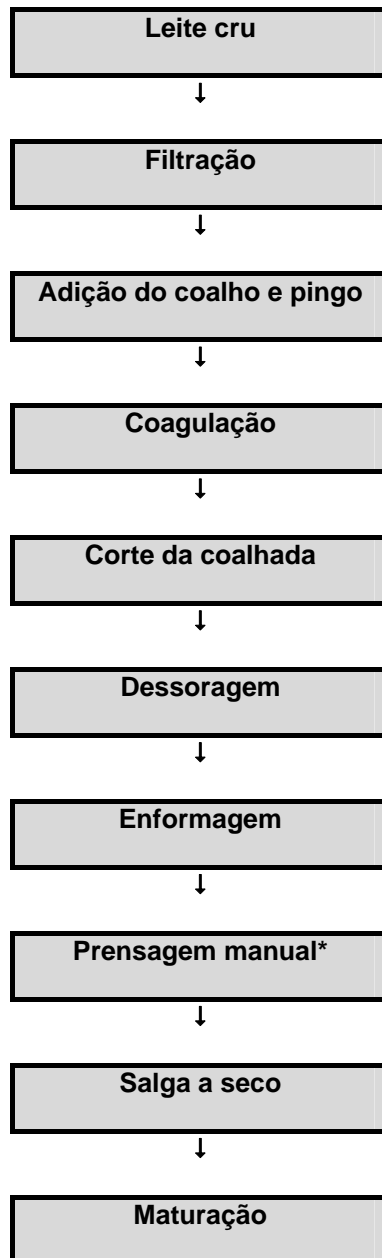
Figura 2. Regiões tradicionalmente produtoras de queijo Minas artesanais

Outra ação que contribuiu para o reconhecimento e afirmação da tradição dos queijos artesanais mineiros foi o título de Patrimônio Cultural do Brasil conferido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) no ano de 2006. Cabe ressaltar que o queijo Minas artesanal fabricado na cidade do Serro já constava como Patrimônio Cultural do estado de Minas Gerais desde o ano de 2002.

Os queijos Minas artesanal do estado de Minas Gerais são fabricados com tecnologias semelhantes. Estudos demonstram que a diferença básica entre os queijos fabricados nas regiões de Araxá, Canastra, Cerrado e Serro reside no fato que na região do Serro, a prensagem manual ocorre sem o auxílio de tecido, como acontece nas outras três regiões (Dores, 2007; Martins, 2006; Araújo, 2004; EMATER, 2003). Porém, as características finais do queijo (e nome) variam conforme a região do estado onde é produzido.

Além do coalho e do sal, os produtores artesanais utilizam um fermento endógeno, como coadjuvante à produção do queijo. Diariamente, após enformagem e salga do queijo, parte do soro eliminado é coletado e adicionado à produção subsequente. Esse fermento endógeno, comumente conhecido como pingo, contém diversos grupos microbianos que ajudam a direcionar a fermentação e maturação do queijo (Nóbrega, 2007). Essa prática insere ao produto uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado e confere ao queijo características sensoriais diferenciadas e endêmicas.

Os queijos Minas artesanal possuem formato cilíndrico e peso de aproximadamente 1 Kg. Sua maturação é realizada a temperatura ambiente por um período quase nunca superior a 8 dias pela grande maioria dos produtores. Na figura 3 está representado o fluxograma de produção e apontado a principal diferença em sua fabricação de acordo com a região.



* Realizada com o auxílio de tecido nos queijos Canastra, Araxá e Cerrado.

Fonte: Nóbrega, 2007

Figura 3. Fluxograma do processamento do queijo Minas artesanal produzido nas regiões de Araxá, Cerrado, Serra da Canastra e Serro

2.2. Bactérias do ácido lático em queijos

Bactérias do ácido lático (BAL) são micro-organismos Gram-positivos, não esporulados, sob a forma de cocos, bacilos ou cocobacilos. Não possuem catalase, embora algumas espécies possam produzir uma pseudo-catalase quando crescidas em meio com baixa concentração de açúcar. Quanto ao seu metabolismo, BAL convertem glicose principalmente em ácido lático (homofermentativas) ou em ácido lático, CO₂, etanol e/ou ácido acético (heterofermentativas) (Ferreira, 2003).

São amplamente utilizadas na fermentação de carnes, vegetais, frutas, bebidas e produtos lácteos. Sua importância na tecnologia de queijos advém da capacidade de produzir ácido lático a partir de açúcar, utilização de citrato, degradação de proteínas, lipídeos e esters. Seis gêneros estão associados a produtos lácteos, são eles: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (Pot, 2008; Wouters, 2002).

A microbiota láctica em queijos compreende o grupo de bactérias *starters* e *não-starters*. Bactérias *starters* podem ser definidas como BAL cuja produção de ácido é suficiente para reduzir o pH do leite para valores inferiores a 5,3 em 6h a 30-37 °C . Podem ser adicionadas no início da fabricação ou serem contaminantes naturais do leite, ambiente de ordenha e fabricação (Beresford et al, 2001). Sua função primária é produzir ácido durante o processo de fermentação, porém também contribuem para a maturação do queijo onde suas enzimas estão envolvidas na proteólise e conversão de aminoácidos em compostos aromáticos. As espécies de bactérias *starters* mais frequentes pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Fox e Wallace, 1997).

Lactobacillus e *Pediococcus* são considerados os principais gêneros de BAL *não-starters* presentes em queijos e, durante a maturação, podem atingir níveis de até 10⁸ ufc/g (Cogan et al, 2007). Não contribuem para a produção de ácido durante a fabricação do queijo, mas por outro lado,

desempenham importante papel na formação do aroma e sabor dos queijos maturados (Beresford e Williams, 2004).

2.2.1. *Lactococcus*

São os microrganismos mesofílicos mais usados para produção de ácido em produtos lácticos, pois convertem rapidamente a lactose em ácido láctico. Crescem a 10⁰C, mas não a 45⁰C, com uma temperatura ótima em torno de 30⁰C. Não crescem em presença de 6,5% de NaCl, nem em pH 9,6. O gênero *Lactococcus* se constitui atualmente de seis espécies, porém apenas a espécie *L. lactis* é significativa na fermentação de produtos lácticos (Cho et al, 2008).

L. lactis subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* são abundantes em queijos frescos de massa não cozida e sua presença tem conseqüências determinantes para a maturação. Além da transformação da lactose em ácido láctico, produzem metabólitos secundários que contribuem para formação do aroma e possuem um complexo sistema proteolítico (Euzéby , 2010; Choisy et al, 2008; Teuber e Geis, 2006). Os *Lactococcus* produzem determinados compostos antagônicos, dentre os quais podemos citar as bacteriocinas, que são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antagônica contra espécies homólogas, podendo também apresentar um amplo espectro de ação contra uma variedade de microrganismos Gram-positivos (Moreno et al, 1999).

2.2.2. *Lactobacillus*

Lactobacillus é um dos gêneros mais importantes de BAL e foi descrito por Beijerinck em 1901. Possuem a forma de bacilo ou cocobacilo, frequentemente organizados em cadeia. São fermentativos, aerotolerantes, mas crescem melhor em condições de anaerobiose (microaerófilos). Como

são produtores de ácido láctico, preferem condições relativamente ácidas (pH 5,5 a 6,5) (Singh et al, 2009; Pot, 2008).

Constitui um grupo bastante heterogêneo que atualmente conta com mais de 160 espécies descritas (Euzeby, 2010). Nos anos 60 foram divididos em três principais grupos (Sharpe, 1962) de acordo com o produto final de sua fermentação: grupo I (*Lactobacillus* obrigatoriamente homofermentativos), importante por conter a maioria das espécies empregadas como culturas *starters* (Tamime, 2002). A este grupo pertencem os lactobacilos mais acidofílicos (toleram pH 2,7) e termofílicos (resistem temperaturas próximas de 40 a 53⁰C), como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lb. helveticus*, utilizados como culturas iniciadoras em diversas variedades de queijo tais como Emmental, Provolone, Gorgonzola, Mussarela, entre outros (Bernadeau et al, 2008; Coeuret et al, 2003; Dellaglio et al, 1994).

No grupo II (*Lactobacillus* heterofermentativos facultativos) encontram-se os lactobacilos mesofílicos que utilizam outras fontes de carbono além de hexoses. Fermentam pentoses produzindo ácido láctico e acético. Este grupo inclui *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, e *Lb. plantarum*, consideradas BAL *não starters* (Beresford e Williams, 2004) e são frequentemente isolados em queijos artesanais tais como Manchego (Nieto-Arribas et al, 2009), Raschera (Dolci et al, 2008) e Saler (Callon et al, 2004).

O grupo III (*Lactobacillus* obrigatoriamente heterofermentativos) é composto por lactobacilos mesofílicos que fermentam hexoses produzindo ácido láctico, ácido acético ou etanol e CO₂. A fermentação de pentoses resulta em ácido láctico e ácido acético. O grupo é caracterizado pela capacidade acidificante fraca e inclui as espécies: *Lb. brevis* e *Lb. fermentum*.

2.2.3. Leuconostoc

Os *Leuconostoc* foram isolados a partir de produtos lácticos em 1912 por Beijerinck. Hoje, o gênero inclui 22 espécies sendo que *Leuconostoc mesenteroides* foi a primeira a ser descrita e compreende três subespécies: *mesenteroides*, *dextranicum* e *cremoris*. (Euzeby, 2010; Pot, 2008; Devoyod e Poullin, 1988).

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são diferenciadas das outras BAL por serem cocos heterofermentativos. Apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20 °C a 30 °C (Choisy, 2008). Estudos fisiológicos indicam que esses microrganismos são BAL próximas às espécies pertencentes ao grupo de *Lactobacillus*, sendo diferenciados pela morfologia e pela exclusiva produção de D-lactato a partir de glicose (Ogier et al, 2008).

As principais espécies associadas com produtos lácticos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis* (Ogier et al, 2008; Devoyod e Poullin, 1988). Durante a fermentação, produtos do metabolismo dos carboidratos contribuem para preservação do produto, porém sua principal importância tecnológica diz respeito à formação do aroma e textura graças as suas propriedades metabólicas, principalmente a produção de CO₂ e a síntese de diacetil (Bourel et al, 2001).

Cogan e colaboradores (1997) em um extenso estudo com produtos lácteos europeus constataram que 10% dos isolados identificados eram *Leuconostoc*. Eles estão naturalmente presentes em uma grande variedade de queijos fabricados a partir de leite cru ou são intencionalmente adicionados na forma de culturas iniciadoras (Ogier et al, 2008; Devoyod e Poullain, 1988). Algumas espécies de *Leuconostoc* tais como *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc paramesenteroides* produzem bacteriocinas, porém a sua aplicação industrial na preservação de alimentos ainda não foi reportada (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004; Stiles, 1994; Klaenhammer, 1993).

2.2.4. *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* foi proposto por Schleifer e Kilpper-Balz (1984) para acomodar os estreptococos fecais, do grupo D Lancefield. Hoje, são reconhecidas 40 espécies (Euzeby, 2010) das quais *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* são as mais comumente encontradas em leite e derivados.

É o gênero de BAL mais controverso e por este motivo não é considerado GRAS (geralmente reconhecido como seguro), pois alguns estudos o apontam como patógeno emergente para humanos. Por outro lado, *Enterococcus* ocorrem em uma grande variedade de queijos, especialmente queijos artesanais, sendo considerados como essenciais para a formação de flavor em muitos queijos fabricados no sul europeu (Foulquié Moreno et al, 2006). Bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas, incluindo bactérias formadoras de esporos e bactérias patogênicas como *Listeria* spp. Estas bacteriocinas têm sido motivo de investigação pela possibilidade de serem empregadas na biopreservação dos alimentos devido principalmente às características de resistência ao calor e à atividade em ampla faixa de pH (Cleveland et al. 2001; Giraffa, 1995).

2.2.5. *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* foi descrito pela primeira vez em 1884 por Rosenbach, desde então tem passado por vários rearranjos taxonômicos e, na década de 80, subdividido em 3 gêneros: *Streptococcus* stricto sensu, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Pot, 2008; Kohler, 2007).

Do ponto de vista tecnológico, *Streptococcus thermophilus* é a espécie mais importante do gênero e é considerada a segunda cultura *starter* industrial vindo logo após *Lactococcus lactis* (Hols et al, 2005). Trata-se de uma BAL termofílica com capacidade de fermentar e converter rapidamente a lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do

pH, possui também a capacidade de produzir metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (Delorme, 2008; Shene et al, 2008; Ivanova et al, 1998). Tem sido tradicionalmente utilizada para a produção de iogurte e vários tipos de queijos tais como Mussarela, Cheddar, Emmental, Gruyère, Parmigiano, entre outros (Delorme, 2008).

A espécie *Streptococcus macedonicus*, descrita pela primeira vez no final da década de 90, isolada em queijos gregos (Kasseri), tem despontado como uma potencial cultura iniciadora em função das suas características fisiológicas e tecnológicas (Vuyst e Tsakalidou, 2008; Tsakalidou et al, 1998). Trata-se de um microrganismo termofílico, homofermentativo e possui o status de não-patogênico, moderadamente acidificante, proteolítico e lipolítico, algumas estirpes produzem bacteriocinas (Lombardi et al, 2004; Anastasious et al, 2007; Vuyst e Tsakalidou, 2008). Desde a sua descrição, tem sido detectado em vários queijos italianos, franceses e gregos (Georgalaki et al, 2009; Callon et al, 2004; Lombardi et al, 2004, Poznanski et al, 2004; Baruzzi et al, 2002) .

2.3. Microbiota não-lática em queijos

A classe *Actinobacteria* inclui vários gêneros cujas espécies são de interesse para a indústria de laticínios, principalmente na produção de queijos. Neste grupo amplo e heterogêneo podem-se encontrar espécies aeróbicas, tais como as pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Brevibacterium* e *Corynebacterium*, isoladas da superfície de queijos maturados (*smear-cheeses*), assim como, espécies anaeróbicas, pertencentes ao gênero *Propionibacterium* (Choisy, 2008; Denis e Irlinger, 2008; Meile et al, 2008).

Bactérias do gênero *Micrococcus*, *Brevibacterium* e *Corynebacterium* são denominadas genericamente bactérias de superfície e representam uma parte importante da microbiota superficial de diversos tipos de queijos

tais como Tilsit, Limburgo e Appenzeller, contribuindo para a formação da textura, aroma e cor (Hoppe-Seyler et al., 2007; Bockelmann e Hoppe-Rademaker et al., 2005; Seyler, 2001).

No gênero *Propionibacterium* quatro espécies são consideradas de interesse para a indústria laticinista: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* e *P. thoenii* (Meile et al, 2008; Britz e Riedel, 1994). Em presença de lactato, produzem grande quantidade de propionato acompanhado de acetato e CO₂. A presença de bactérias propiônicas endógenas ou adicionadas ao leite na forma de fermento é indispensável para inferir as características essenciais de sabor e textura de vários queijos de massa cozida como Gruyère e Emmental (Choisy, 2008; Thierry et al, 2004; Ferreira, 2003).

Mofos contribuem para a maturação de uma grande variedade de queijos. Segundo a tecnologia empregada, atuam seja na superfície do queijo, a exemplo do *Penicillium camemberti* (queijos Camembert e Brie), seja no interior, como *Penicillium roqueforti*, em queijos como Roquefort, Gorgonzola e Stilton. Possuem uma forte atividade bioquímica e tem importante contribuição para a formação de aroma e sabores típicos, assim como na modificação do corpo e estrutura do queijo (Beresford e Williams, 2004; Wouters, et al, 2002; Beresford et al, 2001).

Leveduras ocorrem naturalmente em vários queijos, sobretudo em queijos fabricados a partir de leite cru. Usualmente, são detectadas em grande quantidade, refletindo uma boa adaptação ao substrato rico em proteínas, lipídios, açúcar e ácidos orgânicos. Sua ampla distribuição é consequência da sua atividade lipolítica e proteolítica, da habilidade em fermentar/assimilar lactose, de utilizar ácidos orgânicos, da capacidade de crescimento em baixas temperaturas e baixa atividade de água e resistência a compostos de limpeza e sanificação (Fadda et al, 2004; Praphailong e Fleet, 1997; Jakobsen e Narvhus, 1996; Fleet, 1990).

A ocorrência de leveduras em queijos é esperada, devido ao baixo pH, baixa umidade, elevada concentração de sal e estocagem sob

refrigeração desses produtos (Fleet, 1990). Entre as espécies encontradas, as mais freqüentes pertencem aos gêneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* e *Rhodotorula*, detectadas em diferentes estágios da fabricação e em diferentes tipos de queijos (Larrent et al, 1991).

Hoje, já é reconhecida a importante contribuição das leveduras no processo de maturação de queijos, em que linhagens de *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, frequentemente estão presentes em concentrações elevadas (Ferreira e Viljoen, 2003). As leveduras contribuem para o desenvolvimento do sabor, aroma e textura devido à proteólise, lipólise, utilização de ácido láctico, fermentação da lactose e autólise da sua biomassa (Fleet, 2007; Nuñez et al, 1981).

2.4. Metodologias para identificação de BAL

2.4.1. Métodos fenotípicos

Os protocolos para identificação de BAL por métodos fenotípicos normalmente incluem análises microscópicas, testes fisiológicos e bioquímicos. A análise microscópica é a primeira etapa na identificação das BAL e fornece informações a respeito da morfologia e pureza dos isolados. Normalmente é acompanhada do método tintorial de Gram que permite a distinção entre os dois principais grupos de bactérias, organismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo que todos os gêneros de BAL pertencem ao grupo Gram-positivo. Porém, as condições e o estágio de crescimento podem interferir na morfologia da célula bacteriana, induzindo a erros de interpretação, além disso, alguns *Lactobacillus* mesofílicos podem exibir uma morfologia cocobacilar semelhante a morfologia do gênero *Leconostoc*. (Pot, 2008).

A base para classificação das BAL foi elaborada por Orla-Jensen em 1919 e incluía critérios fisiológicos e bioquímicos utilizados até os dias atuais tais como: modo de fermentação da glicose (homo ou

heterofermentação), crescimento em diferentes temperaturas e concentrações de NaCl e utilização de diferentes açúcares (Stiles e Holzapfel, 1997).

2.4.2. Métodos genotípicos

Até recentemente, para identificação microbiana, o isolamento de culturas puras, seguido por múltiplos testes fisiológicos e bioquímicos era a única metodologia disponível (Lévêque et al, 2008; Amann et al, 1995). Embora estes métodos possam ser razoavelmente sensíveis, nem sempre conduzem a uma discriminação ao nível de espécie ou estirpe, nem detectam relações filogenéticas entre certos grupos (Randazzo et al, 2009). Atualmente, existe um grande número de técnicas genotípicas que permitem o estudo das comunidades microbianas e são divididas em: (1) técnicas cultivo-dependente, baseada no cultivo seguido por identificações ao nível fenotípico e genotípico e (2) técnicas que não requerem o cultivo e isolamento prévio da microbiota. Estas técnicas cultivo-independente são especialmente importantes para identificação de microrganismos que não crescem *in vitro* (Randazzo et al, 2009; Jany e Barbier, 2008).

O grande número de sistemas disponíveis para tipagem bacteriana variam quanto à acurácia, reprodutibilidade e habilidade de discriminação de estirpes bacterianas e devem ser escolhidos de acordo com o objetivo pretendido, custos, disponibilidade de tempo e equipamentos (Pot, 2008). Os métodos mais utilizados para identificação intra-específica de isolados de BAL em queijos são eletroforese de campos pulsados (PFGE) (Jurkovic et al, 2007; Psoni et al, 2003), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Randazzo et al, 2008; Cronin et al, 2007; Bizarro et al, 2000), ribotipagem (Kongo et al, 2007; Giraffa e Neviani, 2000) e seqüenciamento (Dolci et al, 2008; Fortina et al, 2003).

Estratégias para investigação direta da comunidade microbiana têm sido desenvolvidas, mas poucas têm uso corrente (Jany e Barbier, 2008). As técnicas TTGE (eletroforese em gradiente de temperatura e tempo) e

DGGE (gel de eletroforese em gradiente desnaturante) desenvolvidas na década de 1990 (Muyzer et al, 1998; Muyzer, 1993) têm sido amplamente utilizadas para o estudo da diversidade em queijos artesanais (Casalta et al, 2009; El Baradei et al, 2007; Florez e Mayo, 2006) por se tratarem de uma ferramenta capaz de monitorar mudanças espaciais/temporais da comunidade microbiana fornecendo uma visão ampla e simplificada das espécies microbianas presentes em uma amostra (Randazzo et al, 2009).

2.5. Análise sensorial em queijos

A análise sensorial é definida como a área científica multidisciplinar usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais da forma como são percebidas pelos sentidos da visão, audição, olfato, tato e paladar (ABNT, 1993). A utilização correta da tecnologia sensorial disponível leva a obtenção de resultados reprodutivos, com precisão e exatidão comparáveis aos resultados dos métodos denominados objetivos (Chaves, 1996).

As características sensoriais de um alimento são critérios importantes para a aceitação do alimento pelo consumidor. O aspecto do queijo, sua cor, odor, consistência, sabor e aroma, estimulam os receptores sensoriais e provocam reações de aceitação ou rejeição do produto por parte do consumidor (Issanchou, 2008).

Os métodos sensoriais podem seguir uma abordagem discriminativa, avaliando as diferenças existentes entre duas ou mais amostras; afetiva, avaliando a aceitação e preferência dos consumidores com relação às amostras e/ou uma abordagem descritiva, descrevendo e quantificando as características sensoriais das amostras (Drake, 2007).

2.5.1. Análise sensorial descritiva

Análise descritiva é uma metodologia sensorial que fornece informações baseadas na percepção de um grupo de indivíduos treinados

para este fim. Envolve a detecção e descrição dos componentes sensoriais qualitativos e quantitativos do produto (Murray et al, 2000). Na análise descritiva, além de caracterizar as propriedades sensoriais, o provador também avalia, por meio de uma escala, o grau de intensidade com que cada atributo está presente no alimento.

