

ÉRIKA CARLA DA COSTA BRUMANO

**IMPACTO DO TIPO DE FERMENTO ENDÓGENO NA QUALIDADE E
TEMPO DE MATURAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO
EM PROPRIEDADES CADASTRADAS PELO IMA (INSTITUTO MINEIRO
DE AGROPECUÁRIA) NA REGIÃO DO SERRO-MG**

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
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B893i
2016
Brumano, Érika Carla da Costa, 1986-
Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e
tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em
propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de
Agropecuária) na região do Serro-MG / Erika Carla da Costa
Brumano. – Viçosa, MG, 2016.
xx, 136f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Queijo-de-minas. 2. Leveduras. 3. Queijo -
Microbiologia. 4. Queijo - Variedades. 5. Alimentos - Qualidade.
6. Segurança alimentar. 7. Serro (MG). I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa
de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
II. Título.

CDD 22 ed. 637.353

ÉRIKA CARLA DA COSTA BRUMANO

**IMPACTO DO TIPO DE FERMENTO ENDÓGENO NA QUALIDADE E TEMPO DE
MATURAÇÃO DE QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO EM PROPRIEDADES
CADASTRADAS PELO IMA (INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA) NA
REGIÃO DO SERRO - MG**

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: 07 de outubro de 2016.



Ana Cláudia dos Santos Pires
(Coorientadora)



Monique Renon Eller
(Coorientadora)



Cláudio Furtado Soares



Mauro Mansur Furtado



Célia Lúcia de Lucos Fortes Ferreira
(Orientadora)

*Para meu esposo Gabriel, que foi quem leu este primeiro,
Dedico*

A melhor coisa a fazer quando se está triste – respondeu Merlin, começando a fumar e soltar baforadas – é aprender alguma coisa. Essa é a única coisa que nunca falha. Você pode ficar velho e trêmulo em sua anatomia, pode passar a noite acordado escutando a desordem de suas veias, pode sentir saudades de seu único amor, pode ver o mundo ao seu redor ser devastado por lunáticos malvados ou saber que sua honra foi pisoteada no esgoto das mentes baixas. Só há uma coisa para isso: aprender. Aprender por que o mundo gira e o que o faz girar. Essa é a única coisa da qual a mente não pode jamais se cansar, nem se alienar, nem se torturar, nem temer ou descrer, e nunca sonhar em se arrepender. Aprender é o que lhe resta. Veja a quantidade de coisas que existem para aprender...

A espada na pedra

T.H. WHITE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos me guiando e me dando forças, e por tudo que Ele tem me proporcionado.

À minha mãe, meu pai e minha irmã que mesmo distante sempre foram presença viva nos momentos felizes e de dificuldades. Obrigada pelo amor incondicional e incentivo. Ao meu esposo Gabriel pelo amor, carinho, companhia, dedicação, paciência e compreensão nessa fase e em todas outras da minha vida. Amo vocês! Vocês são tudo na minha vida! À minha sogra, meu sogro, meu cunhado e minhas cunhadas que também fazem parte da minha família!

A Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A professora Célia pela vontade de realizar esse estudo, pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos.

Às professoras Ana Clarissa e Monique pela disponibilidade e paciência que sempre tiveram comigo e por me auxiliarem diretamente em tudo o que precisei e aos professores Mauro e Cláudio pela boa vontade e disponibilidade de participarem dessa banca.

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos, principalmente a Célio, Geralda, Polyana, Lorena, Carla, Marcos, Gustavo, Perereca, Piu, Dimas, que estavam sempre a postos.

Ao laboratório de Leite e Derivados que me recebeu de braços abertos para a realização de diversas análises e ao professor Antônio Fernandes por permitir isso.

A todos os amigos do Laboratório de Culturas Lácticas que já não estão mais em Viçosa: Tati, Carol, Joice, Lu, Michele, Naomi, Mônica, Juliana; e às últimas sobreviventes Driene e Viviane. Obrigada Vivi pela ajuda direta na realização das análises e Dri por me socorrer sempre que precisava. Obrigada meninas por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos.

Expresso meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização do presente estudo.

BIOGRAFIA

ÉRIKA CARLA DA COSTA BRUMANO, filha de José Maria Veríssimo da Costa e Aparecida da Silva Costa, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, em 11 de dezembro de 1986.

Em maio de 2006 iniciou o curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em julho de 2010. Em agosto deste mesmo ano iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2012.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xv |
| RESUMO..... | xvii |
| ABSTRACT | xix |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| CAPÍTULO 1..... | 3 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 1.1. A HISTÓRIA DOS QUEIJOS | 3 |
| 1.2. QUEIJO MINAS ARTESANAL..... | 6 |
| 1.2.1. QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO-MG | 8 |
| 1.2.2. TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL | 9 |
| 1.3. O PAPEL DA MICROBIOTA ENDÓGENA NA MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL | 14 |
| 1.4. ASPECTOS DE SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL..... | 15 |
| 1.4.1. O PAPEL DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO NA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL | 17 |
| 1.5. ASPECTOS LEGAIS NA PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |
| CAPÍTULO 2..... | 33 |
| METODOLOGIA UTILIZADA..... | 33 |
| 1. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS..... | 33 |
| 2. AMOSTRAGEM E CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO | 34 |
| 3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS..... | 35 |
| 3.1. Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos | 36 |
| 3.2. Enumeração de fungos filamentosos e não filamentosos..... | 36 |
| 3.3. Enumeração de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| 3.4. Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| 3.5. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> | 37 |
| 3.6. Detecção de <i>Salmonella</i> sp..... | 37 |
| 3.7. Isolamento de bactérias lácticas | 37 |
| 3.8. Análise das características fenotípicas dos isolados | 38 |
| 3.8.1. Capacidade de acidificação..... | 38 |
| 3.8.2. Produção de diacetil | 38 |
| 3.8.3. Formação de exopolissacarídeos | 38 |

| | | |
|---|---|----|
| 3.8.4. | Resistência a diferentes concentrações de NaCl..... | 39 |
| 3.8.5. | Atividade antimicrobiana..... | 39 |
| 4. | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 39 |
| 4.1. | Determinação da acidez titulável, gordura, umidade, extrato seco total e cloretos | 40 |
| 4.2. | Determinação do pH | 40 |
| 4.3. | Determinação de gordura no extrato seco | 40 |
| 4.4. | Determinação da atividade de água (Aw)..... | 40 |
| 4.5. | Determinação de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12 % | 41 |
| 4.6. | Determinação de proteína total, extensão de maturação e profundidade de maturação | 41 |
| 5. | ANÁLISES FÍSICAS..... | 41 |
| 5.1. | Altura e diâmetro..... | 41 |
| 5.2. | Análise colorimétrica | 41 |
| 6. | ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA..... | 42 |
| 7. | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 43 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |
| CAPÍTULO 3..... | | 46 |
| CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO PREDOMINANTES NO QUEIJO MINAS ARTESANAL FABRICADO COM PINGO E RALA..... | | 46 |
| 1. | INTRODUÇÃO | 47 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 2.1. | Isolamento de bactérias lácticas | 48 |
| 2.2. | Análise das características fenotípicas dos isolados | 49 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 3.1. | Caracterização geral dos isolados | 49 |
| 3.2. | Capacidade de acidificação | 50 |
| 3.3. | Produção de exopolissacarídeos | 54 |
| 3.4. | Produção de diacetil | 56 |
| 3.5. | Tolerância ao NaCl..... | 59 |
| 3.6. | Atividade antimicrobiana..... | 59 |
| 4. | CONCLUSÃO | 63 |
| 5. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |
| CAPÍTULO 4..... | | 72 |
| CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, FÍSICOS, PROTEÓLISE E TEXTURA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL FABRICADO COM PINGO E RALA AO LONGO DA MATURAÇÃO | | 72 |
| Resumo | | 72 |
| 1. | INTRODUÇÃO | 73 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 74 |
| 2.1. | Amostragem e condições de maturação dos queijos..... | 74 |

| | | |
|---|---|-----|
| 2.2. | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 74 |
| 2.3. | ANÁLISES FÍSICAS | 75 |
| 2.3.1. | Altura e diâmetro | 75 |
| 2.3.2. | Análise colorimétrica | 75 |
| 2.4. | ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) | 75 |
| 2.5. | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 75 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 76 |
| 3.1. | Características físico-químicas dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” | 76 |
| 3.2. | Extensão e profundidade de maturação | 83 |
| 3.3. | Análise do perfil de textura (TPA) dos queijos Minas artesanal fabricados “pingo” e “rala” | 85 |
| 3.4. | Características físicas dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” | 87 |
| 3.4.1. | Altura e diâmetro | 88 |
| 3.4.2. | Avaliação da cor do queijo Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” | 90 |
| 4. | CONCLUSÃO | 95 |
| 5. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |
| CAPÍTULO 5..... | | 101 |
| IMPACTO DO TIPO DE FERMENTO ENDÓGENO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO - MG..... | | 101 |
| RESUMO..... | | 101 |
| 1. | INTRODUÇÃO | 101 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 103 |
| 2.1. | Amostragem e condição de maturação dos queijos..... | 103 |
| 2.2. | Análises microbiológicas | 104 |
| 2.3. | Análises estatísticas | 104 |
| 3. | RESULTADOS | 104 |
| 4. | DISCUSSÃO | 110 |
| 5. | CONCLUSÃO | 117 |
| 6. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 118 |
| CONCLUSÕES GERAIS | | 124 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR I – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | | 126 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR II – Características fenotípicas dos isolados (MRS) de queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” | | 128 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR III – Características fenotípicas dos isolados (MRS) de queijo Minas artesanal fabricado com “rala”..... | | 130 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR IV – Características fenotípicas dos isolados (M17) de queijo Minas artesanal fabricado com “pingo”..... | | 132 |
| MATERIAL COMPLEMENTAR V – Características fenotípicas dos isolados (M17) de queijo Minas artesanal fabricado com “rala”..... | | 134 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa da produção de queijos artesanais no Brasil.

Figura 2. Regiões produtoras de queijo artesanal no Estado de Minas Gerais.

Figura 3. Fluxograma de fabricação do queijo Minas artesanal.

Figura 4. Coleta do pingo realizada no final da dessoragem.

Figura 5. Alterações exigidas pela legislação.

CAPÍTULO 2

Figura 1. Processo de fabricação do queijo Minas artesanal.

CAPÍTULO 3

Figura 1. Produção de exopolissacarídeo pelos isolados obtidos dos queijos Minas artesanal do Serro-MG.

Figura 2. Presença e ausência de produção de diacetil pelos isolados dos queijos Minas artesanal do Serro-MG.

Figura 3. Formação de halo no teste de antagonismo frente aos patógenos analisados.

CAPÍTULO 4

Figura 1. Atividade de água (a_w) dos queijos Minas artesanal ao longo de 60 dias de maturação.

- Figura 2. Umidade (%) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 3. Conteúdo de gordura (%) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 4. Teor de cloretos (%) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 5. Conteúdo de proteína (%) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 6. Mastigabilidade (N) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 7. Elasticidade (mm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 8. Coesividade (N) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 9. Altura (cm) e diâmetro (cm) do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 10. Altura (cm) e diâmetro (cm) do queijo Minas artesanal fabricado com “rala” ao longo de 60 dias de maturação.
- Figura 11. Altura (cm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com 15 dias de maturação.
- Figura 12. Diâmetro (cm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com 15 dias de maturação.
- Figura 13. Coordenadas L^* e b^* da casca dos queijos Minas Artesanal fabricado com “pingo” e “rala”.

Figura 14. Queijo Minas artesanal (QMA) fabricado com “pingo” (I) e “rala” (II) com 8 dias de maturação.

Figura 15. Queijo Minas artesanal (QMA) fabricado com “pingo” (I) e “rala” (II) com 15 dias de maturação.

Figura 16. Coordenadas L^* e b^* da massa dos queijos Minas Artesanal fabricado com “pingo” e “rala”.

CAPÍTULO 5

Figura 1. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de mesófilos aeróbios nos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Figura 2. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de fungos filamentosos e não filamentosos nos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Figura 3. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de *Staphylococcus aureus* nos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Figura 4. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de coliformes totais nos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Figura 5. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de *Escherichia coli* nos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Figura 6. Estimativa do período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” para adequação às exigências microbiológicas estabelecidas pela legislação.

Figura 7. Estimativa do período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal fabricado com “rala” para adequação às exigências microbiológicas estabelecidas pela legislação.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Principais regulamentações sobre os queijos artesanais.

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Análises microbiológicas realizadas em amostras de água, leite, fermento e queijo.

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Número de isolados obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 29 dias de maturação.

Tabela 2. Número de isolados (M17 e MRS) obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” classificados com alta capacidade de acidificação (classe I), média capacidade de acidificação (classe II) e baixa capacidade de acidificação (classe III) ao longo de 29 dias de maturação.

Tabela 3. Relação dos isolados obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” com resultado positivo para a produção de exopolissacarídeo (EPS).

Tabela 4. Relação do número de isolados (MRS e M17) obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com resultado positivo para produção de diacetil ao longo de 29 dias de maturação.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana observada a partir dos isolados de queijo Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” obtidos a partir do meio MRS sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana observada a partir dos isolados de queijo

Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” obtidos a partir do meio M17 sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*.