Existem vários métodos de análises descritiva, dentre eles, perfil de sabor (Cairncross e Sjostrom, 1950), perfil de textura (Brandt et al, 1963), análise descritiva quantitativa (Stone et al, 1974) e, mais recentemente, o método do perfil livre (Williams e Langron, 1984), o método Spectrum (Meilgaard et al, 1987) e o método perfil descritivo otimizado proposto por Silva et al. (2012) como um método rápido para obtenção de descritores sensoriais em alimentos utilizando julgadores semi-treinados.

Cada método possui suas particularidades, mas todos possuem em comum três passos básicos para a implementação. O primeiro envolve a seleção do painel que participará das avaliações sensoriais, o segundo, trata-se do estabelecimento da terminologia a ser utilizada para a descrição das características sensoriais do produto e o terceiro, a quantificação destes aspectos sensoriais (Delahunty e Drake, 2004).

As características sensoriais de vários queijos têm sido descritas na literatura por intermédio destas variadas metodologias. O perfil de textura de queijos artesanais duros e semi-duros produzidos na França, Itália, Espanha e Suíça foi definido em um amplo estudo inter-laboratorial realizado por Lavanchy e colaboradores (1993). Esta mesma equipe também elaborou um guia de avaliação olfato-gustativa para esses mesmos tipos de queijos (Bérodier et al, 1997).

Análise descritiva de textura e sabor foi utilizada no queijo mexicano Chihuahua para comparar o perfil sensorial deste queijo produzido a partir de leite cru e pasteurizado (Hekken et al, 2006) e, análise descritiva qualitativa foi utilizada para estabelecer o perfil sensorial do queijo Salers produzido de forma artesanal na França (Duthoit et al, 2005), assim como

em queijos de Manteiga (Nassuet al, 2009) e de Coalho (Nassu et al, 2010) ambos produzidos de forma artesanal e industrial no nordeste do Brasil.

3. Referências

Anastasiou, A., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Kandarakis, I., Vuyst, L. D., Tsakalidou, E. The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasserli cheese production. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 208-217, 2007.

Aquino, A. A. Requeijão do sertão fabricado na microrregião de Guanambi, Bahia: características físico-químicas, microbiológicas e de produção. Viçosa: UFV. 2011. 166 p. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Aquino, F. T. M. Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. João Pessoa: UFPB. 1983. 74 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba.

Araújo, R. A. B. Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá. Viçosa: UFV. 2004. 121 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Análise sensorial dos alimentos e bebidas -NBR 12806. Rio de Janeiro: ABNT. 1993,8p.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH., Phylogenetic identification and in situ selection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, v. 59(1), p. 143-69, 1995.

Baruzzi, F., Matarante, A., Morea, M., Microbial community dynamics during the Scamorza Altamura cheese natural fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.1390–1397, 2002.

Bastos, M. S. R., Fontenele, M. A., Oliveira, O. M. A. B., Paulino, A. V. O. S., Oliveira, W. S. Fluxogramas de produção do queijo Coalho do Ceará e

Rio Grande do Norte. Anais do Congresso Pan-Americano, 2010. Belo Horizonte, MG, 2010.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M., Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 259-274, 2001.

Beresford, T. P., Williams, A., The microbiology of cheese ripening. In: Fox, P. F., *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2 ed. London: Chapman e Hall, 1993, 601 p.

Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 126, p. 278-285, 2008.

Bérodier, F., Lavanchy, P., Zannoni, M., Casals, J. Herrero, L., Adamo, C. Guide d'évaluation olfatto-gustative des fromages à patê dure et semi-dure. ***Lebensm. -Wiss. u. -Technology***, v. 30, p. 653-664, 1997.

Bizzarro, R., Torri Tarelli, G., Giraffa, G., Neviani, E. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Pecorino Toscano cheese. ***International Journal of Food Science***, v. 12, p. 303-316, 2000.

Blaskovsky, C., Silva, I. M., Caldas, R. L., Maia, J. C. Avaliação primária da infra-estrutura para implementação de indústria de beneficiamento de "queijo do Marajó" no município de Cachoeira do Arari-PA. ***Revista Ingepro***, v. 2., n. 1, 2010.

Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Diviès, C., Garmyn, D. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. ***Le Lait***, v. 81, p. 75-82, 2001.

Brandt, M. A., Skinner, E. Z., Coleman, J. A. Texture profile method. ***Journal of Food Science***, v. 28, p. 404-409, 1963.

Cairncross, S. E., Sjöstrom, L. B. Flavour profiles: a new approach to flavor problems. **Food Technology**, v. 4, p. 308-311, 1950.

Callon, C., Millet, L., Montel, M.C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 231–244, 2004.

Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 243-251, 2009.

Cavalcante, A. B. D., Costa, J. M. C. Padronização da tecnologia de fabricação do queijo manteiga. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 2, p. 215-220, 2005.

Chaves, J. B. P., Análise sensorial: histórico e desenvolvimento. Cadernos didáticos n. 327. Imprensa Univesitária, UFV: Viçosa, MG, 1996.

Cho,S.L., Nam, S.W., Yoon J.H., Lee, J.S., Sukhoom, A., Kim, W. *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, v. 58, p. 1844-1849, 2008.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.L., Tourneur, C. Les phénomènes microbiens. In : Le Fromage. 3^e ed. Paris, ed. Lavoisier, 2008.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F., Chikindas, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

Coeuret, V., Dubernet,S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. Isolation, characterisation and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. **Le Lait**. v. 83, p. 269-306, 2003.

Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvador, B... Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 409-421, 1997.

Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N. P., Ustunol, Z. Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4005-4021, 2007.

Córdova, U. A., Santos, A. P., Pucci, A. A., Mota, D. M. L., Nunes, I. T., Souza, L. T., Jesus, N. N., Pereira Neto, S. Queijo artesanal serrano: séculos de travessia de mares, serras e vales. A história nos campos da Serra Catarinense. Documento 234, EPAGRI, 2010.

Cronin, T., Ziino, M., Conduro, C., McSweeney, P.L.H., Mills, S., Ross, R.P., Stanton, C., 2007. A survey of the microbial and chemical composition of seven semi-ripened Provola dei Nebrodi Sicilian cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 128–1139, 2007.

Cruz, F. T., Menasche, R., “Se o leite é cozido, o queijo não é Serrano”: tradição, conhecimento e discurso instituído no controverso debate em torno de queijos feitos de leite cru. III Colóquio agricultura familiar e desenvolvimento rural. Porto Alegre. 2011.

Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C. e Janssens D. Caracteristiques generales des bacteries lactiques. In: Bacteries Lactiques. Chemin de Saint Georges. Lorica, 1994.

Delahunty, C. M., Drake, M. A., Sensory character of cheese and its evaluation. In: Fox, P. F., Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. I. 3 ed. London: Chapman e Hall, 2004, 601 p.

Delorme, C. Safety assessment of dairy microorganisms: Streptococcus thermophilus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 274-277, 2008.

Devoyod, J. J., Poullain, F. Les Leuconostocs Propriétés : leur rôle en technologie laitière. **Le Lait**, v. 3, p. 249-280, 1988.

Dias, J. C. Uma longa e deliciosa viagem . 1 ed., São Paulo, Editora Barleus Ltda. 2010, 168.

Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., Cocolin, L. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 302–311, 2008.

Dores, M. T. Implicações do processo de maturação à temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais. Viçosa: UFV. 2007. 101 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Drake, M. A. Invited review: sensory analysis of dairy foods. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 4925-4937, 2007.

Duthoit, F., Callon, C., Terssier, L., Montel, M.-C. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in ‘Registered Designation of Origin ‘ Salers cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 259-270, 2005.

El Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, 1248–1255, 2007.

EMATER. Caracterização da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 21 p., 2003.

EMATER. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. Revista da EMATER – MG. Ano XXII, n. 80, p. 8 – 9, 2004.

EMATER. Caracterização da microrregião da Canastra como produtora do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 19 p., 2004a.

EMATER. Mapa do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 2008. Disponível em http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59 > Acesso em 25.01.2012

Escobar, C. A. M., Leuthier, S., Antunes, G., Albuquerque, R. C. L. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.

Euzéby, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em www.bacterio.cict.fr. Acesso em 26 abril 2010.

Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., Cosentino, S. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 51-59, 2004.

Ferreira, C. L. L. F. Grupo de bactéria lácticas – caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Ed.). **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, MG: Suprema, 2003, 112 p.

Ferreira, A. D., Viljoen, B. C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p.131-140, 2003.

Figueiredo, E. L. Elaboração e caracterização do “queijo Marajó” tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização. Belém: UFPA. 2006. 104 p. Dissertação de mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará.

Fleet, G. H., Yeasts in foods and beverages : impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 170-175, 2007.

Fleet, G.H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 199-211, 1990.

Florez, A., Mayo, B. Fungal diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 165–171, 2006.

Fontenele, M. A., Vasconcelos, A. S. E., Folsta, K. C. B. M., Bastos, M. S. R., Paquereau, B. Perfil cromatográfico do queijo calho da região nordeste (Jaguaribe – CE, Garanhuns – PE, Caicó - RN). Anais CBCTA 2010, Salvador, BA, 2010.

Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manichini, P.L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, v. 20, p. 397–404, 2003.

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 (1), p. 1-24, 2006.

Fox, P. F., J. M., Wallace. Formation of flavor compounds in cheese. **Advances in Food Microbiology**, v. 45, p. 1-37, 1997.

Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Anastasiou, R., Papadelli, M., Tsakalidou, E. Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 96-99, 2009.

Girafa, G. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. **Food Microbiology**, p. 551-556, 1995.

Giraffa, G., Neviani, E. Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. **International Journal of Food Science**, v. 4, p. 403–423, 2000.

Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 467-494, 2004.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 29(3), p. 435-63, 2005.

Ide, L. P.; Benedet, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina. **Rev. Ciênc. Agrotec.**, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

Issanchou, S. L'analyse sensorielle du fromage (aspect scientifique) . In: Corrieu G., Luquet, F.M.(coordonnateurs) **Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments**. Paris: Lavoisier, 2008, 849 p.

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, Ts., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X., Boyaval, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 147-158, 1998.

Klaenhammer, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-85, 1993.

Kohler, W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 133-150, 2007.

Jakobsen, M., Narvhus, J., Yeasts and possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 755-768, 1996.

Jany, J.-L., Barbier, G., Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, v. 25, p. 839-848, 2008.

Jurkovic D., Krizková L., Sojka, M., Takacová, M., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Vandamme, P., Vancanneyt, M. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 82-87, 2007.

Kongo, J.M., Ho, A.J., Malcata, F.X., Wiedmann, M., 2007. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1838–1844, 2007.

Krone, E. E., Menasche, R. Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS). **Revista Ateliê Geográfico**, v. 4., n. 10, p 61-85, 2010.

Lavanchy, P., Bérodiér, F., Zannoni, M., Noël, Y., Adamo, C., Squella, J., Herrero, L. L'évaluation sensorielle de la texture des fromages à pâte dure ou semi-dure. Etude interlaboratoires. **Lebensm. -Wiss. u. -Technology**, v. 26, p. 59-68, 1993.

Lévêque, C., Mounolou, J.C. Biodiversité: Dynamique biologique et conservation. 2^a ed. Dunod. Paris. 2008.

Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., Giraffa, G. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 967–976, 2004.

Lourenço, L. F. H., Simão Neto, M., Lourenço Júnior, J. B. Análise microbiológica do requeijão marajoara elaborado no norte do Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16 (94), p. 55-59, 2002.

Martins, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro. Viçosa: UFV.

2006. 158p. Dissertação, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Menasche, R., Krone, E. E., O queijo Serrano dos Campos de Cima da Serra: história, cultura e identidade como ingrediente de um produto da terra in Dimensões sócio-culturais da alimentação. Diálogos latino-americanos. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2010 (no prelo)

Meneses, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil. Dossiê Interpretativo, v. 1, Belo Horizonte, 2006.

Menezes, Sônia de Souza Mendonça. A força dos laços de proximidade na tradição e inovação no/do território sergipano das fabriquetas de queijo. São Cristóvão: UFS. 2009. 359 p. Tese de Doutorado em Geografia. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

Meilgaard, M., Civile, G. V., Barr, B. T. Sensory evaluation techniques. Boca Raton : CRC Press Inc., v. 2, 1987, 159 p.

Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Leitão M. F. F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. **Revista de Microbiologia**, v 30, p. 130-136, 1999.

Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1993.

Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.

Nascimento, I. R., Oliveira, J. C. N., Menezes, S. S. M., Silva, E. S. Avaliação das inovações tecnológicas no processamento de queijos regionais na região de Nossa Senhora da Glória/SE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 121-126, 2001.

Nassu, R. T., Lima, J. R., Andrade, A.-S. A. Caracterização físico-química e análise sensorial de queijo de coalho produzido no Rio Grande do Norte. **Revista Higiene Alimentar**, v. 24, n. 186/187, p. 40-45, 2010.

Nassu, R. T., Lima, J. R., Andrade, A. A. Caracterização físico-química e análise sensorial de queijo de manteiga produzido no Rio Grande do Norte. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 1, p. 54-59, 2009.

Nassu, R.T., Araújo, R. S., Borges, M. F., Lima, J. R., Macêdo, B. A., Lima, M. H. P., Bastos, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento e de produtos regionais derivados do leite no estado do Ceará. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1**. EMBRAPA. 2001.

Nassu, R.T., Araújo, R. S., Guedes, C. G. M. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11**. EMBRAPA. 2003.

Nieto-Arribas, P., Poveda, J. M., Seseña, S., Palop, L., Cabezas, L. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092-1098, 2009.

Nóbrega, J. E., Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras. Viçosa: UFV. 2007. 82p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Nuñez, M., Medina, M., Gaya, P., Dias-Amado, C., Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. **Le Lait**, v. 61, p. 62-79, 1981.

Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., Saihi, A., Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 286-290. 2008.

Ornelas, E. A., Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG.

Belo Horizonte: UFMG. 2005. 65p. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

Pinto, M. S. Diagnóstico Sócio-econômico cultural e Avaliação Microbiológica do Queijo Minas Artesanal do Serro – MG. Viçosa-MG, 2004. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

Pires, E. F., Morais, C. M. M., Silva, J. A., Carvalho, R. O. C. Queijo de Coalho – Perfil Industrial. Recife: SEBRE/PE, v. 1, p. 44, 1994.

Pot, B. The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., Luquet, F.M.(coordonateurs) **Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments**. Paris: Lavoisier, 2008, 849 p.

Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Coconcelli, P.S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 141–151, 2004.

Psoni, L. Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in Enterococcus isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 109-120, 2006.

Praphailong, W., Fleet, G.H. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. **Food Microbiology**, n. 14, p. 459-468, 1997.

Randazzo, C.L., Pitino, I., De Luca, S., Scifò, G.O., Caggia, C. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 269–278, 2008.

Saint-Hilaire, A. Viagem às Nascentes do Rio São Francisco. Belo Horizonte:Itatiaia, 1975.

Schleifer, K. H., Kilpper-Balz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. ver. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

Sharpe, M. E. Taxonomy of the lactobacilli. **Dairy Science Abstracts**, v. 24(3), p. 110-118, 1962.

Shene, C., Canquil, N., Rubilar, M. Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 279-284, 2008.

Silva, R. C. S. N., Minim, V. P. R., Simiqueli, A. A., Moraes, L. E. S., Gomide, A. I., Minim, L. A. Optimized descriptive profile: a rapid methodology for sensory description. **Food Quality and Preference**, v. 24, p. 190-200, 2012.

Silva, V.R., Oliveira, V.L. O Queijo do Marajó tipo “creme” derivado do leite de búfala: Uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do agronegócio Município de Soure. Belém: UEPA, 2003. 70f. Monografia de Especialização em Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável, Universidade do Estado do Pará.

Singh, H., Bennett, R. Milk and milk processing. In: Robinson, R. K. *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products*. 3th ed. New York: John Wiley and Sons, 2002.

Stiles, M. E. Bacteriocins produced by *Leuconostoc* species. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2718-2724, 1994.

Sousa, C. L., Neves, E. C. A., Carneiro, C. A. A., Farias, J. B., Peixoto, M. R. S. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na ilha do Marajó-PA. B. CEPPA, v. 20, n. 2. P. 191-202, 2002.

Stiles, M. E., Holzapfel, W. H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

Stone, H., Sidel, J. L., Oliver, S., Woolsey, A., Singlenton, R. C. Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. **Food Technology**, v. 28, n. 11, p. 24-33, 1974.

Tamime, A. Y., Microbiology of Starter Culture. In: Robinson, R. K. *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products*. 3th ed. New York. John Wiley and Sons, 2002.

Teuber, M., Geis, A. 2006. The genus *Lactococcus*. In: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications* 3 ed., New York, Springer, 2006.

Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L.A., et al. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 519–527, 1998.

Van Hekken, D. L., Drake, M. A., Molina Corral, F. J., Guerrero Pietro, V. M., Gardea, A. A. Mexican Chihuahua Cheese: Sensory profiles of young cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3729-3738, 2006.

Ventura, R. F. Requeijões do Nordeste: tipos e fabricações. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 42, n. 254, p. 3-21, 1987.

Vieira, J. N., Teixeira, C. S., Kuabara, M. Y., Oliveira, D. A. A. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. **PUBVET**, v. 5, n. 2, 2011.

Vitrolles, D. When geographical indication conflicts with food heritage protection, **Anthropology of food** [Online], v. 8. 2011. Disponível em: <<http://aof.revues.org/index6809.html>>. Acesso em 12 de maio 2011.

Vuyst, L. D., Tsakalidou, E. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 476-485, 2008.

Williams, A.A., Langron, S.P. The use of freechoice profiling for the evaluation of commercial ports. **Journal Science Food Agriculture**, v. 35, p. 558-568, 1984.

Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.

Zoccal, R.; Cassele, F. L. G.; Chaib Filho, H.; Carneiro, A. V.; Junqueira, R. Mudanças no mapa da produção de leite no Brasil. In: Fernandes, E. N.; Martins, P. do C.; Moreira, M. S. de P.; Arcuri, P. B. (Ed.). *Novos desafios para o leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007. p. 24-34.

- Capítulo 1 –

Diversity and dynamics of the microbial community of two Brazilian farmhouse cheeses by culture-dependent and culture-independent methods

Abstract

We studied the microbial diversity and dynamics of the Brazilian raw milk cheeses Canastra and Serro using both microbial counting and a culture-independent method temporal temperature gel electrophoresis (TTGE). A total of 24 cheeses produced in both the rainy and dry seasons were evaluated. Mesophilic cocci and lactobacilli were the dominant microbiota in both seasons. Although the microbiota of Canastra and Serro cheeses were similar, from a quantitative perspective, TTGE analysis indicated that Canastra cheese had greater microbial diversity, yielding a total of 10 different bands, 3 of which were found in all samples. In the TTGE profile for Serro cheese, 8 bands were found, and 1 was common to all of the samples. From the physicochemical perspective, Serro cheese showed higher levels of acidity and moisture than Canastra cheese as a result of differences in their manufacturing steps.

Keywords: Canastra cheese, Serro cheese, raw milk, microbial diversity, TTGE.

1. Introduction

The Brazilian state of Minas Gerais is known for its cheese production. Part of this production includes artisanal Minas cheese, which is made from raw cow's milk. Documents from the early eighteenth century that mention the production of dairy products, such as artisanal cheese, in the region reveal that Minas cheese has been manufactured since the colonization period of Brazil, suggesting that it is the oldest and most traditional cheese made in Brazil (Saint-Hilaire, 1975). It is estimated that the Canastra and Serro regions together produce approximately 9,000 tons of homemade cheese per year (EMATER, 2007). In 2006, its social, economic and cultural significance was recognized with the title of intangible cultural heritage by the Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional - IPHAN (Brazilian Institute of History and Art Heritage).

Although they are manufactured by using similar technologies, the characteristics (and the name) of artisanal Minas cheeses vary according to the region of the state where it is produced. In April 2010, two of the more traditional areas, Canastra and Serro, organized into producer associations and started the process of obtaining a protected designation of origin (PDO) for their products. These regions are both small rural areas surrounded by mountains, and they both use salt whey, collected from the batch of cheese produced the day before (back-slopping), known among farmers as “pingo” (drop).

Traditionally, the cheeses in these regions are made soon after milking, when commercial rennet and pingo are added. The curd is then cut into chestnut-size pieces. A portion of the free whey is removed, and the mass is transferred into molds on which manual pressure is applied. In the Canastra region, a clean tissue is used around the entire mass within the mold to aid the draining process; in Serro, only hand pressure is employed. After pressing, the curd is salted, and the excess whey is drained. This salting process is repeated three times during the day on alternate sides, usually with coarse salt. The collection of the pingo occurs at the end of the first day and continues until the next morning, when cheese production starts

anew. The next day, the cheese is removed from the molds and kept on wooden shelves for maturation, which usually lasts 15 days. In the region of Serro some producers send cheeses to the central cooperative where they are vacuum packaged and kept under refrigeration.

Usually, in cheeses manufactured without the addition of starter cultures, as in Serro and Canastra cheeses, the lactic microbiota present in the raw milk and cheese are strictly related to the geographical area of production (Beresford et al., 2001). Therefore, it is important to know the intrinsic microbial communities of these cheeses to better understand the product's characteristics, to establish markers of authenticity, and to improve quality.

Traditional cultivation methods can provide significant information regarding the microbial populations present in cheese. However, these methods may over- or underestimate the microbial diversity because they may not be sufficiently selective; moreover, these methods are laborious and time-consuming ways of monitoring population dynamics (Temmerman et al., 2004). Recently, faster methods based on direct DNA analysis that do not require cultivation, such as TTGE, have been developed and used to complement the study of the microbial communities in dairy ecosystems (Ogier et al., 2002).