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Média da acidez titulável (% ácido láctico) e pH das amostras de queijo Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Tabela 2. Classificação dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” conforme conteúdo de umidade.

Tabela 3. Evolução da proteólise do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” e “rala” ao longo de 29 dias de maturação.

Tabela 4. Índice de saturação *C (%) e Ângulo de tonalidade H° (graus) dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” ao longo do período de 60 dias de maturação.

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Média das contagens (log UFC.mL⁻¹) de *Staphylococcus aureus* (SA), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) dos leites utilizados na fabricação dos queijos Minas artesanal (QMA).

Tabela 2. Média das contagens de *Staphylococcus aureus* (SA), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) dos fermentos “pingo” e “rala” utilizados na fabricação dos queijos Minas artesanal.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AT** – Acidez titulável
- a_w** – Atividade de água
- a*** – cromaticidade verde (-) e vermelho (+)
- BAL** – Bactérias do ácido lático
- BHI** – Brain Heart Infusion
- BPA** – Boas práticas agropecuárias
- BPF** – Boas práticas de fabricação
- b*** – cromaticidade azul (-) e amarelo (+)
- cm** – centímetros
- CT** – Coliformes totais
- C*** – Índice de saturação
- EC** – *Escherichia coli*
- EM** – Extensão de maturação
- EMATER**– Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
- EPS** – Exopolissacarídeo
- ES** – Extrato seco
- FE** – Fermento endógeno
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- G** - gordura
- g** – grama
- GES** – Gordura no extrato seco
- h** – hora
- H °** – Ângulo de tonalidade
- IG** – Identificação Geográfica
- IMA** – Instituto Mineiro de Agropecuária
- INPI** – Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
- IPHAN** – Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
- kg** – quilograma
- L*** – luminosidade
- LDR** – Leite desnatado reconstituído
- log** – Logaritmo
- MAPA** – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MG – Minas Gerais
min – minuto
mL – mililitro
mm – milímetro
N – Newton
nm – nanômetro
NS – Nitrogênio solúvel
NSLAB – Non Starter Lactic Acid Bacteria
NT – Nitrogênio total
DO – Densidade ótica
PCA – Plate Count Agar
PDA – Potato Dextrose Agar
pH – potencial Hidrogeniônico
PM – Profundidade de maturação
PT – Proteína total
QA – Queijo artesanal
QMA – Queijo Minas artesanal
s – segundo
SA – *Staphylococcus aureus*
SIF – Sistema de Inspeção Federal
TCA – ácido tricloroacético
TPA – Análise do perfil de textura
UFC – Unidades formadoras de colônia
UR – Umidade relativa
USDA - United States Department of Agriculture
µL – microlitro

RESUMO

BRUMANO, Érika Carla da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2016. **Impacto do tipo de fermento endógeno na qualidade e tempo de maturação de queijo Minas artesanal produzido em propriedades cadastradas pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) na região do Serro – MG.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadoras: Ana Clarissa dos Santos Pires e Monique Renon Eller.

Este estudo avaliou a influência do tipo de fermento endógeno utilizado na fabricação de queijo Minas artesanal (QMA) produzido na região do Serro-MG sobre as características microbiológicas, físico-químicas, físicas, de textura e a proteólise ao longo de 60 dias maturação. Foram analisados queijos oriundos de 12 unidades produtoras, das quais 4 utilizaram o “pingo” e 8 a “rala como fermento em sua fabricação. As análises foram realizadas nos períodos 2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação totalizando 84 amostras. Além disso, a fim de verificar diferença nas características de bactérias do ácido láctico predominantes nos queijos fabricados com diferentes tipos de fermentos, 200 isolados foram analisados, onde 100 foram obtidos de um queijo fabricado com o fermento tipo “pingo” e 100 a partir de um queijo fabricado com o fermento tipo “rala”. Os isolados foram coletados nos períodos de maturação de 2, 8, 15, 22 e 29 dias, onde foram submetidos a testes morfológicos e fenotípicos. De acordo com a morfologia celular dois grupos foram obtidos: cocos (56,50 %) e bacilos (43,50 %). Os isolados obtidos a partir do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram maior capacidade de acidificação quando comparados com aqueles obtidos do queijo fabricado com a “rala”. Somente 6 isolados (oriundos dos queijos fabricados com o “pingo”), produziram exopolissacarídeo e todos eles, independente do tipo de fermento utilizado, foram capazes de multiplicar nas concentrações de NaCl testadas (2,0 e 6,0 %, m/m). Com relação à produção de diacetil, 66 % dos isolados obtidos do queijo fabricado com a “rala” produziram esse composto, enquanto somente 25 % dos isolados do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram essa capacidade. De maneira geral, um maior número de isolados obtidos a partir do queijo fabricado com “pingo” apresentaram antagonismo contra os micro-organismos patogênicos testados: *Listeria monocytogenes* (82 %), *Staphylococcus aureus* (73 %), *Escherichia coli* (66 %) e *Salmonella enteritidis* (36 %). Com relação às análises físico-químicas, não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) para as

variáveis pH, atividade de água (a_w) e cloretos entre os queijos produzidos com os diferentes fermentos em cada período de maturação. As principais diferenças observadas foram com relação à acidez, umidade, textura, cor e índice de maturação. A acidez e a umidade dos queijos apresentou diferença ($p < 0,05$) com 2 e 8 dias de maturação, sendo essas maiores naqueles fabricados com o fermento tradicional (“pingo”). Foram verificados maiores índices de proteólise ($p < 0,05$) nos queijos fabricados com “pingo” comparado aos fabricados com a “rala” durante toda a maturação. Em relação à textura, a principal diferença entre os queijos foi com relação aos parâmetros de mastigabilidade e elasticidade (com valores maiores nos queijos fabricados com a “rala”). A cor da casca e da massa dos queijos apresentou diferença ($p < 0,05$) em praticamente todas as coordenadas avaliadas, com destaque para as coordenadas *L e b*. A maturação dos queijos mostrou-se imprescindível para redução dos patógenos presentes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes), entretanto, nos queijos produzidos com o fermento tradicional (“pingo”) atingiram-se as contagens exigidas pela legislação com 17 dias de maturação, ao contrário dos produzidos com a “rala”, que atingiram essa condição somente após 27 dias. *Listeria monocytogenes* foi detectada após 2 dias de fabricação em 11 dos 12 queijos analisados, não estando presente no restante da maturação, enquanto *Salmonella* sp. não ocorreu em nenhuma das amostras analisadas. A utilização da “rala” como fermento comprometeu a qualidade microbiológica dos queijos, sugerindo-se a alteração no período mínimo de maturação dos QMA da região do Serro-MG que originalmente é de 17 dias, ou um desmembramento da legislação para os queijos fabricados com “pingo” e “rala”. A utilização de fermentos distintos modifica a dinâmica da microbiota dos queijos, acarretando dessa forma em produtos com características diferentes, causando uma descaracterização quando não se utiliza o fermento tradicional.

ABSTRACT

BRUMANO, Érika Carla da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2016. **Impact of the type of endogenous culture on the quality and maturation time of artisanal Minas cheese produced on properties registered by IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) in the region of Serro - MG.** Advisor: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-advisors: Ana Clarissa dos Santos Pires and Monique Renon Eller.

This study evaluated the influence of the type of endogenous culture used in artisanal Minas cheese manufacturing (AMC) produced in Serro-MG region on the microbiological and physico-chemical over 60 days maturity. Cheeses were analyzed in 12 production units, in which 4 used the "pingo" and 8 "rala" as culture. The analyzes were performed on periods 2, 8, 15, 22, 29, 36 and 60 days of maturation totaling 84 samples. In order to verify differences in the characteristics of lactic acid bacteria prevalent in cheese, 200 isolates were analyzed, in which 100 were obtained from a cheese made with culture type "pingo" and 100 from a cheese manufactured with culture type "rala". Isolates were collected in 2, 8, 15, 22 and 29 days of maturation and were submitted to morphological and phenotypic testing and were obtained isolated form of coccus (56,50 %) and bacillus (43,50 %). The isolates from the cheese made with "pingo" showed higher acidifying capacity compared to those obtained from cheese made with the "rala". Only 6 isolates (originating from cheeses made with the "pingo"), produced exopolysaccharide and all of them, regardless of the type of culture used, were able to grow in the tested concentrations of NaCl (2,0 and 6,0%). It was seen that 66 % of the isolates obtained from cheese made with "rala" produced diacetyl, while only 25 % of the isolates from cheese made with "pingo" had this ability. In general, a greater number of isolates obtained from the pingo cheese presented antagonism against the pathogenic microorganisms tested: *Listeria monocytogenes* (82%), *Staphylococcus aureus* (73%), *Escherichia coli* (66%) and *Salmonella enteritidis* (36%). Regarding the physical and chemical analysis, no difference was observed ($p \geq 0,05$) for pH, water activity (a_w) and chlorides between cheeses made with different cultures in each maturity period. The major differences were observed with respect to acidity, humidity, texture, color and maturation index. The acidity and humidity of cheeses presented difference ($p < 0,05$) with 2 and 8 days of maturation, these larger those made with traditional culture ("pingo"). They checked the

highest rates of proteolysis ($p < 0,05$) in cheeses manufactured with “pingo” compared with those manufactured “rala” throughout maturation. Regarding the texture, the main difference between the cheeses was compared with the chewiness and elasticity parameters (with higher values in cheeses manufactured with “rala”). The skin color and weight of the cheese presented difference ($p < 0,05$) in almost all the evaluated coordinates, highlighting the coordinates L^* and b^* . The cheese maturation proved essential to reduce the present pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and coliforms), however, in cheeses from the traditional culture (“pingo”) hit up the scores required by law at 17 days of maturation unlike produced with the “rala”, which reached this condition only after 27 days. The use of “rala” as culture commits the microbiological quality of cheeses, thus it is suggested to change the minimum maturation period of the QMA of Serro-MG region or break legislation for cheeses made with “pingo” and “rala”. The use of different culture modifies the dynamics of microflora of cheese and produces products with different characteristics, which rules out the product that uses the traditional culture.

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Minas artesanal (QMA) é um produto altamente apreciado, produzido em pequenas propriedades rurais, em contexto da agricultura familiar, e sua fabricação envolve o uso de técnicas tradicionais (DORES e FERREIRA, 2012). Além de possuir importância social, econômica e cultural, esses queijos apresentam características sensoriais peculiares em função de um ecossistema microbiano complexo proveniente do leite cru, do fermento endógeno conhecido como “pingo” e ainda do ambiente, região, condições de manejo e maturação, que em conjunto contribuem para sua qualidade final (MENEZES, 2011; MONTEL et al., 2014).

Atualmente em Minas Gerais são reconhecidas seis principais microrregiões produtoras de QMA: Serro, Serra da Canastra, Araxá, Cerrado, Campos das Vertentes e Triângulo Mineiro, cada qual com o seu modo de produção específico (EMATER, 2015).

Por serem fabricados com leite cru, a segurança microbiológica desses produtos pode ser alcançada a partir da combinação de alguns fatores como a aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e a maturação a que são submetidos. Além disso, as bactérias do ácido láctico (BAL) presentes no “pingo” e leite cru são as principais responsáveis pela segurança microbiológica do produto após maturação (GONZÁLEZ et al., 2007; MARTINS et al., 2014).

A maturação do QMA contribui para sua segurança microbiológica principalmente devido à formação de compostos antimicrobianos pelas BAL como ácidos orgânicos (JAY, 2005), bacteriocinas (COELHO et al., 2014; NESPOLO e BRANDELLI, 2010), diacetil (JAY, 1982; PIARD e DESMAZEAUD, 1991) dentre outros, que torna a matriz inapropriada ao desenvolvimento e a sobrevivência de patógenos. A legislação vigente estabelece que os queijos produzidos na região do Serro sejam maturados por 17 dias (IMA, 2013; MARTINS et al., 2014), em temperatura ambiente, sendo este período suficiente para a segurança do produto e, ao mesmo tempo para a preservação do sabor, da textura e da cor característicos.

Para permitir a comercialização desses queijos de forma legal com 17 dias de maturação, a legislação brasileira exige o cadastramento das

unidades produtoras ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e a implementação das BPF e BPA. Ao se cadastrar, o produtor passa a ser certificado e deve produzir seus queijos de acordo com as exigências da legislação vigente, de forma a garantir a permanência das características tradicionais e os padrões higiênicos sanitários necessários para produção de um produto seguro.

Dentro das exigências solicitadas, incluem-se desde o ano de 2002, a modificação da natureza dos equipamentos tradicionais utilizados na sua produção, originalmente em madeira e agora substituídos por materiais de mais fácil higienização como fibras de vidro, polipropileno e aço inox (IMA, 2002).

Segundo os produtores, essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem, resultando um produto com textura muito macia. Dessa forma, na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, alguns produtores passaram a utilizar o próprio queijo na forma de “rala” como fermento, substituindo o “pingo”. A “rala” consiste em um queijo maturado, produzido em um lote anterior, ralado. Sua utilização resulta em um produto com dessoramento adequado e textura mais firme, atendendo às exigências da cooperativa local, que não aceita um produto com textura “macia” para comercialização.

Embora a implementação da “rala” tenha resolvido o problema tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização de um fermento não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar a alterações em suas características sensoriais, físicas, físico-químicas, de textura e principalmente microbiológicas.

Dessa forma, esse estudo teve como principal objetivo determinar as principais alterações envolvidas na modificação do fermento tradicional por meio da comparação na qualidade físico-química, física, de textura e microbiológica de QMA fabricados com “pingo” e “rala” na região do Serro-MG.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. A HISTÓRIA DOS QUEIJOS

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) entende-se por queijo “o produto fresco ou maturado, obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial, ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas, bactérias específicas, ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade aceitável para o uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes” (BRASIL, 1996).

Não se sabe ao certo quando e onde se iniciou a produção de queijos, mas acredita-se que os primeiros produtos foram fabricados nos férteis vales dos rios Tigres e Eufrates há cerca de 8.000 anos. Provavelmente o queijo tenha surgido acidentalmente ao se armazenar o leite em recipientes feitos de estômagos de ruminantes. A fabricação do queijo era feita de forma artesanal, e hoje a produção está dividida entre uma produção industrial e produções artesanais que mantêm um sistema tradicional (ORDONÉZ, 2005).

No Brasil a técnica artesanal para a produção de queijos surgiu no século XVIII, sendo seu processo de fabricação similar ao utilizado na Serra da Estrela, em Portugal, no qual o queijo era produzido utilizando leite de ovelha como matéria prima e extrato de flores de cardo como coalho. Na segunda metade deste mesmo século, nas serras de Minas Gerais, esses hábitos foram readaptados coalhando o leite de vaca cru em recipientes feitos a partir de estômago de ruminantes, bezerros ou outros mamíferos, dando origem assim à variedade “Queijo Minas” (SANTOS et al., 2012).

Atualmente mais de 1000 variedades de queijos são produzidos no mundo, com uma produção que excede 19 milhões de toneladas por ano. A União Europeia é a maior produtora e consumidora mundial de queijos, sendo que em 2015, produziu cerca de 9 milhões de toneladas, o que

corresponde a cerca de um terço de todo o leite produzido (USDA, 2015). Do total produzido no mundo, aproximadamente 700.000 toneladas de produto artesanal são produzidos anualmente. Em virtude da produção em grande escala e das vastas áreas de produção, os queijos artesanais possuem grande importância social e econômica em vários países (LIMA FILHO e POMBO, 2010).

Na última década a produção de queijos no Brasil cresceu a uma taxa de 5 % ao ano, o que culminou na produção de aproximadamente 751 mil toneladas em 2015 (USDA, 2015). No entanto, as estatísticas sobre a produção e o consumo de queijos artesanais (QA) brasileiros e no mundo ainda são escassas, mas, estima-se que o segmento de queijos artesanais no País represente 40 % do volume total de queijos produzidos (LIMA FILHO e POMBO, 2010).

A produção de QA no Brasil, apesar de ser uma atividade pouco documentada devido ao seu caráter informal, acabou se difundindo por todo o território nacional, gerando produtos variados, podendo-se destacar pelo menos um tipo de QA em cada região geográfica do País (FIGURA 1) (NOBREGA, 2012).

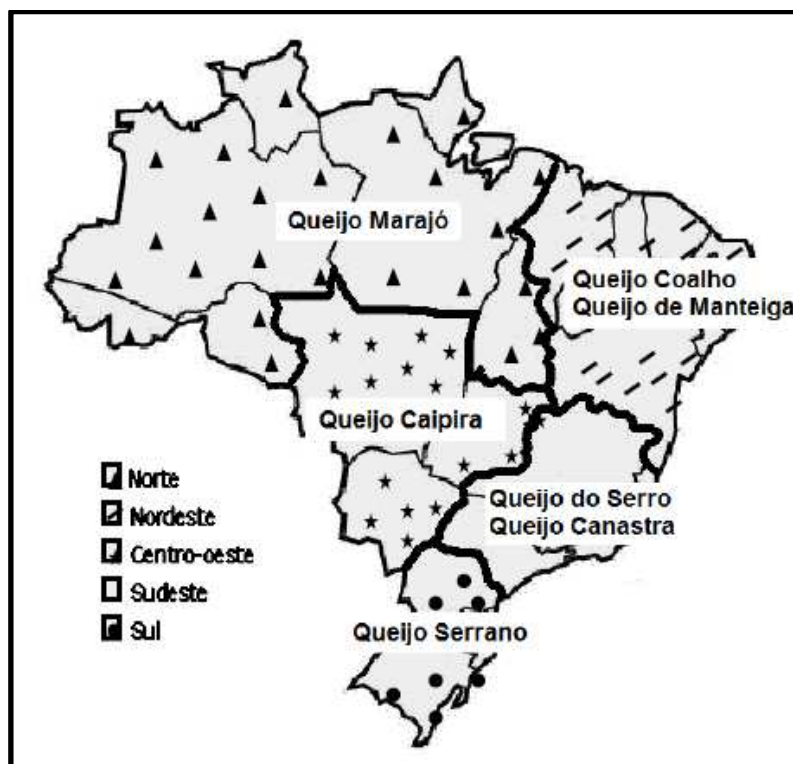


Figura 1. Mapa da produção de queijos artesanais no Brasil.

O Queijo Coalho é um produto tipicamente nordestino produzido em todos os estados do Nordeste. No entanto, algumas regiões têm 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).

A origem do Queijo de manteiga ainda não está bem documentada, mas acredita-se que algumas influências tais como a portuguesa e espanhola trouxeram para o Brasil (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 às adversidades ambientais, sobretudo à altas temperaturas típicas da região (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 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 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). Conhecido também como queijo Marajoara ou requeijão Marajoara, esse produto apresenta duas variedades principais: o tipo creme, quando o cozimento da massa é feito adicionando-se o creme obtido do desnatado; e o queijo tipo manteiga, quando em seu cozimento é adicionado à manteiga propriamente dita (LOURENÇO et al., 2002).

Acredita-se que a história do Queijo Serrano iniciou-se no século XVIII no Rio Grande do Sul, onde o mesmo era utilizado como moeda de troca pelos tropeiros (CRUZ et al., 2011; VITROLLES 2011). Produzido em uma região conhecida como Campos de Altitude no sul do Brasil, 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 (MENEZES, 2009; VITROLLES, 2011).

O Queijo Caipira é produzido no estado do Mato Grosso do Sul, onde a exploração pecuária esteve sempre voltada à produção de carne e a baixa produtividade de leite era aproveitada para a produção desse queijo artesanal (MENEZES, 2009). Na literatura poucas são as informações a respeito da sua produção e características, porém o fato de possuir legislação própria desde 2004 sugere se tratar de um produto já bem estabelecido na tradição e costumes locais.

1.2. QUEIJO MINAS ARTESANAL

Segundo a Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, é considerado QMA o queijo confeccionado a partir do leite integral de vaca, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem, conforme a tradição histórica e cultural da área onde for produzido. O produto final deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, com ou sem olhaduras mecânicas e isento de corantes e conservantes (MINAS GERAIS, 2002).

O QMA é considerado um dos mais antigos queijos produzidos no Brasil, além de ser um produto tradicional responsável pela geração de renda de um grande número de pequenos produtores rurais.

O Estado de Minas Gerais possui seis principais e tradicionais regiões produtoras de QMA: Serro, Canastra, Cerrado, Araxá, Campos das Vertentes e Triângulo Mineiro, que se estendem por 72 municípios (FIGURA 2). Essas regiões são reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) (DORES e FERREIRA, 2012; IMA, 2015).

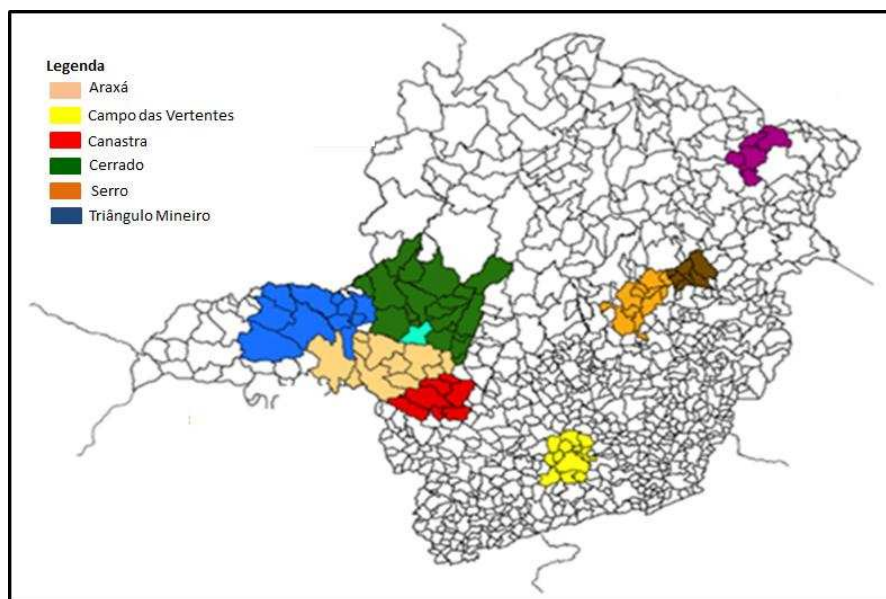


Figura 2. Regiões produtoras de queijo artesanal no Estado de Minas Gerais.

Inicialmente foram identificadas como produtoras de QMA quatro regiões no Estado de Minas Gerais sendo elas Araxá, Serro, Cerrado e Canastra. A região do Campo das Vertentes foi identificada oficialmente como produtora de QMA em 2009 (IMA, 2009), e mais recentemente em 2013, foi identificada a região do Triângulo Mineiro (IMA, 2013a), entretanto, as informações sobre a produção dessas duas regiões ainda são escassas.

De acordo com a EMATER, as seis regiões produtoras de QMA compreendem 9.789 produtores, que são responsáveis por uma produção de 29.897 toneladas de queijo por ano. A EMATER orienta os produtores sobre adequações das queijarias, currais e anexos, obtenção higiênica do leite, tratamento de água, controle sanitário do rebanho, BPA, BPF e exigências da legislação vigente. A Empresa também exerce um papel importante na mobilização e organização dos produtores (EMATER, 2015).

Os QMA são produzidos há mais de 200 anos em diversas cidades do Estado de Minas Gerais e apresentam um grande valor econômico e cultural para o Estado. Dessa forma, em 15 de maio de 2008, o Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) tombou como Patrimônio Cultural Imaterial o “modo artesanal de fazer queijo Minas”.

Nesta mesma linha de reconhecimento e valorização, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) concedeu a 11 municípios da

região do Serro (13/12/2011) e a 7 municípios da região da Canastra (13/03/2012) o título de indicação geográfica (IG), reconhecendo assim esses municípios como referência na fabricação do queijo Artesanal tipo Serro e tipo Canastra respectivamente.

A IG é a tradução de quando uma determinada região é reconhecida devido à produção de algum produto, sendo o título um reconhecimento de sua diferenciação dentre os outros produtos. A IG também delimita a área de produção, restringindo seu uso aos produtores da região, em geral uma associação e/ ou cooperativa (HARBUTT, 2010).

O reconhecimento dessas microrregiões com o selo de IG fortalece o reconhecimento do QMA como uma iguaria nacional, além de fortalecer a produção dos pequenos produtores, objetivando a produção de um produto de melhor qualidade (HARBUTT, 2010).

1.2.1. QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO-MG

A cidade do Serro-MG, está localizada em uma região montanhosa na vertente oriental da Serra do Espinhaço entre os paralelos 18° e 19° de latitude Sul, na região do Alto do Jequitinhonha no Estado de Minas Gerais, onde irradiou a produção de queijo que leva o seu nome para as regiões vizinhas. (EMATER, 2002).

A região reúne condições geomorfológicas, edáficas e microclimáticas que propiciaram o surgimento de pastagens naturais, onde predominam o capim gordura (meloso) e capins típicos de campos de altitude (MENESES, 2006).

Fazem parte da região do Serro os municípios de Serro, Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas e Coluna (EMATER, 2002).

O início da fabricação do queijo típico da região do Serro-MG remonta ao período colonial, quando os mineiros começaram a colocar em prática uma herança portuguesa. Na época do garimpo (Século XVIII), garimpeiros vindos de Portugal em busca do ouro passaram a fabricar o queijo com o mesmo processamento do queijo da Serra da Estrela, feito a partir de leite

de ovelha, sendo que em Minas Gerais passou a ser produzido com leite de vaca para consumo próprio. Em razão da dificuldade de acesso, os produtores tinham que conservar o fermento, estabelecendo-se assim a prática da utilização do “pingo” (MUNDO DO LEITE, 2003).

O processo de fabricação do QMA do Serro é artesanal e segue normas regulamentadas que abrangem a produção de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização de técnicas industriais (MINAS GERAIS, 2002).

Cada produtor segue o caderno de normas disponível na Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, Serro-MG, com todas as recomendações referentes ao modo de se fazer o queijo artesanal, uma forma de tornar o produto uniforme.