The objectives of this study were to determine the microbial and dynamic biodiversity in the artisanal Minas cheeses produced in Serra da Canastra (Canastra cheese) and Serro (Serro cheese) in both the rainy season (November to March) and the dry season (April to October) employing a combination of culture-dependent (plate counts) and culture-independent (TTGE - temporal temperature gel electrophoresis) methods.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling procedure

Five Canastra cheeses and seven Serro cheeses, all 20 days old and manufactured in different farms, were collected in each studied region. The

same farms were sampled in March (rainy season - RS) and October (dry season - DS).

2.2 Physicochemical and microbiological analyses

Cheeses were evaluated for the following characteristics: pH (electrode connected to Hanna Instruments Hi 9024, Hanna Instruments, France), total solids and fat, as described by the International Dairy Federation (1982 and 1997, respectively) and NaCl concentration (measured using a Corning 926 chloride analyzer, Halstead, England).

To determine microbial counts, 10 g from the center of each cheese were homogenized in 90 ml of sterile 2% sodium citrate solution in a laboratory blender (Grosseron, Saint-Herblain, France) for 1 minute. Serial dilutions were prepared in sterile saline-tryptone solution to 10^{-8} and then plated in duplicate for each dilution on agar medium appropriate for the different groups evaluated. Presumptive mesophilic and thermophilic cocci were enumerated on M17 agar (Oxoid, Hampshire, England) after incubation under aerobic conditions at 24°C for 3 days and 43°C for 48 hours, respectively. Presumptive mesophilic lactobacilli were enumerated on MRS agar (Difco, Becton Dickinson, USA), pH 5.4, under anaerobic conditions at 30°C for 48 hours. Presumptive thermophilic lactobacilli were enumerated on MRS agar (Difco, Becton Dickinson, USA), pH 5.4, under aerobic conditions for 48 hours at 43°C. Presumptive enterococci were enumerated on KF agar (Bioko, Beauvais, France) under aerobic conditions at 30°C for 48 hours and yeast agar containing chloramphenicol at 30°C for 5 days.

2.3 TTGE analysis of cheese bacteriological composition

Total DNA was extracted from cheese samples as described by Parayre et al. (2007). The V3 region of the 16S rDNA gene was amplified using the primers V3P3-GC-Clamp (5'GCCCCGCCGCGCGCGGGCGG

GGCGGGGGCACGGGGGGCCTCGGGAGGCAGCAG-3') and V3P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). The PCR mixture (50 µl) contained Taq polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂), 200 µM deoxynucleoside triphosphate mix, 1 µM of each primer, 2.5 U Taq polymerase (Q-BIOgene, Illkirch, France) and 100 ng of DNA template. Amplification was performed on a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) under the following conditions: 94°C for 2 min; 35 cycles of 95°C for 30 s, 63°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and 72°C for 5 min.

For TTGE analysis, the Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to separate the V3 region PCR products. Gels were prepared according to Parayre et al. (2007). Migration was performed at 41 V for 16 h with a temperature increase from 63°C to 70°C (rate of 0.4°C/h). A standardization ladder made by blending equal amounts of amplicons obtained from the DNA of selected strains was loaded in triplicate in each gel. The gels were stained with ethidium bromide for 15 min (0.6 µg ethidium bromide per mL of 1.25× TAE buffer), rinsed for 15 min in distilled water and photographed on a UV transillumination table. The bands were analyzed using the database for presumptive species identification developed by Parayre et al. (2007).

3. Results

3.1 pH and gross composition of the cheeses

The physicochemical properties of Canastra and Serro artisanal cheeses are shown in Table 1. Serro cheese was more acidic and moister than Canastra cheese. The concentrations of fat and sodium chloride (NaCl) were the same ($P < 0.05$) in both cheeses.

Canastra cheese did not show any differences ($P < 0.05$) between the rainy (RS) and dry seasons (DS) in total solids or sodium chloride content.

However, the pH and fat content were lower ($P < 0.05$) in the DS. All of the physicochemical variables measured in Serro cheese differed between the two seasons. The concentrations of total solids and fat were lower ($P < 0.05$) in the DS, and a higher level of NaCl ($P < 0.05$) probably contributed to the increase in pH ($P < 0.05$) observed in this season.

Table 1. Physicochemical characteristics of Canastra and Serro cheeses made during the rainy season (RS) and the dry season (DS)

| Parameter | Regions of Cheese | | | |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Canastra | | Serro | |
| | Rainy season | Dry season | Rainy season | Dry season |
| pH | 5.07 (±0.15)aA | 4.96 (±0.18)bA | 4.66 (±0.08)aB | 4.73 (±0.08)bB |
| Total solids (%) | 60.48 (±1.93)aA | 61.62 (±3.10)aA | 56.39 (±3.13)aB | 51.03 (±2.68)bB |
| Fat (%) | 31.30 (±3.98)aA | 29.30 (±5.56)bA | 27.53 (±4.90)aA | 23.21 (±2.72)bA |
| Salt (%) | 1.50 (±0.32)aA | 1.36 (±0.16)aA | 1.51 (±0.27)aA | 1.84 (±0.34)bA |

Same lower case letters - no significant difference between the two seasons for that cheese. Same capital letters - no significant difference between Serro and Canastra cheeses within that season as evaluated using Tukey's t-test.

3.2 Microbial diversity evaluated using plate counts

Table 2 shows the mean scores of the bacterial groups investigated in Canastra and Serro cheeses manufactured in the RS and the DS.

Mesophilic LAB counts were remarkably high when compared to the thermophilic counts in both cheeses. This result is a reflection of the technology employed in the manufacture of these cheeses, which uses no heat treatment. Canastra cheese proved to be a more stable product in terms of its microbiota than Serro cheese, and some microbial groups remained constant between the two seasons. However, presumptive

mesophilic and thermophilic cocci and yeasts showed higher counts in the rainy season ($P < 0.05$). Serro cheese showed a different dynamic when compared to Canastra cheese; all of the microbial groups in Serro cheese were influenced by the season.

Interestingly, from the quantitative perspective, the microbiota of these two cheeses were similar. According to the Tukey test (Table 2), in the RS, the microbiota differed only in the mesophilic *Lactobacillus* count (higher in Serro cheese; $P < 0.05$) and in the yeast count (higher in Canastra cheese; $P < 0.05$). In the DS, higher counts of mesophilic cocci and yeasts ($P < 0.05$) were obtained in Serro cheese.

Table 2. Log counts (\pm SD) of microbial groups of Canastra and Serro cheeses made during the rainy (RS) and dry season (DS)

| Group Targeted | Cheese | | | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Canastra | | Serro | |
| | Rainy season | Dry season | Rainy season | Dry season |
| Mesophilic cocci | 7.89 (± 0.78)aA | 7.74 (± 0.38)bA | 8.16 (± 0.80)aA | 9.10 (± 0.36)bB |
| Mesophilic lactobacilli | 7.78 (± 0.28)aA | 7.68 (± 0.26)aA | 8.37 (± 0.30)aB | 7.95 (± 0.38)bA |
| Thermophilic cocci | 5.79 (± 0.43)aA | 5.75 (± 0.93)bA | 5.72 (± 1.19)aA | 5.91 (± 1.22)bA |
| Thermophilic lactobacilli | 5.88 (± 1.28)aA | 5.44 (± 0.90)aA | 4.99 (± 1.57)aA | 4.60 (± 1.06)bA |
| Enterococci | 4.95 (± 0.58)aA | 4.72 (± 0.94)aA | 4.55 (± 1.30)aA | 4.52 (± 0.91)bA |
| Yeast | 5.41 (± 0.72)aA | 3.77 (± 0.72)bA | 4.65 (± 0.43)aB | 5.49 (± 0.45)bB |

Same lower case letters - no significant difference between the two seasons for that cheese. Same capital letters - no significant difference between Serro and Canastra cheeses within that season as evaluated using Tukey's t-test.

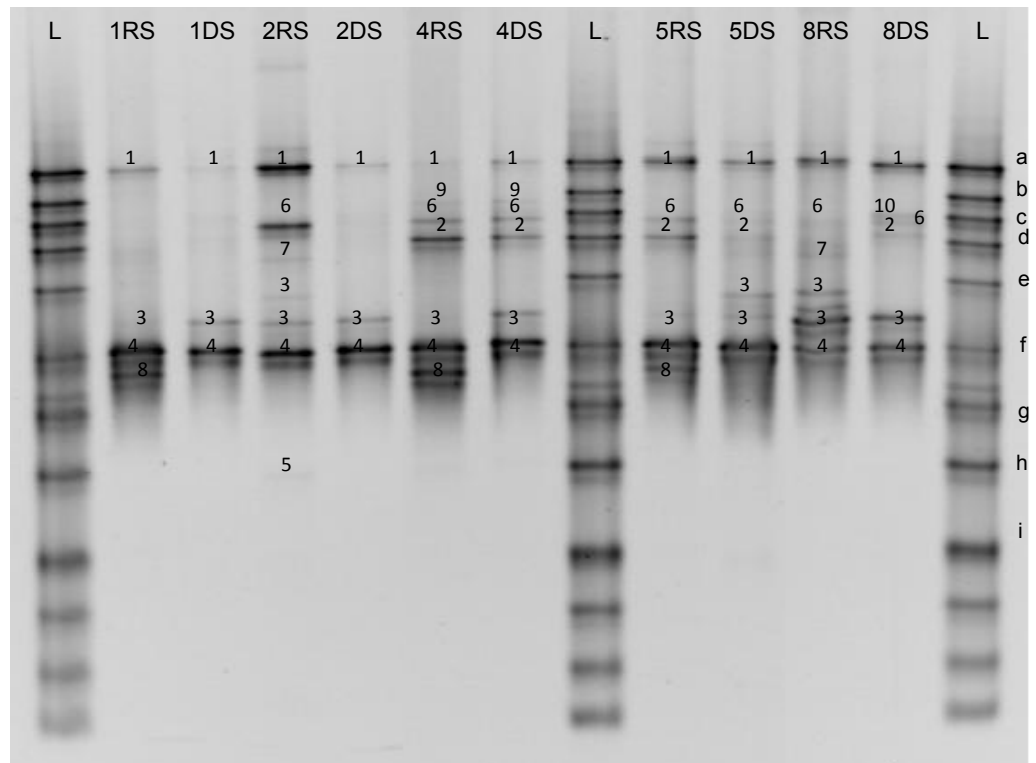
3.3 TTGE Identification of low GC-content bacteria

TTGE was used to preliminarily characterize the ecosystem of Canastra and Serro cheeses and to monitor their changes in the RS and the DS (Fig. 1).

The TTGE profile of Canastra cheese revealed 10 different bands in the two seasons studied (Fig. 2a). Three major bands were detected that corresponded to the species *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus gasseri*/*Lactobacillus johnsonni* (band 1), *Streptococcus gallolyticus* spp. (band 3) and *Lactococcus lactis* (band 4). These three bands were found in all samples of Canastra cheese analyzed in both the RS and the DS. The high frequency of these species may reflect their strong dominance in Canastra cheese. In the RS, nine different bands were detected, three of which were present only in this season: band 5 (*Corynebacterium variabile*), band 7 (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis*) and band 8 (*Streptococcus salivarius*). In the DS, seven different bands were detected, and band 10 (*Enterococcus faecium*) was observed only in this season.

The bacterial profile analysis of Serro cheese using TTGE revealed eight different bands in both seasons (Fig. 2b). Among these, seven were identified using the species database. In some cheeses, the profile showed only two bands, e.g., cheese batches 3DS, 6RS, 7DS and 8DS. Although the profile was more complex in other cheese batches, it did not exceed five different bands in any sample (Fig. 2b). The band that corresponded to the species *L. plantarum*, *L. gasseri*, and *L. johnsonni* (band 1) was found in all of the samples.

a



b

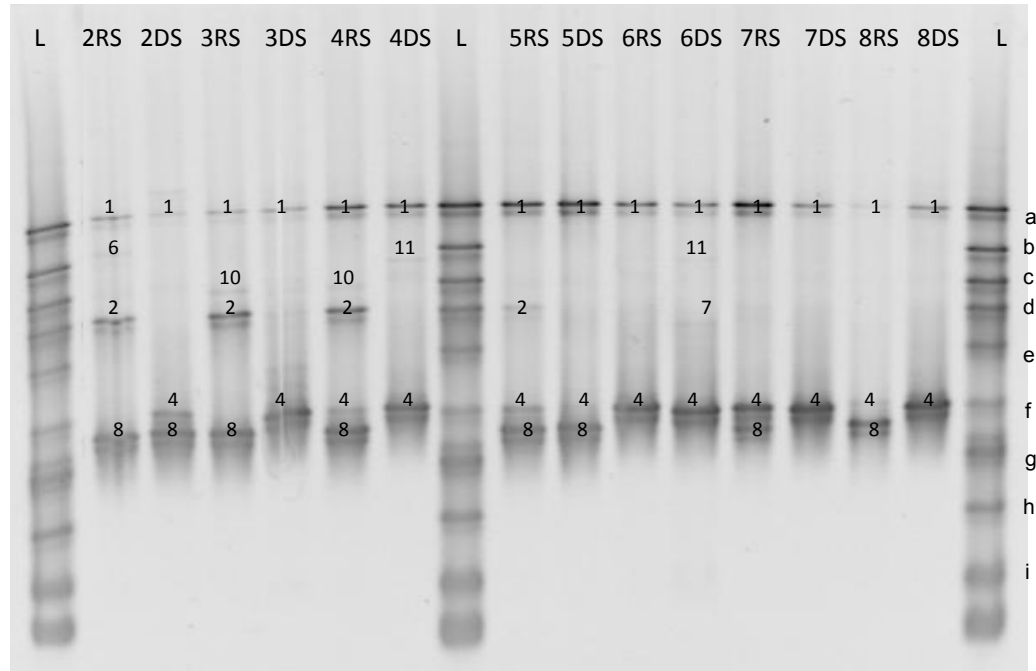


Fig.1. TTGE profiles of 16S rRNA gene V3 regions under low GC-content migration conditions from Canastra cheese (Fig. 2a) and Serro cheese (Fig. 2b) in the rainy season (RS) and the dry season (DS). Lanes L: ladder (a. *Lactobacillus plantarum*, b. *Lactobacillus fermentum*, c. *Enterococcus faecium*, d. *Lactobacillus helveticus*, e. *E. faecalis*, f. *Lactococcus lactis*, g. *Streptococcus thermophilus*, h. *Corynebacterium variabile*, and i. *Lactobacillus paracasei*). Bands: 1: *L. plantarum*/*Lactobacillus gasseri*/*Lactobacillus johnsonii*, 2: *Lactobacillus acidophilus*/*Lactobacillus crispatus*/*L. helveticus*, 3: *Streptococcus gallolyticus* spp. *macedonicus*, 4: *Lactococcus lactis*, 5: *C. variabile*, 6: *Lactobacillus brevis*/*Staphylococcus xylosus*, 7: *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis*, 8: *Streptococcus salivarius*, 9: *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, 10: *E. faecium*, and 11: unknown band.

4. Discussion

We report here the first characterization of the diversity of the indigenous microbiota of Canastra and Serro cheeses produced during two different periods: the rainy and the dry seasons. In Serro and Canastra regions, the climate is characterized by two well-defined seasons. Rainfall and high average temperatures (22°C to 24°C) are characteristic of the RS, while the DS is characterized by lower average temperatures (18°C to 21°C), low rainfall and low humidity. These climatic features contribute to differences in the final physicochemical and microbiological characteristics of artisanal cheeses.

In Canastra cheese, the pH varied according to the season. Although the cocci counts (which are known as major acid producers and are characterized as mesophilic and thermophilic) were higher ($P < 0.05$) in the RS, there was an increase in the average pH in this season. This fact may be due to high yeast counts detected in this season. The lactose consumption of this group limits the production of lactic acid by LAB. Moreover, the oxidative assimilation of lactic acid by yeasts generates higher pH (Larpent, 1991). The culture-dependent method also showed that mesophilic cocci and lactobacilli were the dominant microbiota in Canastra cheese in both seasons.

In agreement with the culture-dependent methods, *L. lactis* was always detected as a dominant species in 20-day-old Canastra cheese using the TTGE method. Lactococci are the dominant microbiota in several other types of artisanal cheeses (Cogan et al., 1997). Their high acidifying capacity prevents product changes and the growth of pathogenic bacteria (Delves-Broughton et al., 1996; Casalta and Montel, 2008). Another band found in all of the evaluated Canastra cheeses corresponded to *Streptococcus macedonicus*, recently reclassified as *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (Schlegel et al., 2003). It is a thermophilic, homofermentative species that, although it shows optimum growth at 42.3°C, can grow

between 25 and 45°C (Van den Berghe et al., 2006; Vuyst and Tsakalidou, 2008). Strains of *S. macedonicus* are moderately acidifying and proteolytic, and they participate in fat hydrolysis, citrate consumption and casein hydrolysis in milk (Georgalaki et al., 2000). *S. macedonicus* has been isolated from Greek cheese (Tsakalidou et al., 1998; Georgalaki et al., 2000), Italian cheese (Lombardi, 2004) and French cheese (Callon et al., 2004), and it clearly has an important role as an adjunct culture in Canastra cheese.

Using TTGE, many samples taken at different time points in a given study can be analyzed simultaneously (Muyzer and Small, 1998). However, a limitation of the TTGE method is species comigration. Despite sequence differences, the melting temperatures of comigrating V3 fragments are similar; thus, they migrate to the same position in the gel (Ogier et al., 2002). In the present study, one of the major bands (band 1) from Canastra cheese corresponded to *L. plantarum*, *L. gasseri* and/or *L. johnsonni*. Sequencing of the band did not provide conclusive results. In a previous study with the same cheese, Borelli (2006) indicated that *L. plantarum* predominated in Canastra cheese. Furthermore, it is well known that this species is frequently present in artisanal starter-free cheeses (Beresford et al., 2001). Therefore, it is likely that band 1 in this case corresponds to *L. plantarum*. Therefore, it appears that *L. lactis*, *S. macedonicus* and *L. plantarum* have an important role in the fermentation and sensory characteristics of Canastra cheese due to their presence in all of the analyzed samples. The *Lactobacillus acidophilus* group (band 2) was frequently found, and *E. faecium* (band 10) and the non-LAB species *C. variabile* (band 5) were occasionally found. These bacteria may have a secondary role in the fermentation process of Canastra cheese.

The results also demonstrate that Serro cheese is a more unstable product than Canastra cheese. As seen in Tables 1 and 2, all of the variables of Serro cheese showed significant changes ($P < 0.05$) between seasons. It is important to note that the Serro cheese used in this experiment was matured under refrigeration and brought to market in

vacuum packaging, conditions that substantially modify the maturation dynamics when compared to Canastra cheese, which is matured at room temperature and without packaging. The process of maturation under refrigeration for artisanal cheeses is questionable because potentially pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* survive and stay longer in the cheese matrix. In the RS, the amount of total solids in Serro cheese was higher ($P < 0.05$) than in the DS, probably due to the increased acidification ($P < 0.05$) resulting in more whey drainage.

TTGE analysis of Serro cheese revealed a band common to all of the analyzed samples (band 1). This band was also found in all of the Canastra cheeses. *L. lactis* (band 4) was not detected only in two of the samples from the RS. This result is consistent with the culture-dependent method, which indicated lower counts of mesophilic cocci in this season. However, the thermophilic coccus *S. salivarius* (band 8) was detected in almost all of the samples of Serro cheese in the RS (except sample 6Rs), whereas in the DS, it was detected in only two samples. Other species were found less frequently, such as the *L. acidophilus* group and *E. faecium*.

In conclusion, Serro and Canastra cheeses differ in their physicochemical aspects and microbial diversity. Differences in their production control their physicochemical and, consequently, their microbial characteristics, resulting in products with distinct final properties. Both cheeses undergo changes in their composition depending on the season, suggesting the need for better control in the manufacturing steps, mainly in relation to maturation time and temperature. The role of the species identified in this study in the formation of the sensory characteristics of Canastra and Serro cheeses awaits investigation.

5. References

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M., Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

Callon, C., Millet, L., Montel, M.C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 231–244, 2004.

Casalta, E., Montel, M.C., Safety assessment of dairy microorganisms : The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271-273, 2008.

Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvador, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 409-421, 1997.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hungenholtz J., Applications of the bacteriocin nisin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 69, p. 193-202, 1996.

EMATER. Caracterização da microrregião da Canastra e Serro como produtora do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 2007.

Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Anastasiou, R., Papadelli, M., Tsakalidou, E. Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 96-99, 2009.

Ogier, J.-C., Son, L., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Bruchet, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n. 8, p. 3691-2701, 2002.

International Dairy Federation, Lait et produits laitiers –Détermination de la teneur en matière grasse. Norme international 152A:1997. Fédération Internationale de Laiterie, Bruxelles, 1997.

International Dairy Federation, Fromages et fromages fondus - Détermination de l'extrait sec total. Norme international 152A:1997. Fédération Internationale de Laiterie, Bruxelles, 1982.

Larpent, J.P., Bervas, E., Bezenger, M.C. et al. Biotechnologie des levures. Paris. Masson. 1991. 425p.

Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., Giraffa, G. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 967–976, 2004.

Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 317-322, 1993.

Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.

Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3691–3701, 2002.

Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.-N., Sivieri, K., Le Dizes, A.-S., Sohier, D., Lortal, S., Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 431–441, 2007.

Saint-Hilaire, A. Viagem às Nascentes do Rio São Francisco. Belo Horizonte:Itatiaia, 1975.

Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Bouvet, A. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S.gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 631–645, 2003.

Temmerman, R., Huys, G., Swings, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science & Technology** , v.15, p. 348–359, 2004.

Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassill, L., Ludwig, W., Devriese, L.A., et al. Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 519–527, 1998.

Van den Bergue, E., Skourtas, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 138-147, 2006.

Vuyst, L. D., Tsakalidou, E. *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 476-485, 2008.