1.2.2. TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

Os QA produzidos em Minas Gerais, de modo geral, possuem formato cilíndrico, pesam de 1 a 1,2 kg, apresentam de 15 a 16 cm de diâmetro e 4 a 8 cm de altura. Possuem bordas retas e faces planas, sendo bem trabalhados esteticamente após o processo de maturação e antes de serem enviados para comercialização (MENESES, 2006).

Os QMA de diferentes regiões do Estado de Minas Gerais são fabricados basicamente com a mesma tecnologia (FIGURA 3). Estudos demonstram que a principal diferença entre os queijos fabricados nas diferentes regiões está no modo de prensagem. Queijos fabricados na região do Serro são prensados utilizando-se somente as mãos; os queijos fabricados nas regiões da Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro são prensados com o auxílio de um tecido. Dessa forma, as características finais do produto variam conforme a região do Estado onde é produzido (MARTINS et al., 2014; DORES et al., 2013).

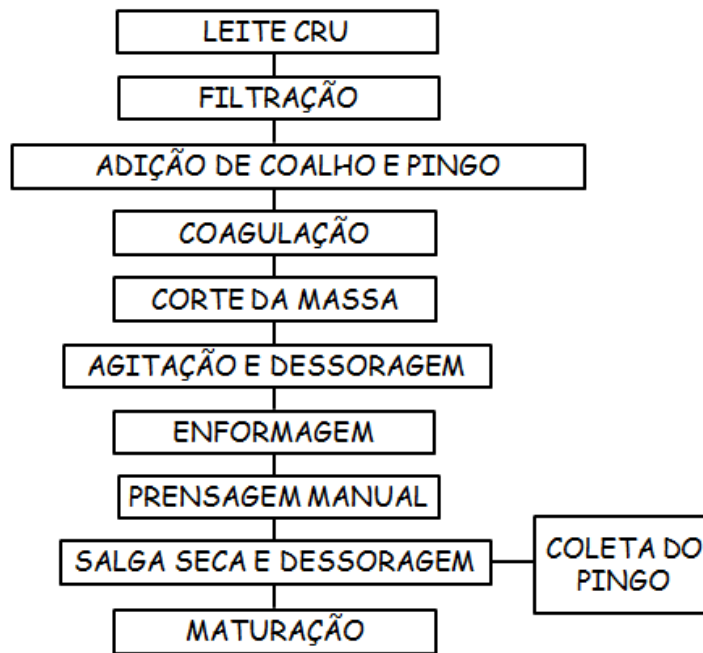


Figura 3. Fluxograma de fabricação do queijo Minas artesanal.

Feito a partir de leite cru, o QMA é um alimento que apresenta uma microbiota diversa, originária da matéria prima e do fermento utilizado, que transforma-se constantemente no processo de fermentação e maturação, aprimorando ao produto massa, sabor, coloração, consistência e componentes nutritivos, o que o transforma em um alimento com características sensoriais únicas (DORES E FERREIRA, 2012).

A microbiota presente no leite cru pode atuar como uma fonte direta na fabricação dos QMA, ou como uma fonte indireta enriquecendo a microbiota do ambiente de fabricação de queijos, cultura, soro de leite, cubas e prateleiras de madeira (MONTEL et al., 2014). Entre os diferentes micro-organismos que compõem a microbiota do leite cru estão as bactérias do ácido láctico (BAL), dentre as quais os gêneros *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. e *Weisella* spp. têm sido citadas. Também já foram isoladas estirpes de *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Brevibacterium* spp., leveduras e fungos (CASALTA et al., 2009; GAYA et al., 1987; MALLETT et al., 2012; MASOUD et al., 2011; TORMO et al., 2011).

Após a ordenha, o leite é filtrado e acondicionado em recipientes

adequados, no qual se adiciona o fermento endógeno (FE) também conhecido como “pingo”. O “pingo” é o FE láctico coletado na produção do dia anterior, consistindo de um soro fermentado, oriundo dos queijos já salgados, utilizado para direcionar a fermentação dos próximos queijos que serão produzidos (DOREES e FERREIRA, 2012; MINAS GERAIS 2002). Sua coleta é feita em um recipiente colocado embaixo de um orifício existente na bancada de produção, que possui determinada inclinação de modo a facilitar o escoamento do soro (FIGURA 4) (DORES E FERREIRA 2012; MARTINS et al., 2014).



Figura 4. Coleta do pingo realizada no final da dessoragem.

A utilização do “pingo” faz parte do “saber-fazer” tradicional do QMA e apresenta grande importância, pois age como inibidor de alguns microorganismos indesejáveis e confere ao queijo características típicas, por conter diversos grupos microbianos que direcionam a fermentação e maturação do queijo, conferindo ao produto final uma microbiota diversificada (MARTINS et al., 2014; NOBREGA, 2012).

Na composição do “pingo” destacam-se as BAL que apresentam importante papel na segurança microbiológica de queijos artesanais (COELHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014), contribuindo na rápida redução do pH e no acúmulo de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos (JAY, 2005), diacetil, acetaldeído (JAY, 1982; PIARD e DESMAZEAUD, 1991) e bacteriocinas (COELHO et al., 2014; NESPOLO e BRANDELLI, 2010).

Dessa forma, o incremento de BAL pela adição do “pingo” ao leite para fabricação dos QMA, constitui um fator adicional na segurança

microbiológica dos mesmos (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2014).

Em alguns casos o uso do “pingo” está caindo em desuso e muitos produtores estão utilizando a “rala” como FE para direcionar a fermentação dos queijos. Embora ainda feito artesanalmente, desde de 2002 (IMA, 2002) uma série de adaptações têm sido sugeridas a fim de adequar a produção dos QMA à legislação brasileira, principalmente no que tange à natureza dos equipamentos utilizados à sua produção, originalmente em madeira e então substituídos por materiais como fibras de vidro, polipropileno, aço inox, dentre outros (FIGURA 5).



Figura 5. Alterações exigidas pela legislação.

Segundo os produtores, essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem, resultando em um produto com textura muito macia e que conseqüentemente não é aceito pela cooperativa local que faz o intermédio da comercialização.

Dessa forma, na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, alguns produtores passaram a utilizar o próprio queijo na forma de “rala” como fermento. A “rala” consiste em um queijo maturado, produzido em um lote anterior, ralado, substituindo então o “pingo”, resultando agora em um produto com dessoramento adequado e textura mais firme.

Embora a implementação da “rala” tenha resolvido o problema

tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização de um fermento não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar a alterações em sua qualidade final, principalmente no que tange à qualidade microbiológica.

Queijos fabricados na região do Serro são prensados utilizando-se somente as mãos, sendo que os queijos produzidos nas regiões da Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro são prensados com o auxílio de um tecido (DORES et al., 2013; EMATER, 2003; MARTINS et al., 2014).

Essa diferença associada a outros fatores como clima, relevo, matéria-prima entre outros, resultam nas diferentes características sensoriais dos queijos produzidos em cada uma dessas regiões. Uma das principais consequências oriundas do tipo de prensagem utilizada é a diferença no tempo de maturação desses queijos. O tipo de prensagem irá resultar em uma maior ou menor concentração de lactose no produto final. Essa fonte de energia permanece em uma maior concentração nos queijos prensados sem o auxílio de tecidos. Nesse caso, a lactose é utilizada como substrato pelas BAL e permite uma maior produção de ácido pelas mesmas, o que desfavorece o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, sendo necessário nesse caso um menor período de maturação para que se atinjam as condições de segurança microbiológica para comercialização (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2014).

A maturação é uma das formas utilizadas para melhorar a qualidade microbiológica desses queijos, já que, por serem produzidos a partir de leite cru apresentam uma grande contaminação inicial. A maturação favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos, considerados fundamentais para a estabilidade e segurança microbiológica desses queijos. Corresponde ainda à fase de complexas transformações bioquímicas, que se processam tanto na periferia como no interior da massa dos queijos, sob a ação de enzimas, na sua maioria de origem microbiana (DORES et al., 2013; MCSWEENEY, 2004; MARTINS et al., 2014).

A lipólise e a proteólise são os principais processos bioquímicos observados durante a maturação dos QA. A lipólise está relacionada principalmente a liberação de compostos que irão conferir sabor e aroma

típicos de queijos maturados (CABEZAS et al., 2005). Já a proteólise, irá atuar diretamente na textura, além da liberação de peptídeos que, de forma conjunta, definem as propriedades sensoriais únicas desses queijos (PERRY, 2004).

A temperatura em que a maturação ocorre é de extrema importância para o direcionamento da microbiota. Sabe-se que a temperatura ambiente leva à fermentação desejável, o que favorece a fermentação láctica (DORES, et al., 2013; MARTINS et al., 2014). O QMA somente deve ser submetido à temperatura de refrigeração após ter sido maturado. A refrigeração inibe as BAL e, conseqüentemente leva à maturação inadequada.

O período de maturação estabelecido para o QMA é definido pela atividade da microbiota endógena, principalmente as BAL, que, por meio de seus metabólitos, inibem contaminantes indesejáveis (TOPISIROVIC et al., 2006). Dores et al. (2013) e Martins et al. (2014) analisaram o período mínimo de maturação necessário para atingir a segurança microbiológica do queijo artesanal da Canastra e do Serro respectivamente, e constataram que *Staphylococcus aureus* foi a espécie que definiu o período de maturação, por permanecer por mais tempo com contagens acima do permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 1996). Os autores verificaram a ausência desse micro-organismo em 17 e 22 dias de maturação a temperatura ambiente para a região do Serro e Canastra respectivamente, estimando dessa forma o período mínimo necessário para a redução dos micro-organismos indesejáveis aos níveis aceitáveis. Dessa forma, ressalta-se a importância de respeitar o processamento tradicional praticado que consiste na maturação a temperatura ambiente.

1.3. O PAPEL DA MICROBIOTA ENDÓGENA NA MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

A microbiota nativa formada principalmente por BAL presentes no leite cru e no FE é de grande importância para as características sensoriais do produto final.

Durante a maturação algumas das espécies de BAL presentes

produzem um grande número de enzimas que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (ALEXANDRE et al., 2002; VILJOEN, 2001). Essas enzimas são divididas em quatro grandes grupos:

1)→enzimas proteolíticas que desempenham o mais importante papel durante a maturação dos queijos na formação do aroma e textura. São subdivididas em dois subgrupos: as endopeptidases ou proteases, que hidrolisam as proteínas liberando peptideos e as exopeptidases. Microorganismos dos gêneros *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Kluyveromyces* spp. e *Penicillium* spp. são os principais produtores dessas enzimas 2)→Lipases: hidrolisam triglicerídeos em ácidos graxos e glicerídeos parciais, sendo as bactérias psicotróficas grandes produtoras dessas enzimas juntamente com os fungos dos gêneros *Geotrichum* spp. e *Penicillium* spp. As BAL possuem fraca atividade lipolítica, atuando melhor na matéria gorda parcialmente hidrolisada. 3)→ Enzimas de degradação dos aminoácidos produzidas por *Micrococcus* spp., *Brevibacterium* spp. e *Enterococcus* spp. 4)→Enzimas ativas sobre os ácidos graxos: são transformados por duas vias principais: a esterificação por meio de esterases produzidas por *Pseudomonas* spp e *Micrococcus* spp. e a β -oxidação com a formação de metilcetonas e alcoois secundários, sendo os fungos filamentosos do gênero *Penicillium* spp. os principais responsáveis pela produção de enzima (EARLY, 1998; ECK, 1987).

1.4. ASPECTOS DE SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

Ainda permanece o debate com relação aos riscos e benefícios do consumo de QA. Por serem obrigatoriamente elaborados a partir de leite cru, esse queijos são susceptíveis ao crescimento de patógenos de alto risco como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, algumas estirpes de *Escherichia coli*, dentre outros. Estudos envolvendo diferentes tipos de queijos provenientes de vários países europeus tradicionalmente produtores de QA relatam o risco potencial para a saúde ao

se consumir esse produto (DE BUYSER et al., 2001; MONTEL, 2014).

Surtos envolvendo *Salmonella* spp. têm sido escassos desde 2000, sendo relatados um total de 15 surtos nas últimas duas décadas (DE BUYSER et al., 2005; JOURDAN-DA SILVA e LE HELLO, 2012).

Surtos de *Escherichia coli* (O157: H7, O26: H11) produtores de shigatoxina têm sido associados ao consumo de leite cru e a queijos fabricados a partir de leite pasteurizado ou não, devido à pasteurização inadequada e/ou a contaminação após o processamento (FARROKH et al., 2013).

A listeriose se tornou o exemplo emblemático de doença grave transmitida por produtos feitos a partir de leite cru, porém, surtos associados ao consumo de queijos são muito raros (EFSA, 2010; GOULET et al., 2006; MAIJALA et al., 2001). A contaminação por *Listeria monocytogenes* não é específica ao consumo de queijos de leite cru, queijos feitos a partir de leite pasteurizado também podem ser contaminados (EFSA, 2012; RUDOLF e SCHERER, 2001) devido à pasteurização inadequada ou contaminação pós-pasteurização (DE BUYSER et al., 2001; DONNELLY, 2001).

Estudos realizados com queijos artesanais têm indicado a presença de *Staphylococcus aureus* em níveis muitas vezes acima do permitido pela legislação (DORES et al., 2013; MARTINS et al., 2014). Por outro lado, existem poucos relatos ou notificações de surtos de toxi-infecções estafilocócicas relacionadas ao seu consumo.

Durante a fabricação dos QMA existem alguns fatores que desempenham um papel de destaque no controle da microbiota indesejável presente nesses queijos, sendo eles: a qualidade microbiológica da matéria-prima, a aplicação das BPF e BPA, a adição de cloreto de sódio durante o processo de fabricação, a temperatura e tempo de maturação e a presença de uma microbiota endógena rica em BAL, presentes tanto no leite cru como no FE. Este último apresenta extrema importância pelo papel no direcionamento das características sensoriais e de segurança microbiológica do produto final (DORES e FERREIRA, 2012).

1.4.1. O PAPEL DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO NA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

As BAL são um grupo de bactérias que apresentam algumas características em comum: anaeróbias facultativas ou microaerófilas, cocos ou bacilos, gram-positivas, catalase negativas, não apresentam motilidade e não esporulam (JAY, 2005).

Mais de 400 espécies de BAL já foram detectadas no leite cru, e a capacidade de inibição de micro-organismos patógenos em queijos artesanais está mais relacionada com a presença dessas cepas do que com compostos não microbianos presentes no leite. Os mecanismos dessa inibição ainda não estão bem esclarecidos, porém essa avaliação começa tanto enfatizando as particularidades da microbiota presente nesses queijos quanto ao tipo de processamento envolvido que ajuda a manter sua riqueza e diversidade (MONTEL, 2014).

A principal característica comum das BAL é a capacidade de fermentar o açúcar, com produção principalmente de ácido lático a partir da degradação da lactose, o que garante a esse grupo a função tecnológica, ou seja, o desenvolvimento de *flavor*, aroma e textura.

Além disso, as BAL produzem uma diversidade de substâncias antimicrobianas que contribuem para sua inocuidade e o conhecimento de características fenotípicas dessa microbiota pode possibilitar o entendimento do seu papel na segurança microbiológica do produto artesanal. Essa segurança advém do metabolismo desta microbiota endógena no habitat natural que representa a fabricação do queijo, que pode envolver características como: produção de ácidos orgânicos (JAY, 2005), produção de diacetil (PIARD e DESMAZEAUD, 1991) produção de exopolissacarídeos (EPS) (DENNY, 1995), resistência à NaCl, atividade antagonista (DAL BELLO et al., 2012), produção de bacteriocinas (ABEE et al., 1995; BALCIUNAS et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; CALO-MATA et al., 2008), dentre outros.

A rápida produção de ácido lático na fase inicial do processo fermentativo inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis pelo acúmulo de acidez e rápida diminuição do pH do leite (JAY, 2005).

Já os EPS secretados pelas células bacterianas formam uma camada protetora que possui papel importante tanto na sua sobrevivência quanto na sua virulência, podendo auxiliar na adesão da célula a superfícies, concentrar nutrientes, evitar a dessecação e o contato com o hospedeiro, além de proteger contra moléculas tóxicas (DENNY, 1995).

As bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas sintetizadas ribossomicamente que apresentam ação comprovada contra diversos micro-organismos (BALCIUNAS et al., 2013; MILLS et al., 2011; O'SHEA et al., 2013; RENYE et al., 2011), podendo inibir a multiplicação de patógenos, diminuindo assim sua incidência em queijos fabricados com leite cru (ORTOLANI et al., 2010).

Apesar do mecanismo ainda não ser bem elucidado, dependendo da quantidade de diacetil produzida por BAL, essa pode ser letal para bactérias gram-negativas, o que o torna um fator importante na elaboração de queijos fabricados com leite cru (PIARD e DESMAZEAUD, 1991).

O conhecimento de características fenotípicas de bactérias isoladas dos QMA ao longo de sua maturação pode possibilitar o entendimento do papel destas na sua segurança microbiológica.

1.5. ASPECTOS LEGAIS NA PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

Diversas leis, portarias, resoluções, instruções normativas e decretos estão envolvidos na regulamentação de QA no Brasil (TABELA 1).

Tabela 1. Principais regulamentações sobre os Queijos Artesanais

| Regulamentações | Título |
|--|--|
| Resolução Nº 7 (28 de novembro de 2000) | Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias para seu relacionamento junto ao serviço de inspeção federal. |
| Lei Estadual Nº 14.185 (31 de janeiro de 2002) | Dispõe sobre o processo de produção de QMA e dá outras providências, liberando esse produto para comercialização a partir de 60 dias de maturação. |

| | |
|--|---|
| Decreto N° 44864 (01 de agosto de 2008) | Altera o regulamento da lei N° 14.185, permitindo a comercialização dos QMA em período inferiores a 60 dias, entretanto somente dentro do Estado de Minas Gerais. |
| Instrução Normativa N° 57 (15 de dezembro de 2011) | Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. |
| Portaria N° 1305 (30 de abril de 2013) | Estabelece diretrizes para a produção do QMA liberando este para comercialização por um período de maturação de 17 dias. |
| Portaria N° 517 (14 de junho de 2002) | Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo Minas artesanal. |
| Portaria N° 518 (14 de junho de 2002) | Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do QMA. |
| Portaria N° 523 (3 de julho de 2002) | Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e Boas práticas na manipulação e fabricação do QMA. |

A Resolução nº 7 do MAPA em 2000 foi primeira regulamentação sobre os QA, estabelecendo-se que a comercialização de queijos fabricados a partir de leite cru seria permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), no queijo submetido há um tempo mínimo de 60 dias de maturação (Brasil, 2000). Porém, o longo tempo de maturação imposto compromete suas características sensoriais e sua comercialização. Dessa forma, sem essa exigência cumprida, a comercialização dos QA deveria ficar segundo a resolução restrita ao estado de Minas Gerais.

Tentando resguardar a tradição dos QMA, em 31 de janeiro de 2002, a Lei estadual nº 14.185 foi promulgada com a finalidade de regulamentar a adequação e certificação das queijarias, porém o período mínimo de 60 dias de maturação foi mantido (MINAS GERAIS, 2002). Sabendo-se que ocorre a descaracterização quando os queijos são submetidos a essa longa maturação, estudos foram desenvolvidos e os períodos de 17 e 22 dias de maturação mostraram-se adequados para a comercialização dos queijos da região do Serro (MARTINS, 2006) e Canastra (DORES, 2007), respectivamente.

O Decreto nº 44864 de 01 de agosto de 2008, que altera o regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, permitiu a disponibilidade de comercialização dos QMA com períodos menores do que

60 dias de maturação, no entanto, o produto poderia circular somente dentro do Estado de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2008).

Esse paradoxo resultou numa insatisfação geral, tanto dos produtores rurais como dos consumidores e comerciantes em outros estados da federação. Assim, em 15 de dezembro de 2011, o MAPA publicou a Instrução Normativa Nº 57, com a finalidade de diminuir os entraves que excluem a colocação dos QMA no mercado nacional, onde é discutida a possibilidade de redução do período de maturação inferior a 60 dias, desde que sua segurança seja cientificamente comprovada (BRASIL, 2011).

Em 2013, foi aprovada a Portaria Nº 1305 liberando o período de maturação dos queijos das microrregiões do Serro para um mínimo de 17 dias e para as microrregiões da Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes para um mínimo de 22 dias, até que novas pesquisas fossem realizadas para que se diminua ainda mais o tempo de maturação, desde que seja comprovada sua segurança microbiológica (IMA, 2013).

Para garantia da qualidade dos QMA, a Portaria Nº 1305 exigiu a implementação das BPF e das BPA nas propriedades queijeiras para que pudessem ser cadastradas ao IMA, e alcançassem assim a qualidade microbiológica nos períodos mínimos de maturação estabelecidos. As BPF são um conjunto de normas empregadas em produtos, processos, serviços e edificações, visando a promoção e a certificação da qualidade e da segurança do alimento (BRASIL, 1997). A sua implementação por produtores rurais é fundamental para melhoria do ambiente e da manutenção dos recursos naturais, além de garantir produtos de padrão mais elevado, aumentando a segurança e a qualidade de vida das pessoas que os consomem.

As BPA regulam a produção do queijo Minas artesanal por meio de três portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA): Portaria Nº 517, de 14 de junho de 2002 que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção de queijo Minas artesanal; Portaria Nº 518, de 14 de junho de 2002 que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal; e Portaria Nº 523, de 23 de julho de 2002 que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e

fabricação.

De acordo com a Portaria Nº 518 uma série de adaptações foram sugeridas a fim de adequar a produção dos QMA à legislação brasileira, principalmente no que tange à natureza dos equipamentos utilizados à sua produção, originalmente em madeira e então substituídos por materiais como fibras de vidro, polipropileno, aço inox, dentre outros. No entanto, segundo os produtores, essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem.

Na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, alguns produtores passaram a utilizar o próprio queijo na forma de “rala” como fermento, que consiste em um queijo maturado, produzido em um lote anterior, ralado, substituindo então o “pingo”, resultando agora em um produto com dessoramento adequado.

Embora a implementação da “rala” tenha resolvido o problema tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização de um fermento não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar a alterações em sua qualidade final, principalmente no que tange à qualidade microbiológica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar o impacto do fermento endógeno utilizado na qualidade e no tempo de maturação de queijo Minas Artesanal (QMA) produzido em propriedades cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), na região do Serro-MG.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Detectar e/ou quantificar os micro-organismos indicadores de segurança em amostras de água, pingo e leite destinados à

produção dos QMA, assim como no produto acabado ao longo de 60 dias de maturação;

- ii) Determinar o tempo mínimo de maturação (utilizando como parâmetro a contagem máxima de *Staphylococcus aureus* permitida pela legislação vigente) necessário para atingir a segurança microbiológica dos QMA produzidos com diferentes tipos de fermentos;
- iii) Avaliar o tipo de fermento utilizado sobre as características microbiológicas, físicas, físico-químicas e de textura dos QMA;
- iv) Avaliar o efeito do tipo de fermento utilizado sobre o perfil de bactérias lácticas dos QMA produzidos na região do Serro-MG;

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal Minas cheese against indicator microorganisms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 424-428, 2002.

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, 2011.

BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. V.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. V.; JURKIEWICZ, C. H.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 47, p. 147-153, 2014.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 57 de 15 de dezembro de 2011. **Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 23. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução N. 07 de 28 de novembro de 2000. **Critérios de funcionamento e de controle da produção de queijarias, para seu relacionamento junto ao serviço de inspeção federal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146 de 7 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 1996. p.3977. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BORELLI, B. M., **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 119p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

CABEZAS, L.; POVEDA, J. M.; SÁNCHEZ, M. I.; PALOP, M. L. L. Physicochemical and sensory characteristics of Spanish goat cheeses. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 48–55, 2005.

CALO-MATA, S.; ARLINDO, K.; BOEHME, T.; DE MIGUEL, A.; PASCOAL, J.; BARROS-VELAZQUEZ. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 43-63, 2008.

CASALTA, E.; SORBA, J. M.; AIGLE, M.; OGIER, J. C. 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.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

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.

DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 58-65, 2012

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, n. 67, p. 1-17, 2001.

DE BUYSER, M. L.; BRISABOIS, A.; ESPIÉ, E.; DELMAS, G.; DUFOUR, B. Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire en France de 1988 à 2003. **Epidemiol Bull**, p. 1–2, 2005.

DENNY, T. P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 173-97, 1995.

DONNELLY, C. W. Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk: a review. **Bulletin of the International Dairy Federation**, p. 16-27, 2001.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, p. 26-34, 2012.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brasilian artisan canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, n.1, 2013.

EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2. ed. Ralph EARLY. Londres. 1998. 138p.

ECK, A. **O queijo**. 1º Volume, coleção EUROAGRO, Publicações Europa – América, 1987, 336p.

EMATER – EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENÇÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Programa Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: [http:// www.emater.mg.gov.br](http://www.emater.mg.gov.br). Acesso em: 01 jun. 2016.

EMATER – EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL
- EMATER. **Documento de caracterização da região do Serro/MG como produtora de queijo Minas artesanal.** Serro, 2002.

EMATER – EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL
- EMATER. Ações Extensionistas para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Revista da EMATER – MG**, n. 77, p. 16-17, 2003.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. **The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008.** Eur. Food Saf. Authority J., n. 8 , v. 1, p. 1496–1606, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010.** Eur. Food Saf. Authority J., n. 10, p. 2597, 2010.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; DE REU, K. Review of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, p. 190-212, 2013.

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.

GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNTEZ, M. Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes'milk, **Journal of Applied Microbiology**, v. 62, p. 321-326, 1987.

GOULET, V.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; VAILLANT, V.; LAURENT, E.; DE VALK, H. Surveillance of human listeriosis in France, 2001–2003. **Euro surveillance**, v. 11, p. 79-81, 2006.

GONZÁLEZ L, SANDOVAL H, SACRISTÁN N. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, n.18, p. 716-722, 2007.