- Capítulo 2 -

Biodiversidade de cocos autóctones isolados em queijos artesanais produzidos em Minas Gerais, Brasil

Abstract

The objective of this work was to study the diversity of lactic acid bacteria (LAB) at the level of species and strains in artisan Canastra and Serro cheeses manufactured from raw milk. A total of eight samples, collected at four farms during the rainy and dry seasons, were submitted to microbiological analysis. LAB were isolated from M17 agar medium and identified by the combined use of species-specific PCR and sequencing of 16S rDNA. The biodiversity of *Enterococcus faecalis* was investigated by PFGE. The species of *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Leuconostoc fallax* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* were the most frequent in Canastra cheese, while the species of *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* were the most common in Serro cheese. Seventeen different PFGE profiles were identified among the *Enterococcus faecalis* isolates. The results show that the geographical distance between the farms, even within the same region, is reflected in unrelated strains. The biodiversity at species and strains level was higher in Canastra cheese.

Keywords: Canastra cheese, Serro cheese, raw milk, PFGE, *Enterococcus faecalis*.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias lácticas (BAL) ao nível de espécies e estirpes em queijos Canastra e Serro, fabricados de forma artesanal a partir de leite de vaca cru. Um total de 8 amostras, coletadas em 4 propriedades rurais, nas estações chuvosa e seca, foram submetidos à análises microbiológicas e genotípicas. BAL foram isoladas a partir do meio M17 ágar e identificadas pelo uso combinado de PCR espécie-específica e sequenciamento. A biodiversidade dos *Enterococcus faecalis* foi investigada por PFGE. No queijo Canastra, as espécies *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Leuconostoc fallax* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foram as mais frequentes enquanto que no queijo do Serro destacaram-se as espécies *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Dezesete diferentes perfis de PFGE foram identificados entre os isolados de *Enterococcus faecalis* avaliados. Os resultados demonstram que a distância geográfica entre as fazendas, mesmo dentro de uma mesma região, se reflete em estirpes não relacionadas entre si. A biodiversidade ao nível de espécies e estirpes foi superior no queijo Canastra.

Palavras-chave: queijo Canastra, queijo do Serro cheese, leite cru, PFGE, *Enterococcus faecalis*.

1. Introdução

Os queijos Canastra e Serro a mais de 200 anos são fabricados de forma artesanal, com leite de vaca cru no estado de Minas Gerais, Brasil (Meneses, 2006). O queijo Serro foi recentemente reconhecido como o primeiro queijo no Brasil com indicação geográfica. Nos últimos anos, houve um crescente interesse no estudo das características destes queijos por se tratarem de produtos fortemente ligados a tradição cultural e alimentar brasileira, sobretudo no estado de Minas Gerais.

A ampliação do conhecimento sobre as populações microbianas, naturalmente presentes em queijos artesanais, pode ajudar a prevenir a extinção da sua biodiversidade e, conseqüentemente, a perda de uma grande variedade destes produtos (Fortina et al, 2003; Beresford et al, 2001). A biodiversidade de bactérias envolvidas na produção de queijos artesanais pode ser considerada como um dos fatores principais para a manutenção das suas características típicas (Marino, 2003).

Bactérias do ácido láctico (BAL) ocorrem naturalmente como microbiota endógena em leite cru e influenciam as características bioquímicas e sensoriais do queijo. A presença destes microrganismos também confere maior segurança ao produto em conseqüência da produção de diversos compostos antimicrobianos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas. Pesquisas com BAL endógenas podem revelar novas estirpes que apresentem efeitos benéficos às características finais de produtos lácticos artesanais e industrializados (Pogacic et al, 2011; Topsirovic et al, 2006).

O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar a microbiota de cocos mesofílicos presentes nos queijos Canastra e Serro, fabricados na época da chuva e da seca, para obtenção de conhecimentos preliminares referentes as espécies de BAL envolvidas na fermentação destes queijos. Além disso, objetivou-se comparar a diversidade genotípica de estirpes isoladas nas diferentes regiões por intermédio da técnica de pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

2. Material e métodos

2.1. Amostragem, análises microbiológicas e isolamento de bactérias

Os 8 queijos utilizados neste experimento foram coletados em duas diferentes propriedades nos meses de março (época da chuva - EC) e outubro (época da seca - ES) aos 20 dias de maturação. Esta amostragem foi realizada nas regiões da Serra da Canastra e Serro. Para determinar a contagem presuntiva de cocos mesofílicos, 10 g de queijo foram homogeneizadas em 90 mL de solução estéril de citrato de sódio a 2 % com o auxílio de um *blender* (Grosseron, Saint-Herblain, France) por 1 minuto. Diluições seriadas foram preparadas em solução salina-triptona estéril e em seguida plaqueadas em duplicata. A enumeração presuntiva de cocos mesofílicos foi feita em ágar M17 (Oxoid, Hampshire, England) após incubação, em condições aeróbias a 24 °C por 3 dias.

Trinta e cinco colônias foram selecionadas de forma randomizada a partir das placas de M17 (cuja contagem encontrava-se entre 30 e 300 colônias) em cada propriedade avaliada, nas duas estações e regiões estudadas, totalizando 280 isolados. As colônias foram purificadas e submetidas a exame microscópico, coloração de Gram e teste de catalase. Os isolados foram mantidos a -80 °C em caldo M17 contendo 15 % de glicerol.

2.2. Identificação das espécies isoladas

A identificação dos isolados foi realizada por intermédio de reações de PCR espécie-específica. As culturas submetidas à reação de PCR eram previamente ativadas (3 vezes) em caldo M17. Alíquota de 1 mL foi centrifugada a 10.000 g por 10 min., e o *pellet* resuspendido em 1 mL de água estéril. Dois µL desta suspensão foram utilizados para a PCR. Foram utilizados *primers* para *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Licitra et al, 2007), *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Pu et al., 2002). Os parâmetros para cada

ciclo, as concentrações dos *primer*, MgCl₂, dNTPs e uso da Taq polimerase em todas as reações de PCR foram os mesmos relatados pelos diferentes autores citados anteriormente. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador C1000 Thermal Cycler (BioRad). Após a amplificação, 5 µL do amplicon obtido, acrescidos de 2 µL de corante Orange loading dye solution (Fermentas), foram submetidos a eletroforese a 5 V cm⁻¹ em gel de agarose a 1,5 % em tampão de TBE 0,5 x (1 M Tris-Borato, EDTA 0,5 M, pH 8,5). Em seguida, o gel foi mergulhado por 15 min em uma solução de brometo de etídio (0,5 g/mL) e fotografado em luz UV.

Os isolados que não foram identificados por intermédio de reações de PCR com os *primers* espécie-específica acima citados, tiveram uma porção de 1500 pb do gene que codifica rRNA 16S amplificado (Godon et al, 1997) e sequenciado. A reação de PCR foi submetida aos seguintes ciclos térmicos: 4 min a 96 °C, em seguida, 30 ciclos de 40 s a 96 °C , 30 s a 50 °C, 1 min e 30s a 72 °C , com extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da reação foram analisados por meio de um sequenciador de DNA ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems) segundo as instruções do fabricante.

2.3. Análise de PFGE

A análise de PFGE foi realizada em todos os isolados de *Enterococcus faecalis*. A preparação do DNA genômico intacto em blocos de agarose foi realizado segundo Gautier et al (1996) com modificações. Resumidamente, células crescidas em caldo M17 (OD₆₅₀ de 0.3) incubadas a temperatura de 30 °C foram centrifugadas (10 min/10.000g), lavadas em 5 ml de tampão TES (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, 500 mM sacarose), resuspendidas em 400 µL de EDTA 50 mM, adicionadas de 700 µL de agarose Gibco BRL (1 % em 125 mM EDTA, pH 7.0) a 60 °C e rapidamente transferidas para fôrmas de 150 µL. Os blocos de agarose formados foram lavados em TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) e incubados na solução de lise a 37°C por 4 h. Após a lise, os blocos foram novamente lavados com

TE e mergulhados na solução de desproteção a 50⁰C por 12 horas. Terminada esta etapa, os blocos foram imersos em uma solução de PMSF (175 µg de phenylmethylsulfonylfluoride/ mL em TE) e incubados por 1h a temperatura ambiente. Os blocos foram então lavados 3 vezes em TE e mantidos nesta solução a 4⁰C até o momento da digestão do DNA cromossômico.

A digestão do DNA cromossômico e a eletroforese em campo pulsado foram realizadas conforme Saeedi et al (2002). Para a digestão do DNA utilizou-se 20U da enzima de restrição *SmaI* em pré-incubação por 30 min a 30⁰C seguida da digestão por 4h a 25⁰C. *SmaI* foi escolhida para a digestão dos enterococos por apresentar uma rica seqüência de reconhecimento G+C, sendo que *Enterococcus faecalis* tem um teor de G + C de aproximadamente 40 % (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984). Os fragmentos do DNA foram separados em um aparelho CHEF DRII, Bio-Rad, segundo as condições eletroforéticas: tempo de corrida inicial de 5 s linearmente aumentado para um tempo final de corrida de 35 s (20h), seguido de tempo de corrida inicial de 5 s e tempo final de corrida de 10 s (4h). Em seguida, o gel foi mergulhado por 15 min em uma solução de brometo de etídio (0,5 g/mL) e fotografado em luz UV.

3. Resultados

3.1. Quantificação, isolamento e identificação dos cocos mesofílicos

A contagem de cocos mesofílicos, realizadas em placas contendo o meio M17 incubado a 24⁰C por 3 dias, revelou contagens entre 7,13 Log UFC.g⁻¹ e 9,06 Log UFC.g⁻¹ para os queijos Canastra e de 6,92 Log UFC.g⁻¹ a 9,34 Log UFC.g⁻¹ para o queijo do Serro. Na tabela 1 estão indicadas as espécies identificadas. Tratam-se das espécies de cocos predominantes, presentes nos queijos Canastra e Serro aos 20 dias de maturação, visto que, foram isoladas nas diluições mais elevadas a partir das placas cuja contagem se situava entre 30 e 300 colônias.

Tabela 1. Identificação genotípica das espécies isoladas em meio M17, incubado a 24 °C/3 dias, presentes nos queijos Canastra e Serro

| Origem dos isolados | Total de isolados | Identificação | Número de estirpes |
|---------------------|-------------------|--|--------------------|
| C1 - EC | 32 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 15 |
| | | <i>Lactococcus garvieae</i> | 02 |
| | | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 11 |
| | | <i>Leuconostoc fallax</i> | 04 |
| C1 - ES | 34 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 23 |
| | | <i>Enterococcus italicus</i> | 01 |
| | | <i>Leuconostoc fallax</i> | 09 |
| | | <i>Leuconostoc mesenteroide</i> subsp. <i>mesenteroide</i> | 01 |
| C2 - EC | 35 | <i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> | 35 |
| | | | |
| C2 - ES | 31 | <i>Enterococcus faecium</i> | 03 |
| | | <i>Enterococcus durans</i> | 06 |
| | | <i>Enterococcus italicus</i> | 01 |
| | | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 09 |
| | | <i>Leuconostoc fallax</i> | 11 |
| | | <i>Leuconostoc mesenteroide</i> subsp. <i>mesenteroide</i> | 01 |
| S1 - EC | 35 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 14 |
| | | <i>Streptococcus salivarius</i> | 21 |
| S1 - ES | 35 | <i>Streptococcus salivarius</i> | 35 |
| S2 - EC | 34 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 29 |
| | | <i>Lactococcus garvieae</i> | 01 |
| | | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 04 |
| S2 - ES | 35 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 20 |
| | | <i>Streptococcus salivarius</i> | 15 |

C1 e C2: queijos Canastras, S1 e S2: queijos do Serro, EC: época da chuva, ES: época da seca.

No total, foram detectados 4 gêneros e 10 espécies diferentes. Os queijos Canastra apresentaram maior diversidade quanto ao número de espécies encontradas (9 espécies) que o queijo Serro (4 espécies). Três espécies são comuns a ambos os queijos, enquanto que uma espécie foi encontrada apenas no queijo do Serro e outras 6 espécies foram

específicas do queijo Canastra, como pode ser melhor visualizado na figura 1.

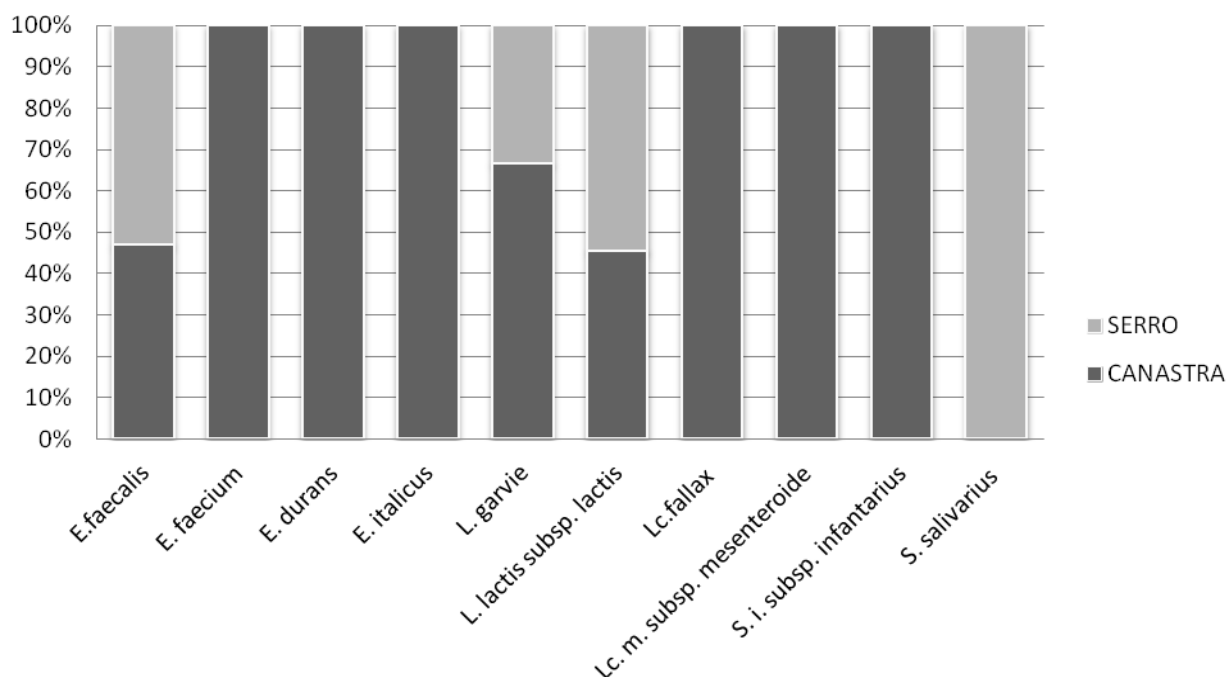


Figura 1. Frequência de distribuição das espécies isoladas a partir do meio M17 incubado a 24⁰C/3dias presentes no queijo Canastra e Serro

Os isolados referentes às espécies *Enterococcus italicus*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc mesenteroide* subsp. *mesenteroide*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Streptococcus salivarius*, foram identificados por intermédio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

3.2. Diversidade genética de *Enterococcus faecalis*

A análise de PFGE foi realizada para explorar a diversidade genética de 81 *Enterococcus faecalis* isolados a partir dos queijos Canastra e Serro por se tratar da espécie mais frequentemente encontrada, constituindo 30 %

do total de isolados identificados nas duas regiões estudadas. Os isolados foram originários do queijo Canastra C1 coletado na época das águas (15 isolados) e na época da seca (23 isolados) e dos queijos do Serro S1 (14 isolados) e S2 (29 isolados), ambos coletados na época da chuva. Foram considerados como tendo o mesmo perfil PFGE as estirpes que partilhavam pelo menos 86 % de similaridade (Braak et al, 2000). Como pode ser observado no dendograma da Fig. 2, as estirpes isoladas nos queijos Canastra e Serro apresentaram similaridade de apenas 25,5% sendo, portanto, considerados não-relacionadas entre si (Tenover et al., 1995).

Entre as 38 estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas nos queijos Canastra avaliados, detectou-se 10 diferentes genótipos, dos quais, 7 foram encontrados apenas na época da seca e 2 apenas na época das chuvas. Um genótipo (genótipo 16, ver Fig. 2) foi encontrado em ambas as estações sugerindo tratar-se de uma estirpe melhor adaptada as variações do ambiente.

As estirpes de *Enterococcus faecalis* estudadas no queijo do Serro foram isoladas em queijos fabricados em 2 propriedades rurais e apresentaram perfis de PFGE distintos (similaridade de 44,2 %) como observado na Fig. 2. Os 14 isolados do queijo S1 apresentaram o mesmo perfil genotípico, por outro lado, o queijo S2 com 29 isolados de *Enterococcus faecalis* apresentou 6 diferentes genótipos, demonstrando maior diversidade ao nível de subespécie que a amostra S1.

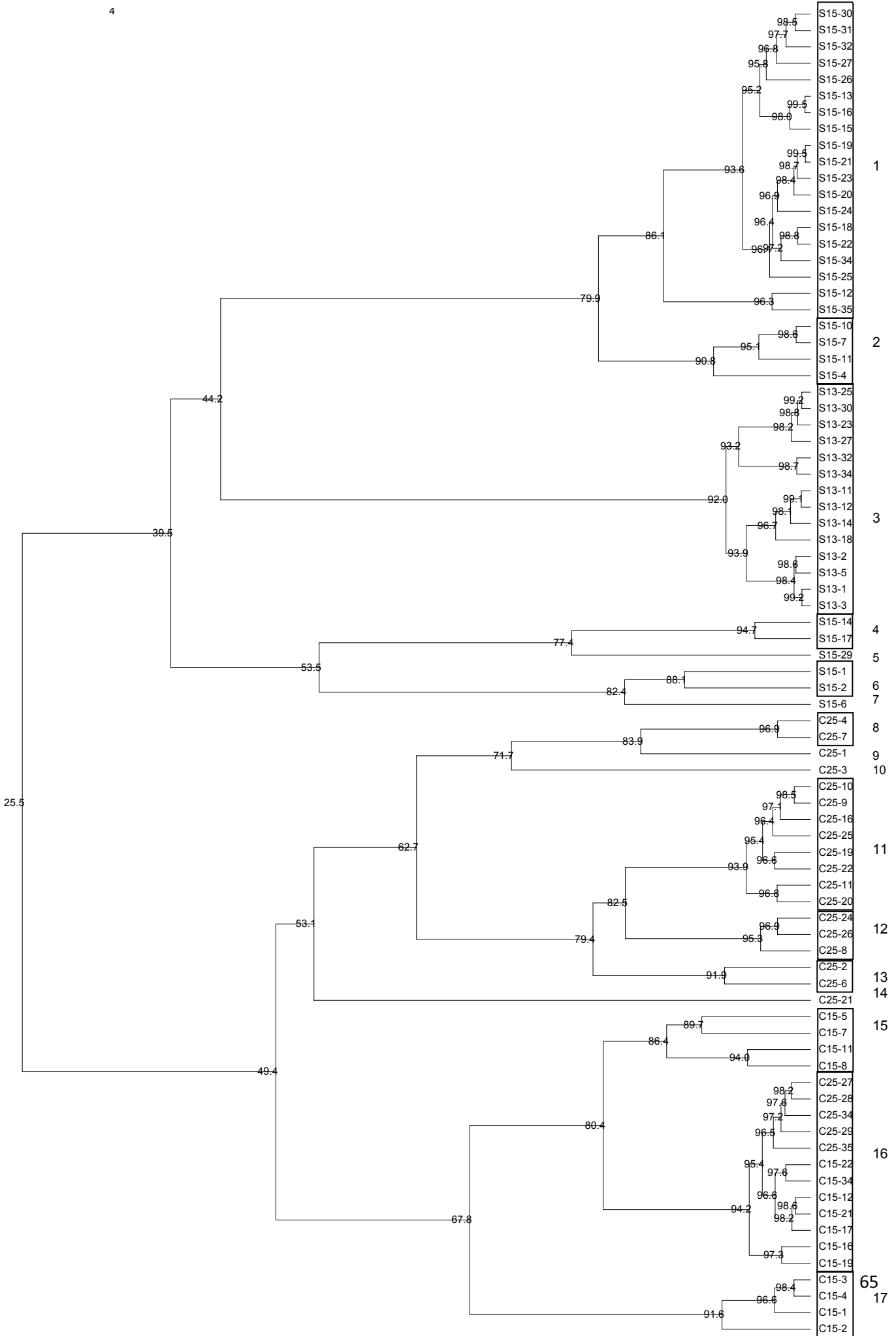


Figura 2. Dendograma mostrando os grupos (*clusters*) das estirpes de *Enterococcus faecalis* isolados no queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-) e no queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-), analisados com GelCompar software (Applied-Maths, Belgium).

4. Discussão

Alimentos típicos e tradicionais representam um importante patrimônio para a região que o produz e uma excelente oportunidade para o desenvolvimento de áreas rurais (Alessandria et al, 2008). Isto é uma grande verdade para os queijos artesanais Canastra e Serro. Juntas, estas duas regiões produzem 8.893 toneladas de queijo por ano e empregam diretamente 6.571 indivíduos (EMATER, 2008).

Bactérias do ácido láctico naturalmente presentes no leite e no ambiente de produção, desempenham um papel crítico na produção de queijos artesanais. No presente trabalho, enfatizou-se o estudo dos cocos de BAL por sua importante ação como cultura iniciadora e também pela contribuição na maturação dos queijos, onde suas enzimas estão envolvidas na proteólise e na produção de compostos aromáticos a partir de aminoácidos (Fox e Wallace, 1997).

Os queijos Canastra e Serro avaliados no presente trabalho apresentaram altas contagens de cocos no meio M17 incubados a 24 °C por 3 dias. Embora a temperatura de incubação empregada direcione para o crescimento de microrganismos mesofílicos, espécies termofílicas como *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, também foram isoladas em ambos os queijos.