HARBUTT, J. (Org.). **O livro do queijo**. São Paulo: Globo, 2010. 352 p.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Identifica a Região do Triângulo Mineiro é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2013a. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acessado em 30 de julho de 2016.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. **Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal**. 2013b. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acessado em 30 de julho de 2016.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Identifica a Região do Campo das Vertentes é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal**. 2009. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acessado em 30 de julho de 2016.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 517, de 14 junho de 2002. Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002. Portaria nº 523, de 3 de julho de 2002. Disponível em: < <http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acessado em: 01 de junho de 2016.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

JAY, J. M. Antimicrobial activity of diacetyl. **Applied and Environmental**

Microbiology, v. 44, p. 525-532, 1982.

JOURDAN-DA SILVA, N.; LE HELLO, S. Salmonelloses en France, 2002–2010: tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. **Epidemiol Bull**, v. 50, p. 31-36, 2012.

KING, N. Modifications of the Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. **Dairy Industry** n. 13, p. 800, 1948.

LIMA FILHO, R. R.; POMBO, G. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite**, v. 6, n. 105, 2010.

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.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* wirala an epidemic caused by butter in Finland. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 97-109, 2001

MALLET, A.; GUÉGUEN, M.; KAUFFMANN, F.; CHESNEAU, C.; SESBOUÉ, A.; DESMASURES, N. Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices **International Dairy Journal**, v. 27, p. 13-21, 2012.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2014.

MASOUD, W.; TAKAMIYA, M.; VOGENSEN, F. K.; LILLEVANG, S.; ABU AL-SOUD, W.; SORENSEN, S. J.; JAKOBSEN, M. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing, **International Dairy Journal**, v. 21, p. 142-148, 2011.

MCSWEENEY, P. L. H.; OTTOGALLI, G.; FOX, P. F. Diversity of cheese varieties: an overview. In: Fox, P. F. (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. **Academic Press**, v. 2, p. 1-23, 2004.

MENEZES, S. S. N. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. **Revista Geográfica de América Central**, p. 1-16, 2011.

MENEZES, S. S. N. **A força dos laços de proximidade na tradição e inovação no/do território sergipano das fabriquetas de queijo. São Cristóvão**. São Cristóvão: UFS, 2009. 359p. Tese de doutorado em Geografia, Universidade Federal de Sergipe, 2009.

MENESES, J. N. C. **Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil; dossiê interpretativo**. Belo Horizonte: Ministério da Cultura, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, v.1, 139p, 2006.

MILLS, S., STANTON, C., HILL, C., ROSS, R. P. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Reviews in Food Science and Technology**, v. 2, p. 299-329, 2011.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 01 de agosto de 2016.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 01 de agosto de 2016.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; PAUS-DELBES, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIRES, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p.136-154, 2014.

MUNDO DO LEITE. **Produção, Industrialização e Consumo**. DBO Editores, n.4, 2003.

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**. EMBRAPA. 2003.

NESPOLO, C. R.; BRANDELLI, A. Production of bacteriocin like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.1009-1018, 2010.

NOBREGA, J. E. da. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 2012. 127p. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2012.

ORDONÉZ J. A. **Alimentos de Origem Animal**. Tecnologia de Alimentos vol 2, Editora Artmed. Porto Alegre, 2005.

ORTOLANI, M. B. T.; MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; VICOSA, G. N.; CARVALHO, K. G.; SILVA JR. A.; NERO, L. A. Maciacular identification of

naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2880–2886, 2010.

O'SHEA, E. F., COTTER, P. D., ROSS, R. P., HILL, C. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 130-134, 2013.

PERRY, K.S.P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria-1.Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

RENYE, J. A., SOMKUTI, G. A., GARABAL, J. I., DU, L. Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Food Control**, v, 22, p. 1887-1892, 2011.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, n. 63, p. 91-98, 2001.

SANTOS, J. S.; CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. **O mineiro, o queijo e os conflitos (nada poéticos) em torno dos alimentos tradicionais produzidos artesanalmente no Brasil**. In: ENCONTRO DA REDE DE ESTUDOS RURAIS: DESENVOLVIMENTO, RURALIDADES E AMBIENTALIZAÇÃO: Paradigmas e atores em conflito. Belém. Conference Paper. UFPA, Belém (PA), 2012.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v. 112, p. 230-235, 2006.

TORMO, H.; AGABRIEL, C.; LOPEZ, C.; LEKHAL, D. H. A.; ROQUES, C. Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. **International Journal of Dairy Science**, v. 6, p. 13-28, 2011.

USDA – United States Department of Agriculture/ Foreign Agricultural Service **Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA – Dairy: World Markets and Trade**. 2015. Disponível em: <[http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars /dairy.pdf](http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf)>. Acesso em: 20 agosto 2016.

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

VILJOEN, B. C. The interaction between cultures and bacteria in dairy environments. **International Journal of Microbiology**, v. 69, p. 37-44, 2001.

VITROLLES, D. When geographical indication conflicts with food heritage protection, **Anthropology of food**, v. 8. 2011.

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA UTILIZADA

1. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS

Foram estudadas 12 unidades produtoras de queijo Minas artesanal cadastradas ao Instituto Mineiro de Agropecuária e localizadas na região do Serro-MG, sendo que 4 utilizaram o “pingo” e 8 utilizaram a “rala” como fermento na fabricação dos queijos. A produção ocorreu no período da seca (julho).

Para a produção dos queijos seguiu-se a tecnologia apresentada na Figura 3. Em todas as bateladas somente o queijeiro participou do processo, no intuito de manter a padronização e minimizar contaminações e variáveis que poderiam influenciar nas características dos mesmos.

Para a fabricação dos queijos foram utilizados em média de 100 litros de leite cru ordenhado mecanicamente e filtrado em coadores de aço inox (I). Ao leite já transferido para o tanque de fabricação (aço inox) foram adicionados 7 mL de coalho (marca Bela 31 Vista® - coalho líquido BV – 1:3.000) e fermento endógeno (150 gramas de “rala” ou 500 mL de “pingo”) (II). O tempo médio de coagulação foi de 45 minutos (III). Em seguida a massa foi cortada utilizando-se uma pá de aço inox (IV) para obtenção de grãos menores e agitada lentamente por 20-30 minutos para permitir a dessoragem da massa (V). Posteriormente os queijos foram enformados (VI) e a prensagem foi realizada por compressão da massa utilizando-se as mãos (VII). A salga a seco foi feita utilizando-se sal grosso em um dos lados e após doze horas, o lado posterior (VIII). No dia seguinte (segundo dia de fabricação), os queijos foram retirados das formas, embalados e transportados em caixas térmicas para serem maturados por 60 dias no Laboratório de Culturas Lácteas (LCL) do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (IX) (FIGURA 6).

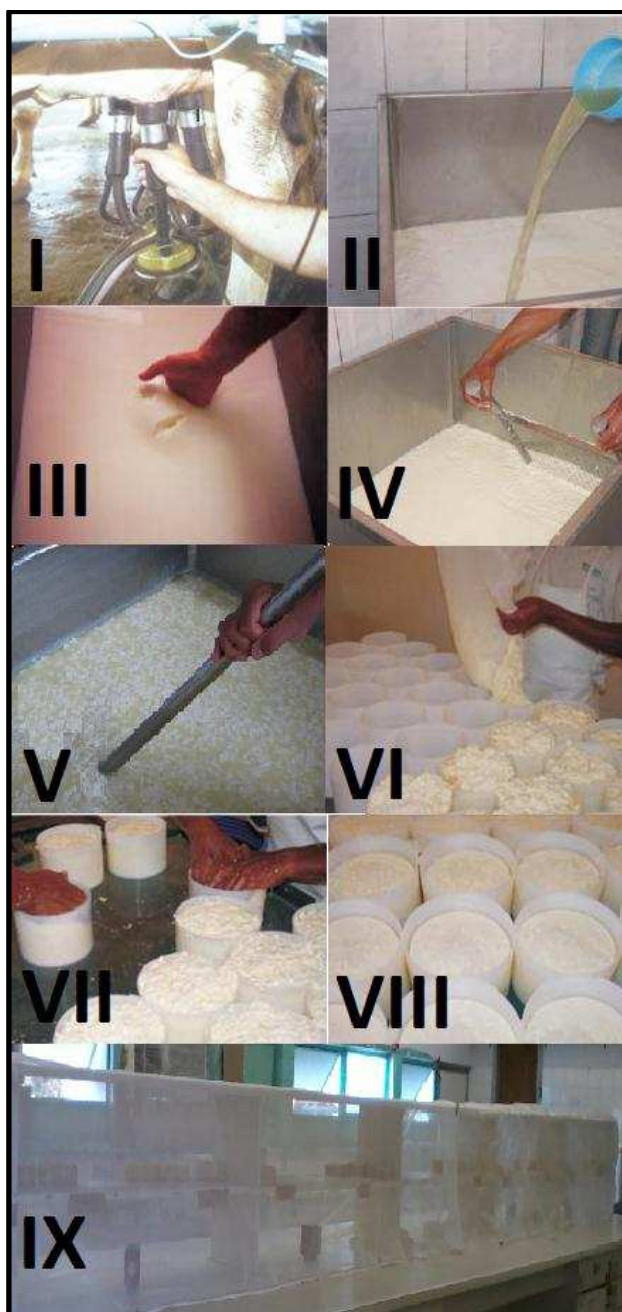


Figura 6. Processo de fabricação do queijo Minas artesanal.

2. AMOSTRAGEM E CONDIÇÕES DE MATURAÇÃO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 611.817).

Amostras de água, leite e fermento (“pingo” ou “rala”) de cada propriedade amostrada foram coletadas em recipientes esterilizados, sendo mantidas refrigeradas até o momento das análises.

Após dois dias de fabricação, ao completar a salga, um queijo de cada uma das propriedades amostradas foi coletado e analisado imediatamente. Mais seis queijos de cada unidade produtora foram mantidos nas mesmas por um período máximo de seis dias (durante o período de coleta), quando então foram transportados para a Universidade federal de Viçosa e maturados na condição ambiente (23 – 25 °C e UR 62 %), sem embalagem e em prateleiras de madeira ao longo de 60 dias, reproduzindo-se as condições de maturação desses queijos nas propriedades de origem. Nos dias 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação um queijo de cada propriedade foi submetido às análises físico-químicas, físicas e microbiológicas, totalizando 84 unidades amostrais.

3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas para as amostras de leite, fermento (“pingo”/“rala”) e água logo após a coleta e para as amostras de queijos nos períodos 2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação (TABELA 1).

Tabela 1. Análises microbiológicas realizadas em amostras de água, leite, fermento e queijo

| Grupo microbiano | Amostra | | | | Referência |
|---|---------|-------|----------|--------|---------------------|
| | Água | Leite | Fermento | Queijo | |
| Mesófilos aeróbios | | | | X | WEHR e FRANK, 2004 |
| Fungos | | | | X | WEHR e FRANK, 2004 |
| Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> | X | X | X | X | WEHR e FRANK, 2004 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | X | X | X | X | AOAC, 2001 |
| <i>Salmonella</i> spp. | X | X | X | X | AOAC 2014.01 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | X | X | X | X | AOAC Licença 995.22 |

Para análise dos queijos, 25 g de cada amostra foram homogeneizadas em 225 mL (diluição 10^{-1}) de solução salina-triptona estéril, com o auxílio de um stomacher (JP Selecta, Espanha) por 1 minuto. Foram realizadas em seguida diluições sucessivas de 10^{-2} a 10^{-7} em tubos estéreis

contendo 9 mL de solução salina-triptona estéril. Alíquotas dessas diluições foram inoculadas em *Pour Plate* ou *Spread Plate*, seguidas de incubação de acordo com as exigências de cada grupo. Os plaqueamentos foram realizados em duplicatas para cada diluição. Para contagem foram consideradas as placas que apresentaram contagem entre 25-250 colônias. No caso da utilização de Petrifilms a contagem considerada foi de 15-150 colônias.

Para análise do leite, água e fermento o mesmo procedimento foi realizado, porém a primeira diluição realizada utilizando-se 1 mL da amostra em 9 mL de solução salina-triptona estéril.

3.1. Enumeração de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos

A contagem padrão de micro-organismos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos foi realizada empregando-se a técnica "*Pour Plate*" (plaqueamento em profundidade) em placas de Petri, utilizando o meio Plate Count Agar (PCA), seguida de incubação a 35 ± 1 °C por 48 horas.

3.2. Enumeração de fungos filamentosos e não filamentosos

A contagem padrão de fungos filamentosos e não filamentosos foi realizada empregando-se a técnica "*Spread Plate*" (plaqueamento em superfície) em placas de Petri com a utilização do meio Potato Dextrose Agar (PDA), acidificado com 1 % (v/v) de ácido tartárico 10 % (m/v) (pH 3,5), seguida de incubação a 25 ± 1 °C por 3 a 5 dias.

3.3. Enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para a enumeração de coliformes totais e *Escherichia coli* foi utilizada a placa Petrifilm para coliformes totais e *E. coli* (Petrifilm™ EC). As placas foram incubadas a $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ por 24 - 48 horas. A leitura das placas foi realizada após 24 e 48 horas de incubação para enumeração de coliformes totais e *E. coli* respectivamente.

3.4. Enumeração de *Staphylococcus aureus*

Para a enumeração dessa bactéria foi utilizada a placa Petrifilm para *S. aureus* (Petrifilm™ Staph Express). As placas foram incubadas a 35 °C ± 1 °C por 24 ± 2 horas para enumeração das colônias típicas.