Com base nos 271 isolados identificados, pode-se ressaltar que os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são comuns a ambos os queijos. Porém, o gênero *Leuconostoc* foi encontrado apenas no queijo Canastra. Este gênero tem um importante papel na tecnologia de produtos lácticos graças ao metabolismo do citrato, conduzindo a formação de diacetil, um importante componente do aroma em produtos lácticos, e outros

compostos como acetato e acetoína (Hemme et al, 2004; Bourel et al, 2001).

No queijo Canastra, 89 % da microbiota identificada se refere às espécies *Enterococcus faecalis* (29 %), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (15 %), *Leuconostoc fallax* (18 %) e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (27 %). Esta última espécie foi isolada apenas no queijo Canastra C2 na época da chuva, porém de forma predominante. *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* pertence ao grupo *Streptococcus bovis* e, embora já tenha sido isolado em alguns produtos lácteos (Shori, 2012; Abdelgadir et al, 2008) é considerado um patógeno potencial para humanos (Schlegel et al, 2000). Sua total predominância sobre as outras LAB pode estar relacionada à produção de bacteriocinas previamente detectada por Jans et al (2010) em estirpes isoladas em leite de camelo fermentado espontaneamente.

A ocorrência das espécies *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* não é surpreendente, visto que são espécies comumente encontradas em diversos queijos artesanais (Casalta et al, 2009; Dolci et al, 2008; Psoni et al, 2006; Fortina et al, 2003; Marino et al, 2003). Por outro lado, a presença (18 % do total de isolados) da espécie *Leuconostoc fallax* é interessante por se tratar de uma espécie normalmente isolada em vegetais fermentados (Barrangou et al, 2002). Outras espécies como *Leuconostoc mesenteroide* subsp. *mesenteroide*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus italicus* e *Enterococcus faecium* foram menos frequentes e, juntas, constituem 11 % da microbiota identificada no queijo Canastra.

O queijo do Serro apresentou menor diversidade de gênero e espécie quando comparado ao queijo Canastra. *Streptococcus salivarius* foi a espécie predominante, representando 51 % do total de isolados obtidos neste produto. Esta foi a principal espécie encontrada em queijos Canastra avaliados aos 60 dias de maturação por Lacerda e colaboradores (2011) e também, em menor proporção, no queijo artesanal francês, Salers (Callon et al, 2004). *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* , assim

como no queijo Canastra, são importantes espécies também no queijo do Serro e constituem respectivamente a 31 % e 17% do total de isolados para este queijo. Como espécie minoritária que compõe a microbiota de cocos no queijo do Serro pode-se citar *Lactococcus garvieae* correspondendo a 1 % dos isolados identificados.

Entre os métodos moleculares usados para tipagem de espécies bacterianas, PFGE é considerado um dos mais confiáveis devido ao seu poder discriminatório, sensibilidade e reprodutibilidade (Gordillo et al, 1993; Chiew e Hall, 1998). No presente trabalho, 17 diferentes perfis de PFGE foram identificados entre os isolados de *Enterococcus faecalis*. Os resultados mostram que a distância geográfica entre as duas regiões estudadas, Canastra e Serro, se reflete em estirpes não relacionadas entre si (similaridade 25,5 %). Mesmo quando comparada diferentes fazendas em uma mesma região, como realizado no queijo do Serro, observa-se uma similaridade < 50 % entre as estirpes, considerado como estirpes não-relacionadas, segundo critério adotado por Tenover et al (1995). Isto demonstra uma relação entre genótipo e origem das estirpes que pode vir a refletir nas características sensoriais desses queijos. O resultado das análises de PFGE aponta para uma maior diversidade, também ao nível de estirpes (*Enterococcus faecalis*), nos queijos Canastra.

Este estudo revelou a diversidade de cocci de bactérias lácticas em queijos Canastra e Serro. Em função do número reduzido de amostras, pode ser assumido que através da análise de um número maior de queijos a diversidade hora observada seja ainda maior. Posteriormente será interessante estabelecer a interação entre a microbiota existente e as características sensoriais destes produtos.

5. Referências

Abdelgadir, W., Nielsen, D. S., Hamad, S., Jakobsen, A. A traditional Sudanese fermented camel's milk product, Gariss, as a habitat of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 215-219, 2008

Alessandria, P. D. V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 392-399, 2008.

Barrangou, R., Yoon, S.S., Breidt Jr., F., Fleming, H. P., Klaenhammer, T. R., Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2877-2884, 2002.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M., Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

Bourel, G. et al. Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. **Le Lait**, v. 81, n. 1, p. 75-82, 2001.

Braak, N. V. D., Power, E., Anthony, R., Endtz, H. P., Verbrugh, H. A., Belkum, A. V., Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of SmaI DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, p. 45-52, 2000.

Callon, C., Millet, L., Montel, M.C., Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 231-244, 2004.

Casalta E, Sorba JM, Aigle M, Ogier JC. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 243-251, 2009.

Chiew, Y. F., Hall, L. M., Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycoside resistances. **Journal of Hospital Infection**, v. 38, p. 223-230

Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantisiou, K., Cocolin, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 392-399, 2008.

EMATER. Mapa do queijo Minas artesanal. Relatório Técnico, 2008. Disponível em <
http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_pgn_downloads_vert&grupo=135&menu=59 > Acesso em 25.01.2012

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandani, 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, p. 397-404, 2003.

Fox, P. F., J. M., Wallace. Formation of flavor compounds in cheese. **Advances in Food Microbiology**, v. 45, p. 1-37, 1997.

Gordillo, M. E., Sigh, K. V., Murray, B. E., Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1570-1574.

Gautier, M., Carvalho, A.F., Rouault, A. DNA Fingerprinting of dairy Propionibacteria Strains by pulsed-field gel electrophoresis. **Current Microbiology**, v. 32, p. 17-24, 1996.

Hemme, D.; Foucaud-Scheunemann, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467-494. 2004.

Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P. M. K., Lacroix, C., Meile, L. Novel characteristics of African *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*

potentially responsible for the predominance over other lactic acid bacteria in spontaneously fermented camel milk. *Word Food System – A Contribution from Europe*, Zurich, 2010.

Lacerda, I. C. A., Gomes, F. C. O., Borelli, B. M., Faria Jr., C. L. L., Franco, G. R., Mourão, M. M., Morais, P. B., Rosa, C. A., Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and Minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 650-657, 2011.

Licitra, G., Ogier, J. C., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T. M., Falentin, H., Madec, M. N., Carpino, S., Lortal, S. Variability of the bacterial biofilms of the tina wood vat used in the Ragusano cheese making process. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6980-6987, 2007.

Marino, M., Maifreni, M., Rondinini, G., Microbiological *characterization of* artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 133-140, 2003.

Meneses, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil. *Dossiê Interpretativo*, v. 1, Belo Horizonte, 2006.

Pogacic, T., Kagkli, D. M., Sikora, S., Kalit, S., Havranek, J., Samarzija, D. Experimental approaches for identification of indigenous lactococci isolated from dairy products. **Mljekarstvo**, v. 61, p. 3-14, 2011.

Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 109-120, 2006.

Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. Y., Powell, I. B., Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 353-361, 2002.

Saeedi, B., Hällgren, A., Jonasson, J., Nilsson, L. E., Hanberger, H., Isaksson, B. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing enterococci. **APMIS**, v. 110, p. 869-974, 2002.

Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Régnault, B., Grimont, P. A. D., Bouvet, A. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1425-1434, 2000.

Schleifer, K. H., Kilpper-Bälz, R., Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal Systematic Bacteriological**, v. 34, p. 31-34, 1984.

Shori, A. B. Comparative study of chemical composition, isolation and identification of micro-flora in traditional fermented camel milk products: Gariss, Suusac and Shubat. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, doi: 10.1016/j.jssas.2011.12.001, 2012.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, *Mickelsen* PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

Terzaghi, B. E., Sandine, W. E., Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 807-813, 1975.

Topisirovic, L. Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J. Potencial of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 230-235, 2006.

- Capítulo 3 -

Perfil sensorial dos queijos Minas artesanal produzidos na região da Serra da Canastra e Serro, MG

Abstract

The objective of this study was to establish the sensory profiles of Serro and Canastra cheeses at 18 and 23 days of ripening, respectively. The method of quantitative descriptive analysis (QDA) was employed for the sensory analysis of the samples. Physical, visual, physicochemical and microbiological analyzes were also carried out. The Canastra and Serro cheeses are characterized by cylindrical shape, without bulging on the surface and side, and uniform distribution of little eyelet holes of mechanical kind in Canastra cheese and mechanical and microbial kind in Serro cheese. The Serro cheese can be classified as a cheese with high moisture level (>45.9%) and the Canastra cheese has average moisture level. In both cheeses all microbiological parameters evaluated were within the standards established by legislation. We selected 16 attributes for the sensory characterization of the two cheeses: skin color; skin color uniformity; surface roughness; mass color; buttery, curd, barnyard and rancid aroma; elasticity; hardness; friability; stickiness; salty, bitter and sour taste; and spicy flavor. The Canastra cheeses' profiles were very homogeneous and differed among themselves in 5 attributes, on the other hand, the Serro cheeses' profiles had a greater variation, differing in 10 of the 16 evaluated attributes. Evaluating the averages of Canasta and Serro cheeses data, they differed in 11 attributes, but the ones that best differentiated and distinguished them were: skin color, barnyard and rancid aroma, and sour taste.

Keywords: Canastra cheese, Serro cheese, sensory characterization, raw milk.

Resumo

O objetivo deste estudo foi estabelecer o perfil sensorial dos queijos Canastra e Serro aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente. Para a análise sensorial das amostras foi utilizado o método de análise descritiva quantitativa (ADQ). Adicionalmente foram realizadas análises físicas, visuais, físico-químicas e microbiológicas. Os queijos Canastra e Serro se caracterizaram por apresentarem formato cilíndrico, sem abaulamento na superfície e na lateral e apresentaram poucas olhaduras, com distribuição uniformes, do tipo mecânica no queijo Canastra e do tipo mecânica e microbiana no queijo do Serro. O queijo do Serro pode ser classificado como um queijo de alta umidade (> 45,9 %) e o queijo Canastra de média umidade. Todos os parâmetros microbiológicos avaliados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, em ambos os queijos. Foram selecionados 16 atributos para a caracterização sensorial dos 2 queijos, são eles: cor da casca, uniformidade da cor da casca, rugosidade da superfície, cor da massa, aroma amanteigado, de coalhada, de curral e de ranço, elasticidade, dureza, friabilidade, adesividade, gosto salgado, amargo e ácido e sensação picante. Os queijos Canastra apresentaram perfis bastante homogêneos e diferiram entre si em 5 atributos. Por outro lado, os queijos do Serro apresentaram perfis bastante variados, diferindo em 10 dos 16 atributos avaliados. Quando comparado as médias do queijo Canastra e Serro estes dois queijos diferem em 11 atributos, sendo cor da casca, aroma de curral e de ranço e gosto ácido os atributos que melhor os diferenciaram.

Palavras-chave: queijo Canastra, queijo do Serro, caracterização sensorial, leite cru.

1. Introdução

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil. Entre as principais variedades produzidas, podem-se citar os queijos Minas artesanal cuja produção se estende por mais de 600 municípios dos quais 17 fazem parte da região da Serra da Canastra (7 municípios) e Serro (10 municípios), tradicionais na fabricação deste produto.

O queijo do Serro foi o primeiro queijo brasileiro a ter sua indicação geográfica reconhecida, sendo que a região da Serra da Canastra segue o mesmo processo de reconhecimento para diferenciação do seu produto, o queijo Canastra. Com a entrada em vigor da nova legislação federal, a Instrução Normativa n. 57 (BRASIL, 2011) que permite, sob certas condições, a produção e comercialização de queijo fabricado a partir de leite cru com maturação inferior a 60 dias, espera-se uma intensificação do consumo dos queijos artesanais visto que os mesmos poderão ser comercializados de forma legal e em âmbito nacional.

Entretanto, nenhum trabalho até o presente determinou os atributos sensoriais que caracterizam e diferenciam os queijos Minas artesanal fabricados nas regiões da Serra da Canastra e no Serro. A textura, o aspecto, o sabor e o aroma são as principais categorias de atributos que definem conjuntamente a qualidade sensorial de um alimento e podem ser identificadas e quantificadas pelo uso da análise descritiva quantitativa (ADQ) (Murray et al, 2001; Jack et al., 1993). Este método proporciona uma completa descrição e quantificação das propriedades sensoriais de um produto, representando um dos métodos mais completos e sofisticados para a caracterização dos atributos sensoriais (ABNT, 1998; Stone et al., 1974).

O presente estudo visa estabelecer, pelo método de ADQ, os atributos sensoriais que caracterizam os queijos artesanais Canastra e Serro fabricados por três diferentes produtores em cada uma das regiões pesquisadas. Ao mesmo tempo, comparar o perfil sensorial dos queijos produzidos nestas duas regiões.

2. Material e Metodologia

2.1. Amostras

Foram avaliadas 3 amostras dos queijos Canastra e Serro, coletadas com 3 repetições em cada uma das 6 propriedades rurais produtoras. O critério para escolha dos queijos foi a seleção dos 3 produtos mais característicos de cada região, decidido em conjunto com as associações de produtores e técnicos da empresa de assistência técnica e extensão rural do estado de Minas Gerais (EMATER-MG). Os queijos Canastra e Serro foram analisados aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente. Este tempo, foi anteriormente definido como necessário para a garantia da segurança microbiológica desses produtos (Dores, 2007; Martins, 2006). Para as análises sensoriais, os queijos do Serro também foram avaliados aos 23 dias de maturação para posterior comparação com o queijo Canastra com mesmo tempo de maturação.

2.2. Características físicas e visuais

Todas as amostras foram pesadas (balança Filizola BP15), medidas quanto à altura, diâmetro, espessura da casca (régua Bandeirante 1041) e analisadas visualmente quanto à presença de abaulamento e olhaduras.

2.3. Características físico-químicas e microbiológicas

Foram realizadas determinações de pH pelo método potenciométrico, acidez em ácido láctico, cloreto de sódio, gordura e umidade segundo BRASIL, 2006. Para as análises microbiológicas, seguiu-se as recomendações da legislação do estado (Lei 14.185, de 12 de janeiro de 2002) para queijo Minas artesanal que preconiza as análises de Coliformes a 30⁰C e 45⁰C (Petrifilm[®] - AOAC 991.14), *Staphylococcus aureus* (Petrifilm[®] - AOAC 981.15), *Listeria monocytogenes* (Teste REVEAL - AOAC Licença 960701) e *Salmonella sp.* (Teste REVEAL - AOAC Licença 960801).

2.4. Análise Sensorial

Para a análise sensorial das amostras foi utilizado o método de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), adaptado da metodologia descrita por Stone e Sidel (1993).

2.4.1. Recrutamento e pré-seleção dos julgadores

Por intermédio da aplicação de um questionário, foram recrutados candidatos, levando-se em consideração o interesse e a disponibilidade em participar das análises, estado de saúde e habilidade em trabalhar com a metodologia utilizada. Em seguida, os candidatos foram submetidos a uma avaliação de testes triangulares (Stone e Sidel, 1993). Para este teste foram utilizados queijo mussarela e queijo mussarela com 30 % de redução de gordura. Os candidatos que obtiveram pelo menos 60 % de acertos foram selecionados para as etapas seguintes.

2.4.2. Desenvolvimento da terminologia descritiva

Para a obtenção dos descritores foram utilizados queijos fabricados artesanalmente nas regiões da Canastra e Serro. Os mesmos foram codificados e apresentados aleatoriamente para a realização do teste. O levantamento dos atributos foi realizado utilizando-se o método de rede (Moskowitz, 1983). Para tanto, foram realizadas três sessões e em cada uma delas, duas amostras foram avaliadas, solicitando-se aos candidatos que descrevessem as similaridades e as diferenças entre as amostras em formulários específicos.

Após a geração dos descritores, foi realizado uma discussão em grupo, sob a supervisão de um moderador com o intuito de agrupar os termos semelhantes e definir os padrões de referência para ancoragem dos extremos da escala não estruturada de 9 cm.

2.4.3. Treinamento da equipe

Os candidatos pré-selecionados passaram por sessões de treinamento que consistiram na apresentação e familiarização do conceito de cada atributo, bem como, das referências utilizadas para cada atributo e que ancoram o extremo da escala não estruturada. Também foram orientados a exercitar o uso da escala hedônica não estruturada, provar e memorizar os padrões referentes a cada atributo.

2.4.4. Seleção dos provadores

Para a seleção final dos candidatos, realizou-se a análise de 2 amostras de queijo (Canastra e Serro) em 4 repetições. Os provadores foram selecionados em função das habilidades de discriminar as amostras entre si, repetibilidade nas avaliações e, concordância entre os provadores (Damásio e Costell, 1991). Para isso, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) para o resultado de cada provador e para cada descritor avaliado, com duas fontes de variação (amostra e repetição). Foram selecionados os provadores que apresentaram boa capacidade discriminativa ($p_{\text{amostra}} < 0,05$) e boa reprodutibilidade nos resultados ($p_{\text{repetição}} > 0,05$) para todos os atributos.

2.4.5. Análise das amostras

As amostras foram avaliadas de forma monádica em cabines individuais, sob luz branca. Os provadores receberam amostras com as dimensões: 1,5 cm x 1,5 cm x 5 cm para avaliação dos atributos de aroma, textura, sabor e sensação picante. Para avaliação da aparência foi apresentado uma amostra equivalente a $\frac{1}{4}$ do tamanho do queijo a ser analisado. As amostras foram servidas de forma aleatória e balanceada, em pratos descartáveis codificados com 3 dígitos aleatórios, acompanhado de um copo de água a temperatura ambiente e uma ficha de avaliação.

2.4.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados por intermédio da análise de variância (ANOVA) com duas fontes de variação (amostra e provador) e interação amostra-provador para cada atributo. Havendo diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$), as mesmas foram submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5 %.

3. Resultados e discussão

3.1. Características físicas e visuais dos queijos Canastra e Serro

As características físicas e visuais encontradas nos queijos Canastra e Serro podem ser visualizadas na tabela 1. Os queijos Canastra e Serro aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente, se caracterizaram por apresentarem formato cilíndrico, sem abaulamento na superfície e na lateral e apresentarem poucas olhaduras com distribuição uniformes, do tipo mecânica no queijo Canastra e do tipo mista (mecânica e microbiana) no queijo Serro.

Tabela 1. Características físicas e visuais dos queijos Canastra e Serro aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente

| Características | Canastra | | | Serro | | |
|---|----------|------------|---------|--------|-----------------------|--------|
| | Mínimo | Média | Máximo | Mínimo | Média | Máximo |
| Formato | - | Cilíndrico | - | - | Cilíndrico | - |
| Peso (g) | 791,00 | 951,49 | 1010,00 | 730,00 | 829,02 | 993,00 |
| Altura (cm) | 3,70 | 4,47 | 4,90 | 4,30 | 5,24 | 7,00 |
| Diâmetro (cm) | 14,80 | 15,06 | 16,00 | 12,00 | 13,51 | 15,00 |
| Abaulamento na superfície | - | Não | - | - | Não | - |
| Abaulamento lateral | - | Não | - | - | Não | - |
| Espessura da casca na superfície (cm) | 0,20 | 0,44 | 0,60 | 0,00 | 0,21 | 0,50 |
| Espessura da casca na lateral (cm) | 0,20 | 0,32 | 0,60 | 0,00 | 0,20 | 0,50 |
| Olhaduras | - | Sim | - | - | Sim | - |
| Distribuição uniforme das olhaduras | - | Sim | - | - | Sim | - |
| Tipo de olhadura | - | Mecânica | - | - | Mecânica e Microbiana | - |
| Tamanho da olhadura: até 2 mm (em 3 cm ²) | 0,00 | 2,52 | 4,00 | 0,00 | 2,39 | 7,00 |
| de 2 a 5 mm (em 3 cm ²) | 0,00 | 0,47 | 4,00 | 0,00 | 2,11 | 10,00 |
| de 5 a 8 mm (em 3 cm ²) | 0,00 | 0,25 | 3,00 | 0,00 | 0,75 | 3,00 |

3.2. Características físico-químicas e microbiológicas

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos queijos Canastra e Serro avaliados aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente, podem ser visualizados na tabela 2. Segundo o regulamento da lei 14.185 de 31 de janeiro de 2002 que trata dos queijos Minas artesanal no estado de Minas Gerais, estes queijos devem

apresentar, no máximo 45,9 % de umidade enquadrando-se como queijo de média umidade como definido pela legislação federal (Portaria no 146, de 7 de março de 1996). Seguindo este critério, o queijo Serro apresentou, em média, umidade superior a estabelecida constituindo um queijo de alta umidade. Por outro lado, todos os parâmetros microbiológicos estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, em ambos os queijos.

Tabela 2. Características físico-químicas e microbiológicas dos queijos Canastra e Serro aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente

| Parâmetro | Canastra | | | Serro | | |
|--------------------------|----------|---------|--------|--------|---------|--------|
| | Mínima | Média | Máxima | Mínima | Média | Máxima |
| pH | 4,75 | 4,77 | 4,82 | 4,62 | 4,79 | 5,02 |
| Acidez (% ácido láctico) | 1,35 | 1,49 | 1,61 | 1,51 | 1,58 | 1,67 |
| Umidade (%) | 34,6 | 39,22 | 42,88 | 44,23 | 47,72 | 50,66 |
| Sal (%) | 0,56 | 1,24 | 1,66 | 1,67 | 2,23 | 2,96 |
| Gordura (%) | 28,00 | 29,18 | 31,25 | 24,5 | 25,53 | 26,5 |
| Coliformes totais* | 0,00 | 2,08 | 2,54 | 0,00 | 0,22 | 1,00 |
| <i>E. coli</i> * | 0,00 | 1,00 | 1,77 | 0,00 | 0,00 | 1,00 |
| <i>S. aureus</i> * | 0,00 | 0,64 | 1,60 | 0,00 | 1,33 | 1,63 |
| <i>Listeria sp.</i> ** | - | Ausente | - | - | Ausente | - |
| <i>Salmonella sp.</i> ** | - | Ausente | - | - | Ausente | - |

*Em Log UFC/g⁻¹. ** em 25 g.