3.5. Detecção de *Listeria monocytogenes*

A detecção de *L. monocytogenes* nos queijos foi realizada utilizando-se o teste *Listeria Visual Immunassay (VIA)* (AOAC Licença 091201), de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor. Foi utilizada para controle positivo do kit a estirpe ATCC 15313 (*Listeria monocytogenes*).

3.6. Detecção de *Salmonella* sp.

A detecção de *Salmonella* sp. nos queijos foi realizada utilizando-se o teste *Salmonella Express (SALX)* (AOAC Licença 2014.01), de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor. Foi utilizada para controle positivo do kit a estirpe ATCC 13076 (*Salmonella enteritidis*).

3.7. Isolamento de bactérias lácticas

Amostras de queijos com 2, 8, 15, 22 e 29 dias de maturação foram plaqueadas conforme descrito no item 4.3 utilizando-se os meios MRS, de Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck, Darmstad, Alemanha) e M17 (Oxoid, Hampshire, England), seguida de incubação a 37 °C e 30 °C respectivamente. Colônias foram selecionadas de forma randomizada a partir das placas (cuja contagem estivesse entre 30 e 300 colônias). Os isolados foram mantidos a -80 °C em caldo MRS ou M17 contendo 15 % (v/v) de glicerol. Os mesmos foram também mantidos à -80 °C em leite desnatado reconstituído (LDR) 10 % (m/v). A ativação foi realizada através do duplo cultivo nos respectivos caldos e mantidos a 30 °C (M17) e 37 °C (MRS) durante 24 horas.

3.8. Análise das características fenotípicas dos isolados

Os isolados foram submetidas à coloração de Gram (TORTORA et al., 2000) e teste de catalase (HOLDEMAN et al., 1987). Todos foram considerados para as análises posteriores para conhecimento de propriedades como: capacidade de acidificação, produção de diacetil, formação de exopolissacarídeos, tolerância ao sal e atividade antimicrobiana.

3.8.1. Capacidade de acidificação

Os isolados obtidos dos meios MRS e M17 foram semeados nos respectivos caldos e incubados respectivamente a 37 °C e 30 °C por 24 horas. Alíquotas 1 % (v/v) foram inoculadas em 10 mL de LDR 10 % (m/v) e em seguida incubadas nas respectivas temperaturas por 6 horas. O pH foi mensurado após 6 horas de incubação utilizando phmetro. A taxa de acidificação calculada utilizando a variação do pH ($\text{pH} = \text{pH}_{\text{tempo zero}} - \text{pH}_{\text{tempo 6}}$). Os valores de pH após 6 horas (pH_6) foram usados para comparar a atividade de acidificação entre as cepas (MORANDI et al., 2011; PSONI et al., 2007).

3.8.2. Produção de diacetil

Alíquotas 1 % (v/v) de cada isolado foram inoculadas em 10 mL de MRS/M17 e incubadas à 30 °C (M17) 37 °C (MRS) por 24 horas. Logo após, a 1 mL de cada suspensão foi adicionado 0,5 mL de α -naftol 1 % (m/v) e KOH 16 % (m/v) e incubadas a 30 °C (M17) e 37 °C (MRS) por 10 minutos. A produção de diacetil foi determinada pela formação de anel lilás no topo dos tubos (DAL BELLO et al., 2012; KING, 1948).

3.8.3. Formação de exopolissacarídeos

Alíquotas 1 % (v/v) de cada isolado foram inoculadas em 10 mL de MRS e incubadas a 30 °C (M17) e 37 °C (MRS) por 24 horas. A formação de

exopolissacarídeos foi determinada de forma qualitativa pela mensuração do grau de formação de fio (COGAN, 1996; DAL BELLO et al., 2012).

3.8.4. Resistência a diferentes concentrações de NaCl

Para avaliar a resistência dos isolados a diferentes concentrações de NaCl, alíquotas de 1 mL das culturas foram inoculadas em 10 mL do caldo (MRS/M17), com diferentes concentrações de NaCl: (0,0; 2,0 e 6,0 % (m/v). Em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C (M17) e 37 °C (MRS) por 24 horas. Após a inoculação e após a incubação, a densidade ótica (OD_{650nm}) das culturas foi mensurada utilizando espectrofotômetro. O potencial de multiplicação das culturas nas diferentes concentrações de NaCl foi avaliada pela diferença das OD registradas nas duas leituras. (DAL BELLO et al., 2012).

3.8.5. Atividade antimicrobiana

Os isolados previamente ativados em caldo MRS foram inoculados com o auxílio de uma agulha de repicagem descartável estéril na superfície de placas contendo 20 mL de ágar MRS (1,5 %). Consequente as placas foram incubadas a 37 °C/ 24 h. Após formação de colônias visíveis, 10 mL de ágar semissólido BHI (0,7 %), contendo cerca de 10⁶ UFC.mL⁻¹ do micro-organismo indicador foram vertidos sobre a placa. Após refrigeração por 12 horas as placas foram incubadas a 37 °C/ 24 h (FLEMING, 1975). A atividade antagonista foi verificada pela formação de zonas claras ao redor das colônias, medidas manualmente com auxílio de uma régua. Os micro-organismos patogênicos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313).

4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas descritas a seguir foram realizadas para os queijos nos tempos 2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação.

4.1. Determinação da acidez titulável, gordura, umidade, extrato seco total e cloretos

As determinações da acidez titulável, gordura, umidade, extrato seco total e cloretos foram realizadas segundo os métodos oficiais descritos na Instrução Normativa nº 68, Métodos Analíticos Oficiais, Físico-Químicos, para controle de leite e produtos lácteos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

4.2. Determinação do pH

Para a determinação do pH dos queijos foi utilizado o medidor de pH digital portátil da marca Tecnal, modelo pH Meter-102.

4.3. Determinação de gordura no extrato seco

A determinação do teor de gordura no extrato seco foi realizada de modo indireto, por meio da razão entre o teor de gordura e o teor de extrato seco total do queijo, como descrito na seguinte fórmula (PEREIRA et al. 2001):

$$\% \text{ GES} = \frac{\% \text{ G}}{\% \text{ ES}} \times 100$$

Sendo,

% GES: teor de gordura no extrato seco em % (m/m);

% G: teor de gordura da amostra em % (m/m);

% ES: teor de extrato seco total da amostra em % (m/m).

4.4. Determinação da atividade de água (Aw)

A determinação da atividade de água (Aw) foi feita utilizando-se medidor digital Aqualab (Decagon 3TE, Decagon Dewires Inc., USA).

4.5. Determinação de nitrogênio total, nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12 %

As análises de nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e NS em TCA 12 % (m/v) foram determinadas pelo método Kjeldhal, segundo a técnica descrita pela International Dairy Federation 20b (IDF -FIL, 1993).

4.6. Determinação de proteína total, extensão de maturação e profundidade de maturação

A proteína total (PT) foi determinada de modo indireto, multiplicando-se o percentual de NT pelo fator 6,38, indicado para proteína derivada de leite (SILVA e QUEIROZ, 2005).

A extensão de maturação (EM) foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de NS em pH 4,6 (NS pH 4,6) e NT, multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOONPOMBO, 1983).

A profundidade de maturação (PM) também foi quantificada de forma indireta, por meio da razão entre a percentagem de NS em TCA 12 % (m/v) (NS TCA 12 %) e NT multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOONPOMBO, 1983).

5. ANÁLISES FÍSICAS

5.1. Altura e diâmetro

As análises de altura e diâmetro dos queijos artesanais foram realizadas momentos antes das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos 2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação. A altura e o diâmetro dos queijos foram quantificados com auxílio de um paquímetro.

5.2. Análise colorimétrica

A análise da cor instrumental foi realizada para os queijos nos tempos

2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação A determinação foi realizada em colorímetro Konica Minolta, modelo CECF-9, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1986). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L^* , a^* , b^* , a coordenada L^* corresponde à luminosidade, as coordenadas a^* correspondem à cromaticidade verde (-) e vermelho (+) e as coordenadas b^* correspondem à cromaticidade azul (-) e amarelo (+) (PATHARE et al., 2013).

As medições foram realizadas em três pontos aleatórios, na superfície (casca) e massa interna dos queijos, com três repetições.

Para a determinação do índice de saturação (C^*) foi utilizada a fórmula a seguir:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Para a determinação do ângulo de tonalidade (H°) foi utilizada a fórmula a seguir:

$$H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)^2$$

6. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA

A análise do perfil de textura (TPA) foi realizada para os queijos nos tempos 2, 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação. Para a realização da análise foi utilizado o aparelho Universal de Testes Instron (Modelo 3367, Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA).

Foram retirados três cubos (20 x 20 x 20 mm) em cada amostra de queijo e submetido às seguintes condições de análise: probe (55 mm), compressão em dois tempos a uma distância de 10 mm e velocidade de compressão 1mm s^{-1} (AWAD, 2006). As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a adesividade, mastigabilidade, coesividade e elasticidade foram calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron - Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) x tempo (s) obtidos durante os ensaios, em três repetições.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos resultados físicos e físico-químicos foi utilizado o programa SigmaPlot v.11, no qual foi realizado o teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Para os resultados microbiológicos foi realizada análise de regressão em função do período de maturação utilizado o programa SAS 9.3 (Statistical Analysis System) (UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil), cujos coeficientes foram testados pelo teste t até 5 % de significância.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official Methods of AOAC International. **Rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Foods**, 2001.

AOAC. Official Methods of AOAC International. **Official Method 995.22. Listeria in foods colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method (TECRA LISTERIA VIA)**.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of dairy products**. APHA Standard (15th ed.), Washington, DC, USA, (1985).

AWAD, S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. **Food Chemistry**, v. 97, p. 394-400, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 8. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

COGAN, T. M. History and taxonomy of starter cultures. **Dairy Starter Cultures**, p. 1–23, 1996.

DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 58-65, 2012

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an 891 isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology**, n. 30, v. 6, p. 892-1040, 1975.

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P. **Anaerobe Laboratory Manual**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 1987, 908 167p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk: determination of nitrogen content**. Brussels: 1993. 12p. (FIL 20B: 1993).

KING, N. Modifications of the Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. **Dairy Industry** n. 13, p. 800, 1948.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. **Dairy Science and Tecnology**, n. 91, p. 341-359, 2011.

PATHARE, P. B. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. **Food and Bioprocess Technology Dublin**, v. 6, n. 1, p. 36 - 60, 2013.

PSONI, L.; KOTZAMANIDES, C.; YIANGOU, M.; TZANETAKIS, N.; LITOUPOULOU-TZANETAKIS, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 211–220, 2007.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.

TORTORA, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Porto Alegre. Artmed Editora, 6ª edição. 2000. 827p.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the examination of dairy products**. In: American public health association. 17th ed. Washington: PC, 2004.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do leite**, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PREDOMINANTES NO QUEIJO MINAS ARTESANAL FABRICADO COM PINGO E RALA

Resumo

A fim de verificar diferença nas características de bactérias isoladas a partir de queijos fabricados com diferentes tipos de fermentos, 200 isolados de queijo Minas artesanal da região do Serro-MG foram analisados, onde 100 foram obtidos do queijo fabricado com o fermento tipo “pingo” e 100 a partir do queijo fabricado com o fermento tipo “rala”. Os isolados foram coletados dos queijos nos períodos de maturação de 2, 8, 15, 22 e 29 dias, onde foram submetidos a testes morfológicos e fenotípicos. De acordo com a morfologia celular dois grupos foram obtidos: cocos (56,50 %) e bacilos (43,50 %). Os isolados obtidos a partir do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram maior capacidade de acidificação quando comparados com aqueles obtidos do queijo fabricado com a “rala”. Somente 6 isolados (oriundos dos queijos fabricados com o “pingo”), produziram exopolissacarídeo e todos eles, independente do tipo de fermento utilizado, foram capazes de crescer nas concentrações de NaCl testadas (2,0 e 6,0 %). Com relação à produção de diacetil, 66 % dos isolados obtidos do queijo fabricado com a “rala” produziram esse composto, enquanto somente 25 % dos isolados do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram essa capacidade. De maneira geral, um maior número de isolados obtidos a partir do queijo fabricado com “pingo” apresentaram antagonismo contra os micro-organismos patogênicos testados: *Listeria monocytogenes* (82 %), *Staphylococcus aureus* (73 %), *Escherichia coli* (66 %) e *Salmonella enteritidis* (36 %). Os isolados obtidos dos queijos fabricados com os diferentes tipos de fermentos apresentaram características distintas que podem influenciar na qualidade, maturação e segurança microbiológica do produto final.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é definido como o queijo confeccionado a partir do leite de vaca integral, fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem com a utilização de um fermento endógeno (FE) tradicional conhecido como “pingo” (MINAS GERAIS, 2002).