3.3. Análise sensorial dos queijos Canastra e Serro

3.3.1. Seleção dos julgadores e desenvolvimento da terminologia descritiva

Após a aplicação dos testes triangulares, 24 candidatos foram selecionados para participarem do desenvolvimento da terminologia descritiva por intermédio do método de rede (Moskowitz, 1983). A equipe selecionou 16 termos como sendo os que melhor caracterizavam os queijos Canastra e Serro. Os atributos escolhidos, suas definições e as respectivas referências para ancoragem do mínimo e máximo na escala hedônica podem ser visualizados na tabela 3. Após treinamento e seleção final dos provadores, a equipe ficou constituída por 10 provadores, com idade entre 18 e 40 anos, sendo 2 do sexo masculino e 8 do sexo feminino. Em seguida às análises sensoriais dos queijos Canastra e Serro, dois provadores foram eliminados por desistência e mais 2 por apresentar deficiência na precisão e acurácia das suas avaliações.

Tabela 3. Lista dos atributos com suas respectivas definições e referências

| Atributo | Definição | Referências |
|-------------------------------------|---|--|
| Cor da casca | Intensidade da cor da casca variando do branco ao amarelo | Mínima: queijo Minas frescal Máxima: queijo Gruyère |
| Uniformidade da cor da casca | Presença de manchas mais claras na superfície | Mínima: 50 % mais clara. Máxima: 100 % uniforme. |
| Rugosidade da superfície | Superfície irregular | Mínima: casca de banana prata. Máxima: biscoito champagne. |
| Cor da massa | Intensidade da cor da massa variando do branco ao amarelo | Mínima: queijo Minas frescal Máxima: queijo Gruyère |
| Aroma amanteigado | Aroma característico de manteiga | Mínima: ricota Máxima: creme fermentado por 24 h. |
| Aroma coalhada | de Aroma característico de leite fermentado | Mínima: ricota Máxima: coalhada natural |
| Aroma de curral | Aroma característico de curral | Mínima: ricota Máxima: palhas e resíduos presentes no piso do estábulo. |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| Aroma de ranço | Aroma característico de ranço (gordura oxidada) | Mínima: ricota Máxima: leite cru, agitado vigorosamente por 5 min. e fermentado por 48 h |
| Elasticidade | Aptidão da amostra de recuperar sua espessura inicial após ter sido comprimido entre os dedos polegar e indicador | Mínima: queijo parmesão Máxima: queijo Minas frescal |
| Dureza | Resistência a uma dada deformação | Mínima: queijo Minas frescal Máxima: queijo parmesão |
| Friabilidade | Característica de um material que pode ser facilmente reduzido em pedaços | Mínima: queijo Minas frescal Máxima: queijo parmesão |
| Adesividade | Trabalho necessário para descolar, com a língua, produto colado no palato e nos dentes. | Mínima: clara de ovo cozido Máxima: requeijão em barra |
| Gosto salgado | É o salgado percebido ao contato do queijo com as papilas gustativas | Mínima: ricota adicionada de 1 % de sal Máxima: ricota adicionada de 3 % de sal |
| Gosto amargo | É o amargo percebido ao contato do queijo com as papilas gustativas | Mínima: ricota Máxima: ricota adicionada de 0,07 % de cafeína |
| Gosto ácido | É o ácido percebido ao contato do queijo com as papilas gustativas | Mínima: ricota Máxima: iogurte natural |
| Sensação picante | É a sensação de picotamento ao contato do queijo com a boca | Mínima: ricota Máxima: rabanete |

3.3.2. Perfil sensorial do queijo Canastra

As médias da intensidade dos atributos sensoriais investigados nos três queijos Canastra podem ser visualizadas na tabela 4. O perfil de cada um dos queijos é mostrado graficamente na Figura 1, onde o valor médio atribuído a cada descritor para cada um dos três queijos avaliados é marcado no eixo correspondente. O centro da figura representa o ponto

zero da escala utilizada na avaliação, enquanto a intensidade aumenta do centro para a periferia.

Tabela 4. Médias dos atributos sensoriais avaliados no queijo Canastra aos 23 dias de maturação

| Atributos sensoriais | Queijo Canastra | | |
|------------------------------|-----------------|--------|---------|
| | A | B | C |
| Aparência | | | |
| Cor da casca | 6,84 a | 6,88 a | 7,40 a |
| Uniformidade da cor da casca | 3,34 b | 5,94 a | 6,61 a |
| Rugosidade da casca | 4,61 a | 1,26 b | 2,21 b |
| Cor da massa | 2,82 a | 2,97 a | 3,16 a |
| Aroma | | | |
| Aroma amanteigado | 5,10 a | 5,85 a | 5,44 a |
| Aroma de coalhada | 4,40 a | 4,31 a | 4,67 a |
| Aroma de curral | 1,79 a | 0,88 b | 1,68 ab |
| Aroma de ranço | 3,08 a | 3,08 a | 3,14 a |
| Textura | | | |
| Elasticidade | 1,46 a | 2,52 a | 1,90 a |
| Dureza | 5,81 a | 5,67 a | 5,30 a |
| Friabilidade | 5,15 a | 5,84 a | 5,36 a |
| Adesividade | 2,76 a | 2,79 a | 3,16 a |
| Gosto | | | |
| Gosto salgado | 4,68 b | 6,47 a | 5,20 b |
| Gosto amargo | 4,14 a | 3,18 b | 3,75 ab |
| Gosto ácido | 4,60 a | 4,16 a | 4,43 a |
| Sensação picante | 2,96 a | 3,10 a | 2,63 a |

Médias na mesma linha, seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ($p > 0,05$).

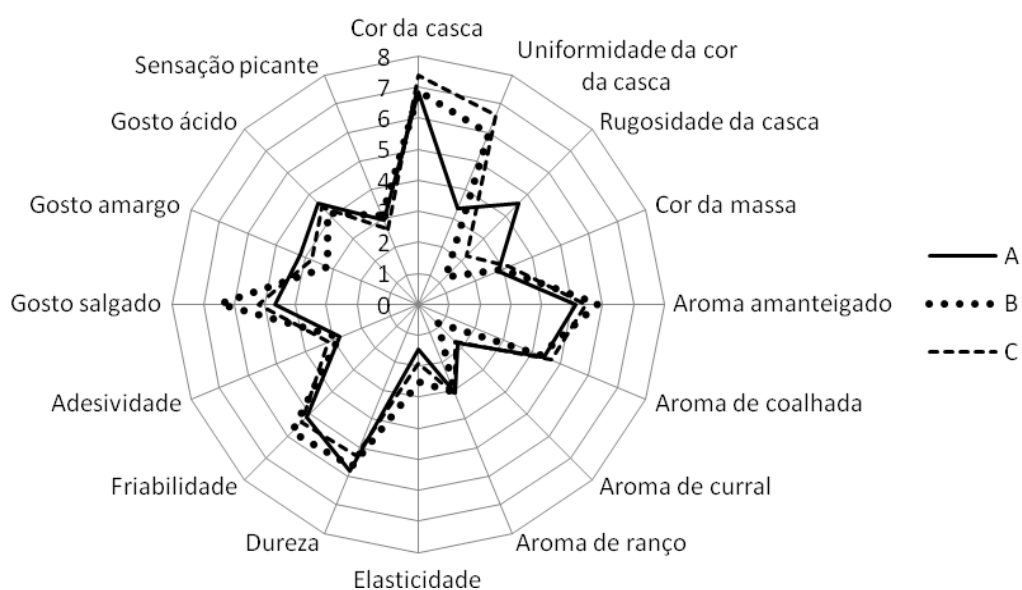


Figura 1. Perfil sensorial do queijo Canastra aos 23 dias de maturação

Dos 16 atributos avaliados, onze não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quanto à intensidade, entre os três diferentes queijos. Fica também demonstrado que os queijos Canastra diferem entre si quanto à uniformidade da cor da casca e sua rugosidade, aroma de curral, gosto salgado e amargo. O queijo A possui casca de cor menos uniforme e maior rugosidade que os demais queijos avaliados, como evidenciado na figura 1.

O queijo B apresentou gosto salgado mais intenso que as 2 outras amostras. O aroma de curral e gosto amargo foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes entre os queijos A e B, porém não diferem quando comparado ao queijo C. Os queijos B e C foram considerados pelos julgadores como muito semelhantes quanto aos atributos sensoriais avaliados, diferindo apenas quanto à intensidade do gosto salgado, enquanto que os queijos A e B foram os que mais diferiram entre si.

3.3.3. Perfil sensorial do queijo Serro

O queijo do Serro foi avaliado sensorialmente aos 18 e 23 dias de maturação. As médias da intensidade dos atributos sensoriais investigados nos três queijos Serro no tempo 18 e 23 podem ser visualizadas na tabela 5. O perfil de cada um dos queijos aos 18 e 23 dias de maturação é mostrado, respectivamente, nas figuras 2 e 3. Na figura 4 é possível observar a comparação das médias dos atributos do queijo do Serro nos 2 tempos de maturação estudados.

Tabela 5. Médias dos atributos sensoriais avaliados no queijo do Serro aos 18 e 23 dias de maturação

| Atributos sensoriais | Queijo do Serro | | | | | |
|------------------------------|----------------------|--------|--------|----------------------|---------|---------|
| | 18 dias de maturação | | | 23 dias de maturação | | |
| | D | E | F | D | E | F |
| Aparência | | | | | | |
| Cor da casca | 3,74 c | 7,48 a | 6,06 b | 4,42 b | 6,14 a | 5,46 ab |
| Uniformidade da cor da casca | 3,98 b | 6,92 a | 3,00 c | 3,26 a | 2,76 ab | 1,88 b |
| Rugosidade da casca | 0,76 b | 0,72 b | 2,57 a | 1,83 c | 4,15 b | 5,78 a |
| Cor da massa | 2,20 c | 3,80 a | 2,70 b | 2,41 b | 4,63 a | 3,03 b |
| Aroma | | | | | | |

| | | | | | | |
|-------------------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|
| Aroma amanteigado | 3,83 b | 4,95 a | 4,20 ab | 4,56 b | 6,01 a | 5,20 b |
| Aroma de coalhada | 4,31 ab | 3,61 b | 4,94 a | 4,62 a | 3,22 b | 3,69 b |
| Aroma de curral | 0,63 a | 0,73 a | 0,53 a | 0,36 a | 0,44 a | 0,28 a |
| Aroma de ranço | 1,71 a | 2,08 a | 1,75 a | 1,43 a | 1,73 a | 1,23 a |
| Textura | | | | | | |
| Elasticidade | 1,49 b | 3,22 a | 3,71 a | 0,27 b | 2,98 a | 2,90 a |
| Dureza | 3,70 a | 2,28 b | 1,45 b | 7,18 a | 2,61 b | 1,95 b |
| Friabilidade | 4,58 a | 3,68 b | 2,59 c | 7,38 a | 4,19 b | 3,04 c |
| Adesividade | 3,46 b | 4,15 b | 5,43 a | 1,66 c | 4,04 b | 4,65 a |
| Gosto | | | | | | |
| Gosto salgado | 6,09 a | 5,90 a | 5,95 a | 6,07 a | 5,89 a | 6,35 a |
| Gosto amargo | 2,38 a | 3,28 a | 2,70 a | 4,23 a | 3,65 a | 3,66 a |
| Gosto ácido | 5,47 a | 4,70 a | 5,33 a | 6,62 a | 5,68 b | 5,66 b |
| Sensação picante | 1,40 a | 1,68 a | 1,56 a | 2,06 a | 1,66 a | 1,74 a |

Médias na mesma linha, referentes ao mesmo tempo de maturação, seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade ($p > 0,05$).

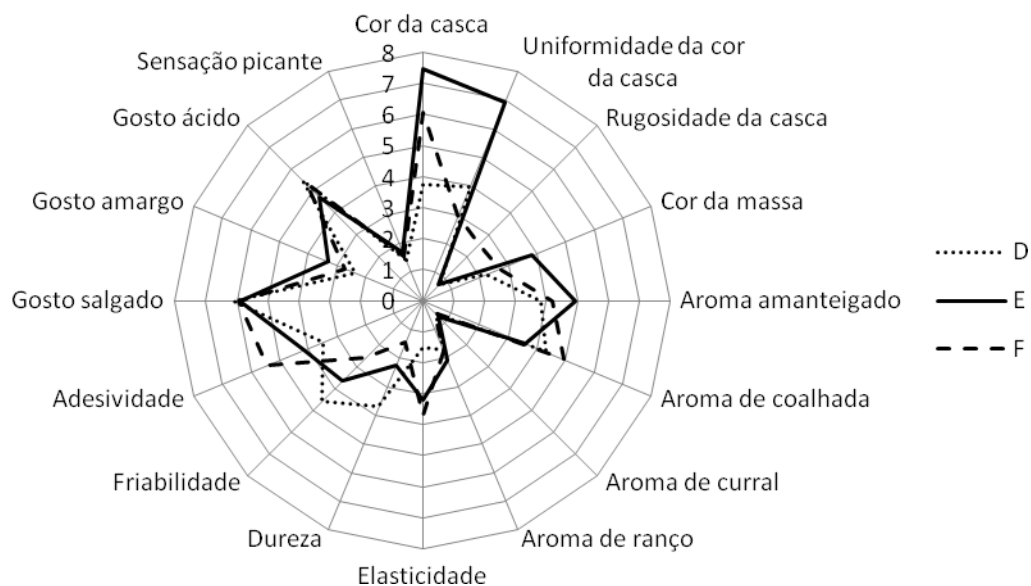


Figura 2. Perfil sensorial do queijo do Serro aos 18 dias de maturação

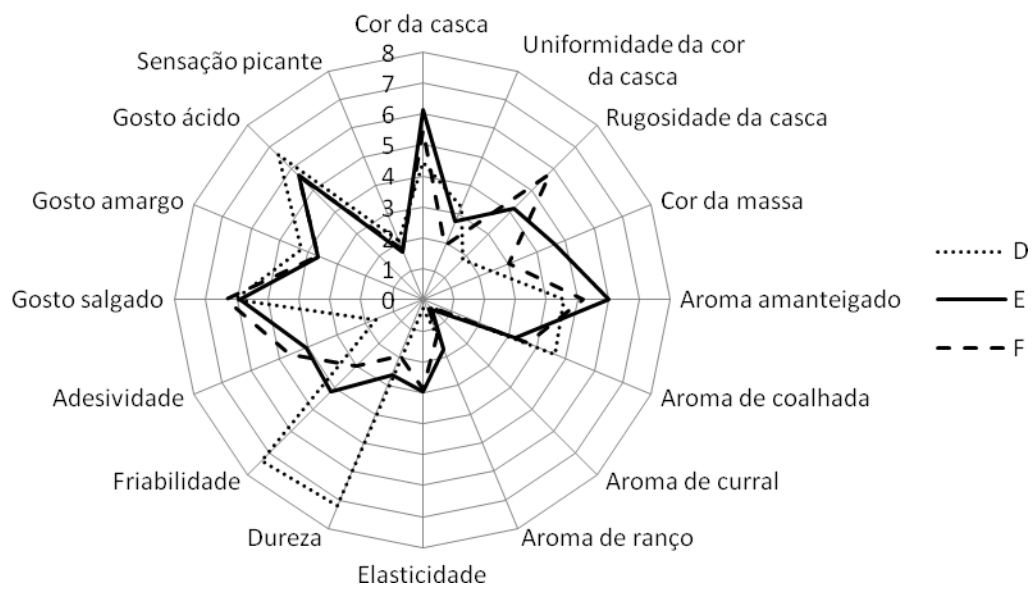
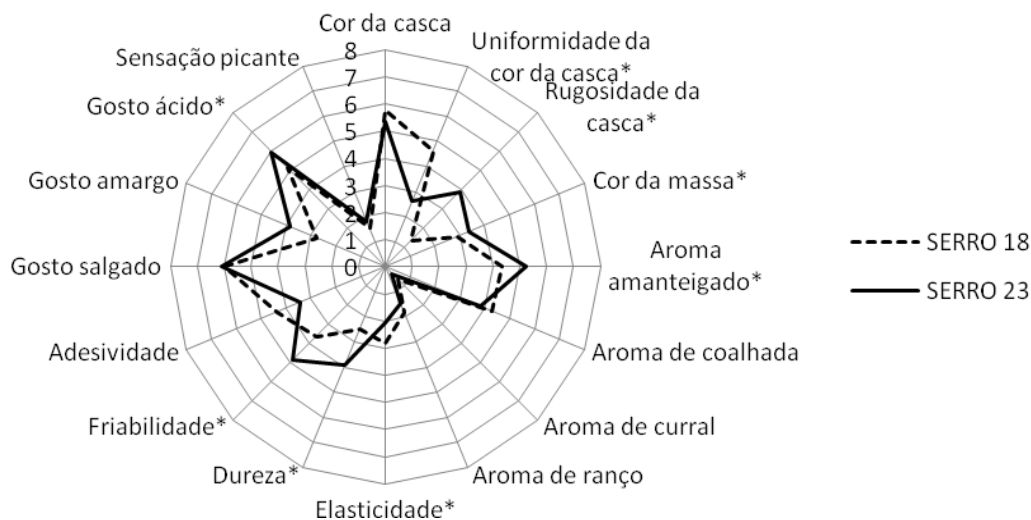


Figura 3. Perfil sensorial do queijo do Serro aos 23 dias de maturação



*Significativo a 5 % de probabilidade.

Figura 4. Média do Perfil sensorial do queijo do Serro aos 18 e 23 dias de maturação

Os queijos do Serro apresentaram uma importante diferença quanto à intensidade de seus atributos sensoriais aos 18 dias de maturação. Apenas 6, (gosto salgado, amargo e ácido, sensação picante, aroma de curral e de ranço) dos 16 atributos avaliados apresentaram resultados semelhantes ($p > 0,05$) para os 3 queijos analisados. Estas variações podem ser mais claramente visualizadas na figura 2. Resultado semelhante foi obtido por Andrade (2006) ao analisar 4 queijos de Coalho produzidos artesanalmente em um mesmo município no estado do Ceará, no qual as amostras apresentaram diferenças significativas para todos os 16 atributos avaliados.

Além do aroma de coalhada e amanteigado, todos os atributos referentes à aparência e textura diferiram significativamente ($p < 0,05$) quanto a sua intensidade em, pelo menos, dois dos queijos do Serro avaliados. A formação do aroma em queijos sofre influência de uma complexa interação entre o leite, tipo de coalho, condições de fabricação e maturação, bem como atividade da população microbiana (Kocaoglu-Vurma et al, 2008),

não sendo portanto surpreendente que queijos artesanais apresentem uma grande variação destes atributos. Os atributos referentes à aparência, com exceção da cor da massa, sofrem grande interferência da forma como o produtor trata a casca do queijo. Alguns produtores costumam raspar ou lixar a superfície do queijo antes de enviá-lo para o mercado. Quanto a textura, está diretamente ligada a composição e estrutura do queijo e é influenciada pelas etapas de processamento sobretudo à formação e manuseio da coalhada (Benevides et al, 2000).

Aos 23 dias de maturação além dos atributos que já apresentavam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os queijos avaliados no tempo 18, o gosto ácido também passou a diferir estatisticamente ($p < 0,05$) entre as amostras avaliadas, sendo este atributo percebido pelos julgadores como sendo mais intenso no queijo D. Esta característica está associada à microbiota predominante, sendo que BAL homofermentativas produzem maior quantidade de ácido que àquelas cujo metabolismo é heterofermentativo.

Quando se compara as médias dos queijos do Serro avaliados aos 18 e 23 dias de maturação (Figura 4), verifica-se que o tempo exerceu influência nos atributos sensoriais destes queijos. Aos 23 dias de maturação o queijo do Serro foi percebido pelos julgadores como sendo um produto com gosto mais ácido, textura mais dura, friável e menos elástica, aroma amanteigado mais intenso, cor da massa mais amarelada, casca mais rugosa com a cor menos uniforme que o mesmo produto avaliado aos 18 dias de maturação. Para metade (8) dos atributos avaliados, não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$).

3.3.4. Comparação do perfil sensorial do queijo Canastra e Serro

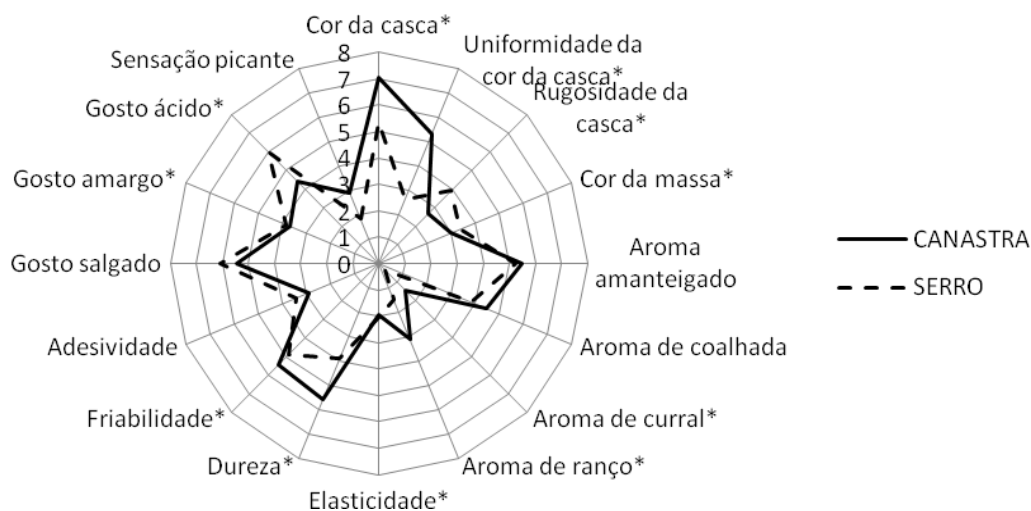
As médias dos atributos dos queijos Canastra e Serro, assim como o valor p referente à comparação das médias das duas regiões, definido pela

ANOVA encontram-se na tabela 6. Na figura 5 pode ser visualizado o perfil médio dos queijos avaliados.

Tabela 6. Médias dos atributos sensoriais avaliados nos queijos Canastra e Serro aos 23 dias de maturação

| Atributos sensoriais | Queijo | | Comparação |
|------------------------------|----------|-------|-----------------------------|
| | Canastra | Serro | Canastra x Serro p-valor |
| Aparência | | | |
| Cor da casca | 7,04 | 5,34 | < 0,001* |
| Uniformidade da cor da casca | 5,29 | 2,63 | < 0,001* |
| Rugosidade da casca | 2,69 | 3,92 | < 0,001* |
| Cor da massa | 2,98 | 3,35 | 0,010* |
| Aroma | | | |
| Aroma amanteigado | 5,46 | 5,25 | 0,812 |
| Aroma de coalhada | 4,46 | 3,84 | 0,792 |
| Aroma de curral | 1,45 | 0,36 | 0,004* |
| Aroma de ranço | 3,10 | 1,46 | 0,004* |
| Textura | | | |
| Elasticidade | 1,96 | 2,05 | < 0,001* |
| Dureza | 5,59 | 3,91 | < 0,001* |
| Friabilidade | 5,45 | 4,87 | 0,004* |
| Adesividade | 2,90 | 3,45 | 0,068 |
| Gosto | | | |
| Gosto salgado | 5,45 | 6,10 | 0,062 |
| Gosto amargo | 3,69 | 3,84 | 0,008* |
| Gosto ácido | 4,39 | 5,98 | 0,002* |
| Sensação picante | 2,89 | 1,82 | 0,715 |

* Significativo a 5 % de probabilidade.



*Significativo a 5 % de probabilidade.

Figura 5. Perfil sensorial do queijo Canastra e Serro aos 23 dias de maturação

Com base nas médias da intensidade dos atributos percebidas nos queijos Canastra e Serro pode-se inferir que o queijo Canastra, quanto à aparência, possui casca mais amarelada, uniforme e lisa enquanto o queijo do Serro possui massa mais amarelada. Os aromas de curral e ranço foram considerados mais intensos no queijo Canastra enquanto que os aromas de coalhada e amanteigado foram semelhantes para ambos os queijos. Quanto à textura, o queijo Canastra é mais duro e friável e menos elástico do que o queijo do Serro. Ambos os queijos apresentaram a mesma intensidade quanto a adesividade. Os gostos amargo e ácido foram mais intensos nos queijos do Serro enquanto que o gosto salgado não ficou evidente a diferença entre os dois produtos avaliados. A sensação picante foi considerada de mesma intensidade para os dois queijos.

Parte destas alterações está associada à diferença no teor de umidade encontrada nos dois produtos que, por sua vez, é influenciada por diferenças na tecnologia destes dois queijos. Na região da Serra da Canastra, o tecido empregado na hora da prensagem para auxiliar a dessoragem, resulta em um produto mais seco já nas primeiras horas de fabricação. No Serro a prensagem realizada apenas com o uso das mãos conduz a um produto com maior teor de umidade, e que tende a maior variação em função do manipulador e da pressão exercida por suas mãos no momento da prensagem.

Dos 16 atributos sensoriais avaliados para o queijo Canastra e Serro, onze apresentaram valores significativamente diferentes entre os 2 queijos e portanto podem ser considerados como atributos importantes na diferenciação ou reconhecimento destes dois produtos. Por outro lado, ao analisar-se a faixa dos valores encontrados para cada atributo (valores mínimos a máximos) nos 3 diferentes produtores para o queijo Canastra e Serro, observa-se que determinados atributos apresentam faixas bem delimitadas e que não se sobrepõem quando analisa-se os dois queijos em questão e por isso são atributos que mais claramente diferenciam o queijo Canastra do queijo do Serro. São eles: cor da casca, aroma de curral e de ranço e gosto ácido, como podem ser observados na figura 6 que esquematiza as faixas de valores encontrados para os queijos Canastra e Serro aos 23 dias de maturação.

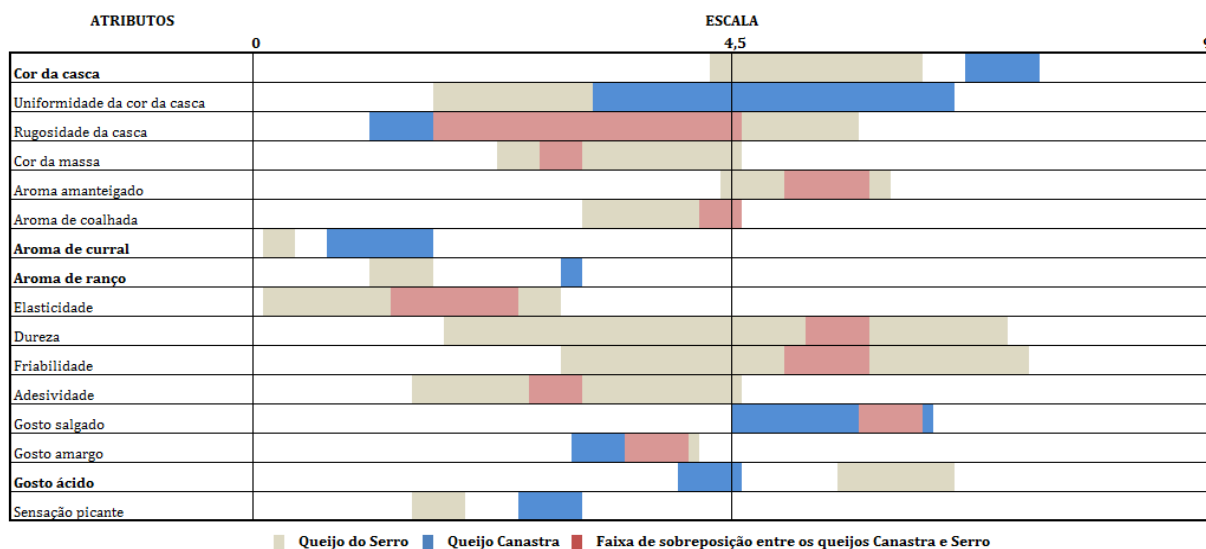


Figura 6. Diagrama das faixas de valores dos atributos sensoriais encontrados para o queijo Canastra e Serro aos 23 dias de maturação.

4. Conclusão

Os perfis sensoriais dos queijos Canastra e Serro são compostos por descritores de aparência (cor da casca, uniformidade da cor da casca, rugosidade da superfície, cor da massa), aroma (amanteigado, coalhada, curral, ranço), textura (elasticidade, dureza, friabilidade, adesividade), gosto (salgado, amargo, ácido) e sensação picante.

Os queijos Canastra avaliados, quando comparados entre si, apresentaram perfis homogêneos sendo que diferiram em no máximo 5 atributos. Por outro lado, os queijos do Serro apresentaram perfis muito variáveis, indicando que as condições de obtenção deste produto variam consideravelmente de um produtor a outro.

Os queijos Canastra e Serro diferem significativamente em 11 dos 16 descritores estudados. Sendo que os atributos que melhor os individualizam e distinguem são: cor da casca, aroma de curral e de ranço e gosto ácido.

O estabelecimento do perfil sensorial dos queijos Canastra e Serro contribui para o reconhecimento, proteção e diferenciação das

características e peculiaridades destes dois produtos artesanais. Para estudos futuros, recomenda-se que o perfil sensorial destes queijos sejam determinados em diferentes estágios de maturação em conjunto a um estudo com consumidores para a determinação da aceitabilidade em função do tempo de maturação.

5. Referências

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Alimentos e bebidas – Análise sensorial – Teste de análise descritiva quantitativa (ADQ) – NBR 14140. Rio de Janeiro: Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas, 1998.

Andrade, A. S. A., Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de Coalho produzido no estado do Ceará. Fortaleza: UFC. 2006. 127p. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará.

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. **B. CEPPA**, v. 18, n. 2, p. 193-208, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011, Brasília, 2011.

Damásio, M.H., Costell, E. Análisis sensorial descriptivo: Generación de descriptores y selección de catadores. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 31 (2), p. 165-1678, 1991.

Dores, M. T. Implicações do processo de maturação à temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais. Viçosa: UFV. 2007. 101 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

Jack, F. R., Paterson, A., Piggott, J. R. Relationships between rheology and composition of Cheddar cheeses and texture as perceived by consumers. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 28, p. 293-302, 1993.

Kocaoglu-Vurma, N.A., Harper W.J., Drake M.A., Courtney PD. Microbiological, chemical and sensory characteristics of Swiss cheese manufactured with adjunct Lactobacillus strains using a low cooking temperature. Journal of Dairy Science, v. 91, p. 2947-2959, 2008.

Martins, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro. Viçosa: UFV. 2006. 158p. Dissertação, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Moskowitz, H.R. Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R & D approaches. Westport, Food & Nutrition Press, 605 p., 1983.

Murray, J. M., Delahunty, C. M., Baxter, I. A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, v. 34, p. 461-471, 2001.

Stone, H., Sidel, J. L., Oliver, S., Woosley, A., Singleton, R. C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

Stone H. S., Sidel, J. L., Sensory evaluation practices. 2.ed. California Academic Press, 311p. 1993.

6. Conclusões Gerais

Os queijos Canastra e Serro são produtos distintos quanto à biodiversidade microbiana, características físico-químicas e sensoriais. O queijo Canastra enquadra-se na classificação de um produto de média umidade enquanto o queijo do Serro, no período da seca, apresentou umidade compatível a queijos de alta umidade (> 45,9 %). Os queijos Canastra e Serro, quando analisados aos 23 e 18 dias de maturação, respectivamente atendem ao disposto na legislação quanto as contagens de coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.

A diversidade microbiana dos queijos Canastra e Serro, avaliados aos 20 dias de maturação por intermédio das metodologias cultivo-dependente (PCR e PFGE) e cultivo-independente (TTGE) apontam para uma maior diversidade de espécies e estirpes nos queijos Canastra. Essas metodologias, também apontam as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc fallax* como as principais espécies que compõem a microbiota do queijo Canastra. No queijo do Serro se destacam as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis*.

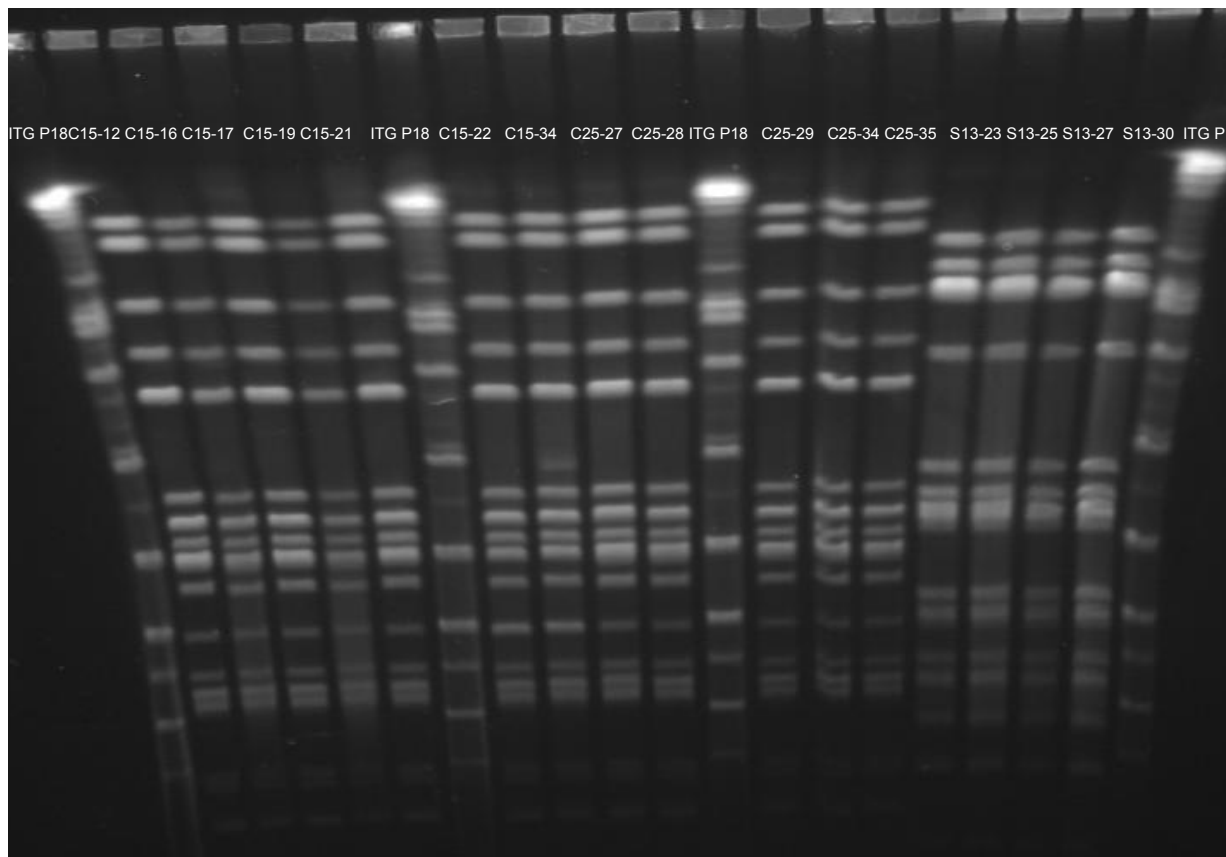
Do ponto de vista sensorial, os queijos fabricados na região da Serra da Canastra apresentam perfis semelhantes, o que indica haver certa padronização entre os produtores, nas etapas de fabricação deste produto. Os queijos do Serro apresentam perfis muito variáveis entre si. O queijo Canastra quando comparado ao queijo do Serro apresentaram diferenças significativas em 11 dos 16 atributos sensoriais definidos no presente estudo, sendo que os atributos que melhor os distinguem são a cor da casca, aroma de curral e de ranço, gosto ácido e sensação picante.

Para estudos futuros, sugere-se a análise da microbiota, acompanhada pela análise sensorial dos atributos estabelecidos no presente trabalho em amostras de um mesmo produtor, para que se possa

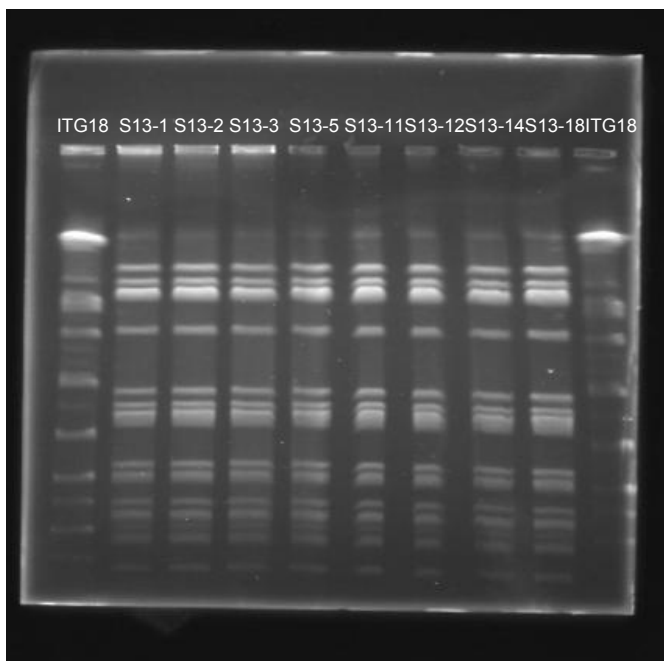
assim, inferir mais profundamente a correlação entre biodiversidade e características sensoriais nestes produtos. O acompanhamento da microbiota ao longo das etapas de fabricação, incluindo a maturação, também se faz necessário para um maior entendimento da dinâmica da população ao longo tempo.

Anexos

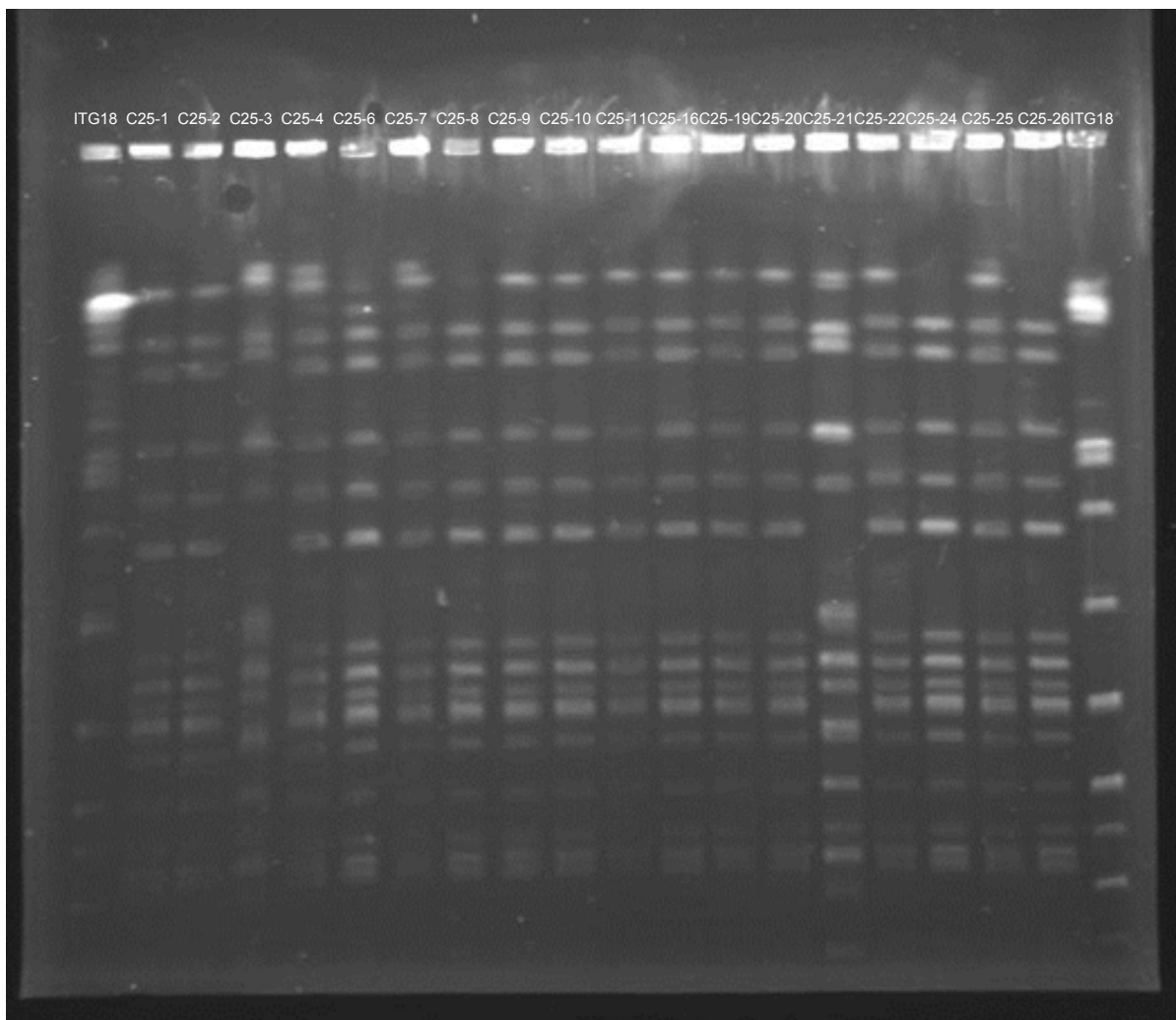
Anexo A: Fotografias dos géis de PFGE referente aos isolados de *Enterococcus faecalis* avaliados



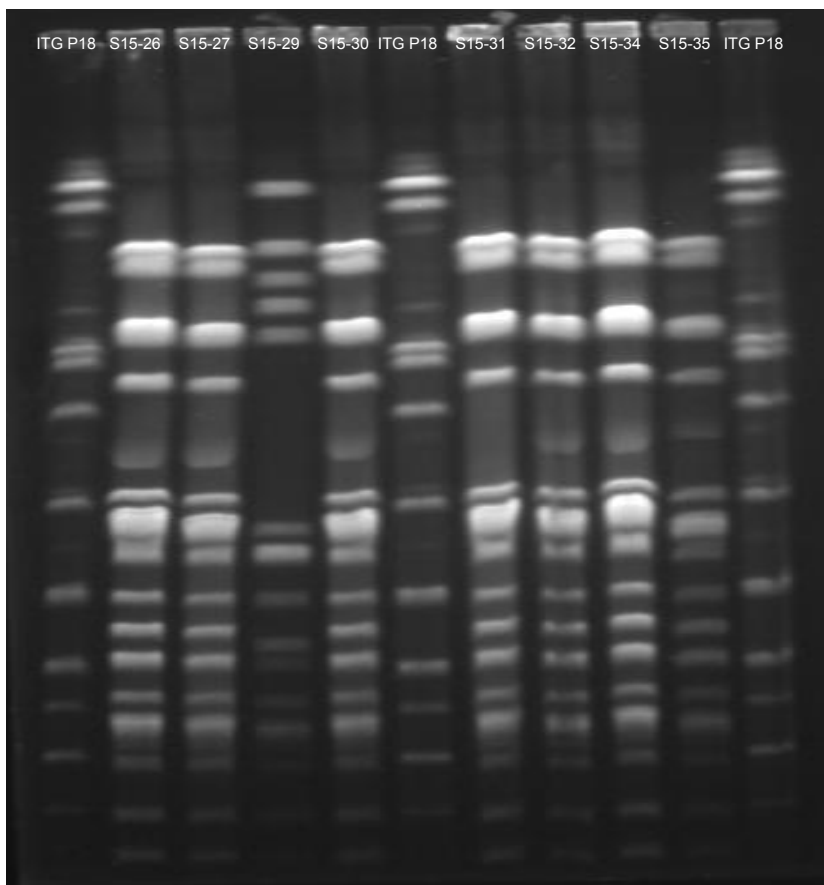
Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



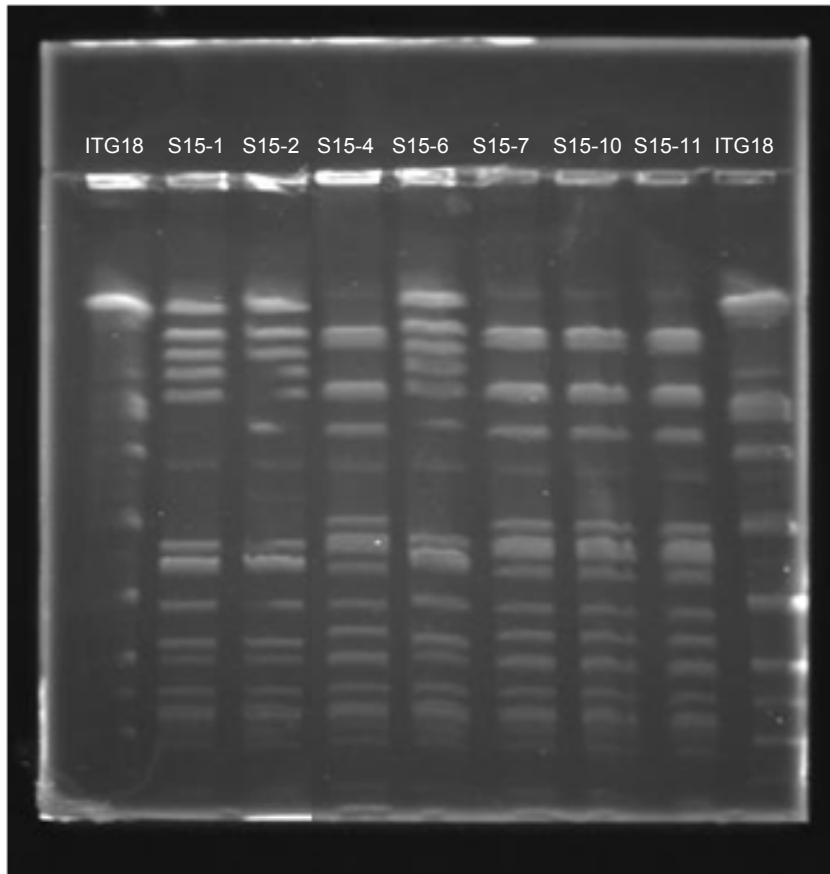
Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



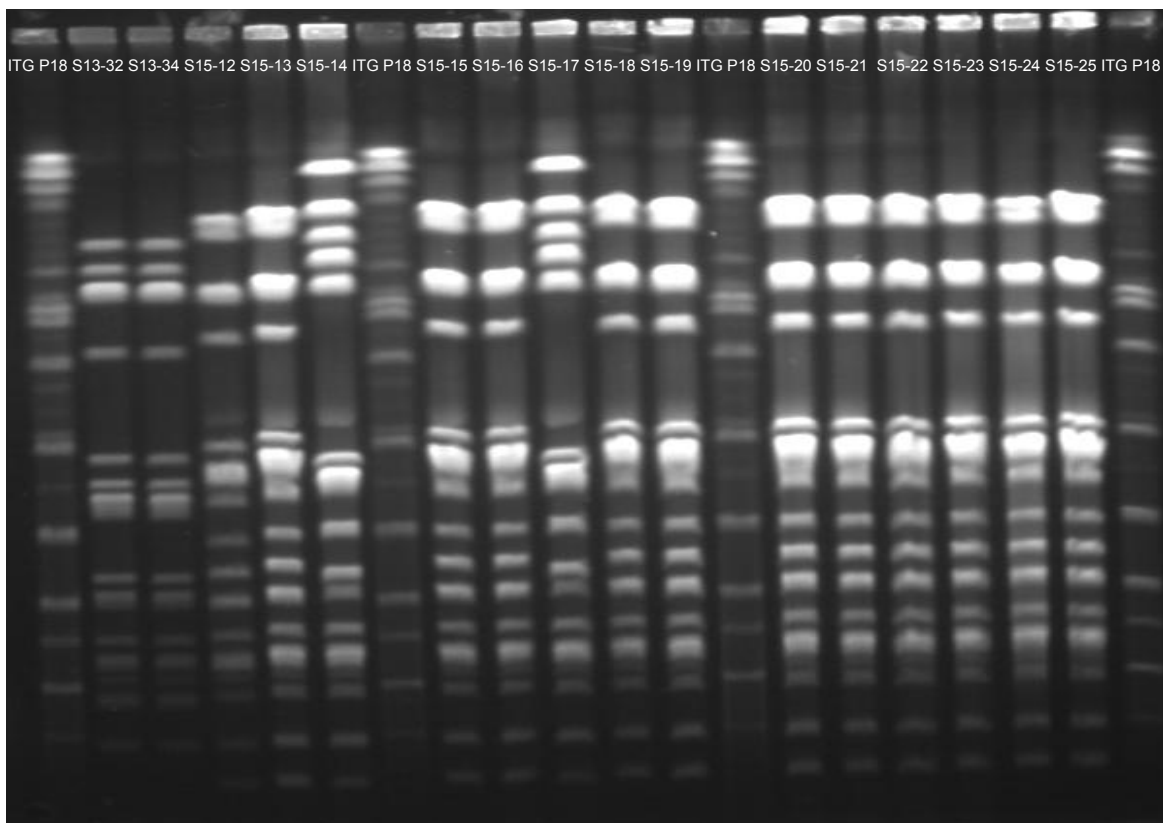
Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



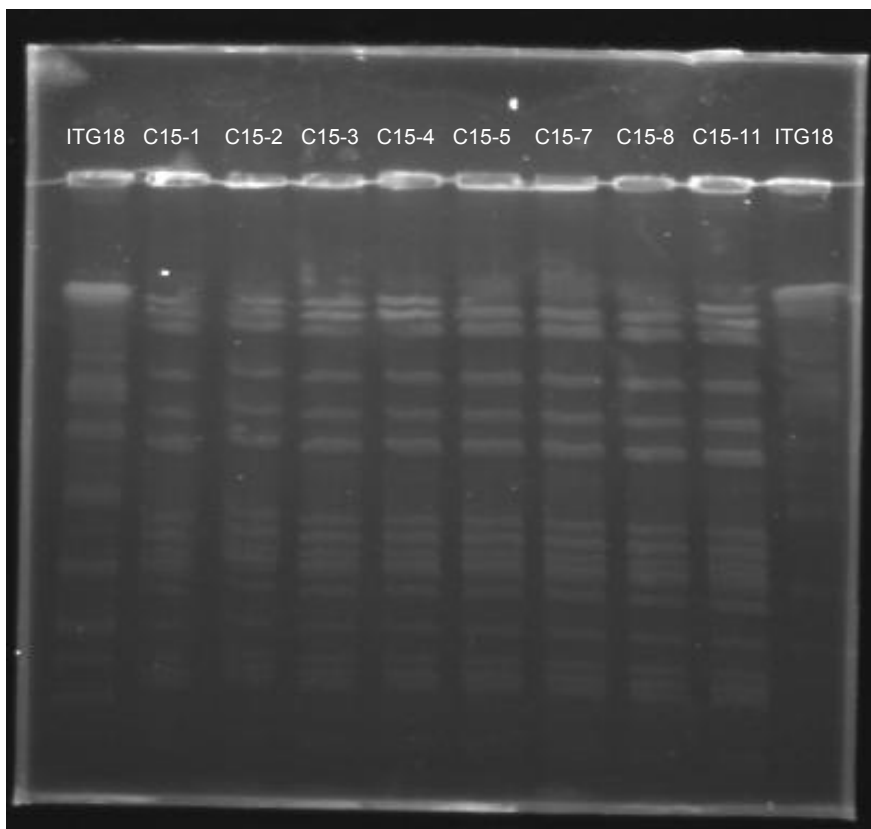
Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).



Queijo Canastra na época da chuva (prefixo C15- seguido do número de identificação) e na época da seca (prefixo C25-). Queijo do Serro na época da chuva nas propriedades S1 (prefixo S13-) e S2 (prefixo S15-). ITG18 (Marcador).

Anexo B: Ficha de recrutamento dos julgadores.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PROJETO: Caracterização Sensorial dos Queijos Artesanais Produzidos na Região da Serra da Canastra e no Serro

RECRUTAMENTO DE DEGUSTADORES

Nome:

E-

mail: _____

–

Faixa etária: () 16 – 20 () 21 – 30 () 31 – 40 () 41 – 50 () 51
– 60

Telefone para

contato: _____

Horário e dias da semana em que trabalha ou tem aula (marcar com um X):

| Horários | Segunda | Terça | Quarta | Quinta | Sexta |
|-----------|---------|-------|--------|--------|-------|
| 8 às 10h | | | | | |
| 10 às 12h | | | | | |
| 12 às 14h | | | | | |
| 14 às 16h | | | | | |
| 16 às 18h | | | | | |
| 18 às 19h | | | | | |

Indique o quanto você gosta de queijo:

() gosto () nem gosto/nem desgosto ()
desgosto

Existe algum alimento que você não pode comer ou beber? Qual?

Você faz algum tipo de dieta alimentar? Em caso positivo, explique, por favor.

Você está tomando alguma medicação que poderia influir em sua capacidade de perceber aromas e sabores? Em caso positivo, explique, por favor.

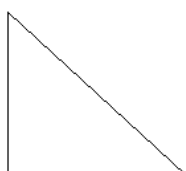
Indique se você possui:

| | Sim | Não |
|----------------------|------------|------------|
| Diabetes | () | () |
| Hipertensão | () | () |
| Hipoglicemia | () | () |
| Enxaqueca | () | () |
| Dentadura | () | () |
| Aparelho ortodôntico | () | () |
| Doença bucal | () | () |

Marque na linha à direita de cada figura, um trecho que indique a proporção da figura que foi coberta de preto. Por favor, não use régua ou outra ferramenta, utilize apenas sua capacidade visual para avaliar.



| _____ |



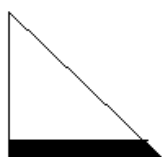
| _____ |



| _____ |



| _____ |



| _____ |

Muito Obrigada pelo seu interesse e apoio em participar deste projeto!

Juliana Nóbrega

Anexo C: Ficha para avaliação das amostras.

ADQ - Ficha de Avaliação

Nome: _____ Data: _____

Código da Amostra: _____

Por favor, prove a amostra e marque com um traço vertical nas escalas abaixo, a posição que identifique melhor a intensidade da característica avaliada.

Aparência

| | |
|--------------------------|------------------|
| Cor da casca | _____ |
| | branca amarela |
| Uniformidade da cor | _____ |
| | pouca muita |
| Rugosidade da superfície | _____ |
| | lisa rugosa |
| Cor da massa | _____ |
| | branca amarela |

Aroma

| | |
|-------------|---------------|
| Amanteigado | _____ |
| | fraco forte |
| Coalhada | _____ |
| | fraco forte |
| Curral | _____ |
| | fraco forte |
| Ranço | _____ |
| | fraco forte |

Textura

| | |
|--------------|---------------|
| Elasticidade | _____ |
| | fraco forte |
| Dureza | _____ |
| | fraco forte |
| Friabilidade | _____ |
| | fraco forte |
| Adesividade | _____ |
| | fraco forte |

Sabor

| | |
|---------------|---------------|
| Gosto salgado | _____ |
| | fraco forte |
| Gosto amargo | _____ |
| | fraco forte |
| Gosto ácido | _____ |
| | fraco forte |

Sensação picante

| |
|---------------|
| _____ |
| fraco forte |

Anexo D: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Serro com 18 dias de maturação

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Cor da casca | Queijo | 2 | 64,1369 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 11,8166 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 3,7912 | 0,0194 |
| | Resíduo | 19 | 1,4891 | |
| Uniformidade da cor | Queijo | 2 | 74,9310 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 1,8043 | 0,1806 |
| | Interação | 5 | 5,6106 | 0,0001 |
| | Resíduo | 19 | 1,1162 | |
| Rugosidade da casca | Queijo | 2 | 20,1420 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 4,1764 | 0,0083 |
| | Interação | 5 | 1,8819 | 0,1265 |
| | Resíduo | 19 | 1,1271 | |
| Cor da massa | Queijo | 2 | 12,1502 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 16,1422 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 1,5759 | 0,0002 |
| | Resíduo | 19 | 0,3221 | |
| Aroma amanteigado | Queijo | 2 | 5,8876 | 0,0110 |
| | Provador | 3 | 41,7192 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 1,2514 | 0,3966 |
| | Resíduo | 19 | 1,1500 | |
| Aroma de coalho | Queijo | 2 | 7,9401 | 0,0017 |
| | Provador | 3 | 38,3373 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 3,5835 | 0,0030 |
| | Resíduo | 19 | 1,0405 | |
| Aroma de curral | Queijo | 2 | 0,1901 | 0,4018 |
| | Provador | 3 | 4,9834 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 0,9309 | 0,0003 |
| | Resíduo | 19 | 0,2033 | |
| Aroma de ranço | Queijo | 2 | 0,7302 | 0,5617 |
| | Provador | 3 | 35,3975 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 0,7497 | 0,8017 |
| | Resíduo | 19 | 1,2458 | |

Anexo E: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Serro com 18 dias de maturação

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|------------------|-----------|------|---------|---------|
| Elasticidade | Queijo | 2 | 24,5492 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 52,5875 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 4,2797 | 0,0085 |
| | Resíduo | 19 | 1,4589 | |
| Dureza | Queijo | 2 | 23,3014 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 10,0804 | 0,0008 |
| | Interação | 5 | 4,1633 | 0,0359 |
| | Resíduo | 19 | 1,8415 | |
| Friabilidade | Queijo | 2 | 17,5494 | <0,0001 |
| | Provador | 3 | 54,2668 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 6,5198 | <0,0001 |
| | Resíduo | 19 | 0,3808 | |
| Adesividade | Queijo | 2 | 17,9892 | 0,0005 |
| | Provador | 3 | 38,8039 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 1,7859 | 0,5030 |
| | Resíduo | 19 | 1,8836 | |
| Gosto salgado | Queijo | 2 | 0,1724 | 0,9003 |
| | Provador | 3 | 6,3159 | 0,0067 |
| | Interação | 5 | 1,7132 | 0,4261 |
| | Resíduo | 19 | 1,6361 | |
| Gosto amargo | Queijo | 2 | 3,9619 | 0,0954 |
| | Provador | 3 | 52,5315 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 2,9884 | 0,0793 |
| | Resíduo | 19 | 1,5752 | |
| Gosto ácido | Queijo | 2 | 3,0690 | 0,1034 |
| | Provador | 3 | 17,7350 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 4,0001 | 0,0054 |
| | Resíduo | 19 | 1,2691 | |
| Sensação picante | Queijo | 2 | 0,3502 | 0,4369 |
| | Provador | 3 | 27,4550 | <0,0001 |
| | Interação | 5 | 1,7824 | 0,0005 |
| | Resíduo | 19 | 0,4132 | |

Anexo F: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Serro com 23 dias de maturação

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Cor da casca | Queijo | 2 | 11,3368 | 0,0022 |
| | Provador | 5 | 28,5233 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,7556 | 0,8732 |
| | Resíduo | 30 | 1,4975 | |
| Uniformidade da cor | Queijo | 2 | 8,7420 | 0,0245 |
| | Provador | 5 | 17,6221 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 8,3586 | 0,0015 |
| | Resíduo | 30 | 2,0775 | |
| Rugosidade da casca | Queijo | 2 | 70,7408 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 11,2471 | 0,0148 |
| | Interação | 10 | 3,2017 | 0,4884 |
| | Resíduo | 30 | 3,3003 | |
| Cor da massa | Queijo | 2 | 18,1862 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 43,3732 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,0360 | 0,2844 |
| | Resíduo | 30 | 0,8084 | |
| Aroma amanteigado | Queijo | 2 | 5,9331 | 0,0014 |
| | Provador | 5 | 21,2378 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 2,4637 | 0,0043 |
| | Resíduo | 30 | 0,7044 | |
| Aroma de coalho | Queijo | 2 | 6,1229 | 0,0001 |
| | Provador | 5 | 60,6758 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 2,0688 | 0,0012 |
| | Resíduo | 30 | 20,2678 | |
| Aroma de curral | Queijo | 2 | 0,1017 | 0,6365 |
| | Provador | 5 | 0,7356 | 0,0177 |
| | Interação | 10 | 0,2037 | 0,5297 |
| | Resíduo | 30 | 0,2215 | |
| Aroma de ranço | Queijo | 2 | 0,9364 | 0,0716 |
| | Provador | 5 | 23,5540 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,5521 | 0,1276 |
| | Resíduo | 30 | 0,3227 | |

Anexo G: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Serro com 23 dias de maturação

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Elasticidade | Queijo | 2 | 39,9242 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 30,2717 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 7,3055 | <0,0001 |
| | Resíduo | 30 | 0,6847 | |
| Dureza | Queijo | 2 | 124,4879 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 23,6172 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 3,9867 | 0,0015 |
| | Resíduo | 30 | 0,9872 | |
| Friabilidade | Queijo | 2 | 89,4446 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 30,2868 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 5,6972 | <0,0001 |
| | Resíduo | 30 | 22,5194 | |
| Adesividade | Queijo | 2 | 43,8087 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 39,9051 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 6,5414 | <0,0001 |
| | Resíduo | 30 | 0,3931 | |
| Gosto salgado | Queijo | 2 | 0,8231 | 0,4901 |
| | Provador | 5 | 13,3295 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,7218 | 0,1781 |
| | Resíduo | 30 | 1,1271 | |
| Gosto amargo | Queijo | 2 | 1,8860 | 0,0615 |
| | Provador | 5 | 77,6976 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 3,0490 | 0,0003 |
| | Resíduo | 30 | 0,6155 | |
| Gosto ácido | Queijo | 2 | 5,0850 | 0,0110 |
| | Provador | 5 | 37,8199 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 3,5039 | 0,0030 |
| | Resíduo | 30 | 0,9663 | |
| Sensação picante | Queijo | 2 | 0,7130 | 0,2657 |
| | Provador | 5 | 36,8290 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,4527 | 0,0135 |
| | Resíduo | 30 | 0,5146 | |

Anexo H: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Canastra com 23 dias de maturação

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Cor da casca | Queijo | 2 | 1,7853 | 0,1004 |
| | Provador | 5 | 5,0496 | 0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,1445 | 0,1551 |
| | Resíduo | 36 | 0,7283 | |
| Uniformidade da cor | Queijo | 2 | 53,7580 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 11,9260 | 0,0008 |
| | Interação | 10 | 2,1875 | 0,4708 |
| | Resíduo | 36 | 2,2132 | |
| Rugosidade da casca | Queijo | 2 | 53,8469 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 3,7344 | 0,1196 |
| | Interação | 10 | 4,0014 | 0,0589 |
| | Resíduo | 36 | 1,9714 | |
| Cor da massa | Queijo | 2 | 0,5191 | 0,3696 |
| | Provador | 5 | 21,7079 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,2545 | 0,8774 |
| | Resíduo | 36 | 0,5073 | |
| Aroma amanteigado | Queijo | 2 | 2,5033 | 0,0841 |
| | Provador | 5 | 3,2313 | 0,0125 |
| | Interação | 10 | 1,2776 | 0,2556 |
| | Resíduo | 36 | 1,9892 | |
| Aroma de coalho | Queijo | 2 | 0,6448 | 0,4641 |
| | Provador | 5 | 41,0656 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,9595 | 0,3438 |
| | Resíduo | 36 | 0,8220 | |
| Aroma de curral | Queijo | 2 | 3,1186 | 0,0900 |
| | Provador | 5 | 13,2181 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 2,7532 | 0,0353 |
| | Resíduo | 36 | 1,2083 | |
| Aroma de ranço | Queijo | 2 | 0,0990 | 0,8768 |
| | Provador | 5 | 35,7725 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,4749 | 0,7754 |
| | Resíduo | 36 | 0,7501 | |

Anexo I: Resumo da ANOVA dos atributos sensoriais dos queijos Canastra com 23 dias de maturação.

| ATRIBUTO | F.V. | G.L. | Q.M. | P-valor |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Elasticidade | Queijo | 2 | 5,1704 | 0,1051 |
| | Provador | 5 | 38,2911 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,4443 | 0,7437 |
| | Resíduo | 36 | 2,1540 | |
| Dureza | Queijo | 2 | 1,2791 | 0,2947 |
| | Provador | 5 | 9,1717 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,3626 | 0,9566 |
| | Resíduo | 36 | 1,0118 | |
| Friabilidade | Queijo | 2 | 2,6097 | 0,1693 |
| | Provador | 5 | 21,6943 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,5976 | 0,9229 |
| | Resíduo | 36 | 1,3960 | |
| Adesividade | Queijo | 2 | 0,6916 | 0,5148 |
| | Provador | 5 | 30,3664 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,6469 | 0,7756 |
| | Resíduo | 36 | 1,0221 | |
| Gosto salgado | Queijo | 2 | 15,2569 | <0,0001 |
| | Provador | 5 | 12,2627 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,7637 | 0,317 |
| | Resíduo | 36 | 0,7607 | |
| Gosto amargo | Queijo | 2 | 3,7280 | 0,0782 |
| | Provador | 5 | 41,3307 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 2,8504 | 0,0518 |
| | Resíduo | 36 | 1,3589 | |
| Gosto ácido | Queijo | 2 | 0,8954 | 0,2621 |
| | Provador | 5 | 43,4306 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 1,3671 | 0,0483 |
| | Resíduo | 36 | 0,6442 | |
| Sensação picante | Queijo | 2 | 1,0203 | 0,2284 |
| | Provador | 5 | 62,3705 | <0,0001 |
| | Interação | 10 | 0,8597 | 0,2691 |
| | Resíduo | 36 | 0,6629 | |