O “pingo” é o soro fermentado coletado na produção do dia anterior, oriundo dos queijos durante o processo de salga seca. É utilizado para direcionar a fermentação dos próximos queijos que serão produzidos e substituem os fermentos industriais (DORES e FERREIRA, 2012; MINAS GERAIS, 2002). Esse fermento carrega uma diversidade de micro-organismos oriundos principalmente do leite cru, com predominância de bactérias do ácido láctico (BAL), onde se destacam os gêneros *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Weisella* spp., (CASALTA et al., 2009; ERCOLINI et al., 2009; FRANSIOSI et al., 2009; MARTINS et al., 2014; TORMO et al., 2011), além de já terem sido isoladas algumas bactérias dos gêneros *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Brevibacterium* spp., fungos filamentosos e não filamentosos (CASALTA et al., 2009; GAYA et al., 1987; MASOUD et al., 2011; TORMO et al., 2011).

As bactérias presentes no leite cru, no “pingo” e posteriormente nos QMA contribuem para sua inocuidade (COELHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014) e características sensoriais peculiares (EL GALIOU et al., 2013; MACEDO et al., 2004) devido a características como: produção de ácidos orgânicos (JAY, 2005), produção de diacetil e acetaldeído (JAY, 1992; PIARD e DESMAZEAUD, 1991), produção de exopolissacarídeos (EPS) (DENNY, 1995), atividade antagonista (DAL BELLO et al., 2012; O'BRYAN et al., 2016), produção de bacteriocinas (COELHO et al., 2014; NESPOLO e BRANDELLI, 2010), produção de lipases e proteases (EL GALIOU et al., 2013; SETTANNI e MOSCHETTI, 2010), dentre outros.

Algumas alterações no processo de fabricação dos QMA têm sido sugeridas pela legislação brasileira desde 2002 (IMA, 2002), dentre elas a substituição de bancadas, formas e pás de madeira por materiais de mais

fácil higienização como polipropileno e aço inox. Essas modificações trouxeram alterações nas características finais desses queijos que passaram a não dessorar adequadamente, apresentando ao final do processo uma textura muito macia, que não é aceita pelo comércio local. Na tentativa de remediar essa situação, os produtores passaram a utilizar como FE a “rala”, produto ralado, obtido a partir de um queijo já maturado, que quando utilizado origina um produto mais firme, com textura desejada para comercialização.

A modificação do FE, embora resolva o problema tecnológico ao longo do processo de fabricação desses queijos, pode acarretar em alterações importantes em suas características finais, sejam elas sensoriais, físico-químicas ou microbiológicas, pois ao contrário da microbiota presente no “pingo”, não se sabe ao certo quais bactérias predominam na “rala”, bem como as características que estas apresentam.

Dessa forma, esse estudo teve como objetivo comparar as características morfológicas e fenotípicas de BAL predominantes nos QMA fabricados com “pingo” e “rala” na região do Serro-MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 2 unidades produtoras de QMA localizadas na região do Serro-MG onde cada propriedade utilizou um tipo de FE para a fabricação dos queijos (“pingo” ou “rala”).

Cinco queijos oriundos da mesma fabricação de cada propriedade foram coletados após dois dias de fabricação, totalizando 10 amostras. Ao completar a salga, um queijo de cada produtor foi analisado imediatamente após a coleta representando o segundo dia de fabricação e os demais maturados na condição ambiente (23 °C e UR 62 %) sem embalagem e em prateleiras de madeira ao longo de 29 dias, mimetizando as condições reais de maturação desses queijos nas propriedades.

2.1. Isolamento de bactérias lácticas

Amostras dos queijos nos períodos 2, 8, 15, 22 e 29 dias foram

solubilizadas, diluídas e a solução foi plaqueada utilizando-se os meios MRS, de Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck, Darmstad, Alemanha) e M17 (Oxoid, Hampshire, England), seguida de incubação a 37 °C e 30 °C respectivamente. Colônias foram selecionadas de forma randomizada a partir das placas (com contagem entre 30 e 300 colônias). Os isolados foram mantidos a - 80 °C em caldo MRS ou M17 contendo 15 % (v/v) de glicerol. Os mesmos foram também mantidos à - 80 °C em leite desnatado reconstituído (LDR) 10 % (m/v). A ativação foi realizada através do duplo cultivo nos respectivos caldos e mantidos a 30 °C (M17) e 37 °C (MRS) durante 24 horas.

Para cada amostra de queijo analisado em cada período foram obtidas 10 colônias a partir do meio MRS e 10 colônias a partir do meio M17, totalizando 200 isolados, 100 provenientes do queijo fabricado com o “pingo” e 100 do fabricado com a “rala”.

2.2. Análise das características fenotípicas dos isolados

Para cada isolado foi realizada análise das características morfológicas (coloração de Gram) (TORTORA et al., 2000), capacidade de produção de catalase (HOLDEMAN et al., 1987), capacidade de acidificação (PSONI et al., 2007), produção de diacetil (KING, 1948), formação de exopolissacarídeos (COGAN, 1996), tolerância à NaCl (DAL BELLO et al., 2012) e atividade antimicrobiana (FLEMING, 1975).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização geral dos isolados

Um total de 200 isolados foram obtidos a partir das amostras de QMA fabricados com “pingo” (100 isolados) e “rala” (100 isolados) (TABELA 1).

Tabela 1. Número de isolados obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 29 dias de maturação

| Tipo de queijo | Tempo de maturação (dias) | | | | | | | | | | Total |
|----------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| | 2 | | 8 | | 15 | | 22 | | 29 | | |
| | MRS | M17 | MRS | M17 | MRS | M17 | MRS | M17 | MRS | M17 | |
| Pingo | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 |
| Rala | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 |
| Total | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 200 |

Dos 200 isolados somente dois foram classificados como catalase positivos, sendo um obtido do meio MRS com 15 dias de maturação oriundo do queijo fabricado com “pingo” e um isolado obtido do meio M17 do queijo fabricado com “rala” com 8 dias de maturação (material complementar). De acordo com a morfologia celular os isolados foram divididos em cocos (56,50 %) e bacilos (43,50 %) (material complementar), e todos foram considerados para as análises posteriores.

3.2. Capacidade de acidificação

A capacidade de acidificação dos isolados após 6 horas de incubação levou à classificação desses em três grupos (PSONI et al., 2007): classe I (alta capacidade de acidificação, com um decréscimo do pH em duas unidades ou mais); classe II (capacidade de acidificação média, com decréscimo do pH variando entre 1,5 e 1,9 unidades) e classe III (baixa capacidade de acidificação, com decréscimo do pH inferior a 1,5 unidades (TABELA 2).

Tabela 2. Número de isolados (M17 e MRS) obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala”, classificados como alta capacidade de acidificação (classe I), média capacidade de acidificação (classe II) e baixa capacidade de acidificação (classe III) ao longo de 29 dias de maturação

| Meio de isolamento | Tipo de queijo | Tempo de maturação (dias) | Número de isolados | | |
|--------------------|----------------|---------------------------|--------------------|-----------|------------|
| | | | Classe I | Classe II | Classe III |
| M17 | Pingo | 2 | 9 | - | 1 |
| | | 8 | - | 3 | 7 |
| | | 15 | - | - | 10 |
| | | 22 | - | - | 10 |
| | | 29 | - | - | 10 |
| | Rala | 2 | - | 6 | 4 |
| | | 8 | - | 1 | 9 |
| | | 15 | - | - | 10 |
| | | 22 | - | - | 10 |
| | | 29 | - | - | 10 |
| MRS | Pingo | 2 | 6 | 4 | - |
| | | 8 | 8 | 2 | - |
| | | 15 | - | - | 10 |
| | | 22 | - | - | 10 |
| | | 29 | - | - | 10 |
| | Rala | 2 | - | 3 | 7 |
| | | 8 | - | 2 | 8 |
| | | 15 | - | - | 10 |
| | | 22 | - | - | 10 |
| | | 29 | - | - | 10 |

A produção de ácido durante a fermentação do leite é crucial para a fabricação dos QMA e a taxa de acidificação irá depender de fatores como estocagem do leite, temperatura em que ocorre a fermentação e principalmente características das bactérias presentes no fermento utilizado

(MARTINS et al., 2014; MONTEL et al., 2014).

Os isolados obtidos dos queijos com 2 dias de fabricação foram aqueles que apresentaram maior capacidade acidificante. Nesse período a maioria dos isolados obtidos do queijo fabricado com “pingo” foram classificados como alta capacidade de acidificação, sendo que os isolados coletados nesse mesmo período a partir do queijo fabricado com a “rala” apresentaram menor capacidade de produzir ácido.

Após 8 dias de maturação os isolados que apresentaram maior capacidade de produzir ácido foram aqueles obtidos do queijo fabricado com “pingo” e a partir do meio MRS. Já os isolados obtidos do meio M17 nesse mesmo período para esses queijos apresentaram em sua maioria baixa capacidade de produção. Os isolados do queijo fabricado com a “rala” nesse período para ambos os meios foram classificados como média e baixa capacidade acidificante.

No início da fabricação dos QMA há uma predominância de bactérias “*starters*” ou fermentadoras que realizam o desdobramento da lactose com a produção de ácido láctico, processo esse importante dentre outros, para a inibição de micro-organismos patogênicos (DELORME, 2008). Além disso, a diminuição inicial do pH devido à presença de ácido ajusta o meio para a multiplicação de bactérias que irão predominar durante a maturação e que são responsáveis por diversos processos bioquímicos como lipólise e proteólise (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

Após 2 e 8 dias de maturação os isolados obtidos do QMA fabricado com “pingo” apresentaram uma maior capacidade de acidificação quando comparado com os isolados obtidos do queijo fabricado com a “rala”. Nenhum isolado obtido do queijo fabricado com esse fermento apresentou alta capacidade de produzir ácido. Essa situação pode estar relacionada às características das estirpes predominantes em cada tipo de fermento utilizado, que conseqüentemente predominarão nos queijos no início de sua elaboração e nos primeiros dias de maturação.

O “pingo” apresenta um balanço adequado de BAL *startes* quanto *non-starter lactic acid bactéria (NSLAB)*. (DORES e FERREIRA, 2012). As bactérias *starters* são as responsáveis pela redução inicial do pH do leite devido a maior e mais rápida produção de ácido e são representadas

basicamente pelos gêneros *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e a espécie *Streptococcus thermophilus* (ROBINSON, 2002). Já a “rala”, por ser oriunda do próprio queijo ralado e maduro (aproximadamente 8 dias), apresenta uma maior quantidade de bactérias *NSLAB*, que predominam nessa fase de maturação atuando com enzimas como proteases, peptidases e lipases sendo representadas principalmente pelos gêneros *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp e *Pediococcus* spp. (BROADBENT et al., 2016; SETTANNI e MOSCHETTI, 2010). Algumas dessas espécies não apresentam a característica de produzirem grande quantidade de ácido no meio.

O queijo fabricado com o “pingo” por apresentar uma predominância de bactérias com alta capacidade de produzir ácido pode apresentar maior eficiência na eliminação de micro-organismos indesejáveis em sua fase inicial de produção e maturação. A produção de ácido por esses isolados contribui para a segurança microbiológica desses queijos tanto em função da diminuição do pH, já que determinados micro-organismos patogênicos são sensíveis à baixos valores deste (ANDRADE, 2008), tanto devido a presença do ácido produzido e presente na forma não dissociada que depende por sua vez do pH do meio (JAY, 2005). A inibição do crescimento microbiano por ácidos fracos tem sido atribuída a várias causas como rompimento de membranas, estresse associado ao pH intracelular e acúmulo de ânions tóxicos (ADAMS, 1999). Além disso, a presença de bactérias com essa característica contribui para uma mais rápida coagulação do QMA durante a fermentação.

Os isolados obtidos de ambos os queijos e ambos os meios (MRS e M17) a partir do décimo quinto dia de maturação foram classificados como baixa capacidade acidificante. Esse fato já era esperado devido à predominância de bactérias maturadoras (*NSLAB*) presentes nessa fase.

Comparando-se os isolados obtidos em diferentes meios de cultura, podemos observar que no queijo fabricado com o “pingo” houve uma modificação na capacidade dos isolados em produzir ácido após 2 e 8 dias. Com dois dias de fabricação observa-se que as bactérias com alta capacidade de acidificação foram àquelas obtidas do meio M17, e com o passar do tempo, ou seja, após 8 dias de maturação, quem apresentou essa

característica foram aqueles isolados a partir do meio MRS. Isso pode ser explicado pelas características de BAL selecionadas em cada meio de cultura e em cada período. O meio MRS seleciona preferencialmente BAL classificadas como bacilos, já o M17 aquelas classificadas como cocos (ASHRAF e SHAH, 2011). No início da fabricação dos QMA houve uma predominância de cocos com alta capacidade de acidificação por apresentarem capacidade de desdobrar a lactose em meio básico (pH do leite) (DIEZHANDINO et al., 2015; HASSAN e FRANK, 2001). Após 8 dias de fabricação esse processo se inverte, e observa-se uma maior capacidade de produzir ácido pelos isolados obtidos do meio MRS, ou seja, possíveis bacilos, por serem capazes de desdobrar a lactose em meios com valores de pH mais baixo (DIEZHANDINO et al., 2015; HASSAN e FRANK, 2001; PICON et al., 2016), momento em que foram coletados nos queijos. Ao mesmo tempo, nesse período, os isolados obtidos a partir do meio M17 não apresentaram essa característica.

3.3. Produção de exopolissacarídeos

Apenas 6 dos 200 isolados obtidos foram capazes de produzir exopolissacarídeo (EPS) (FIGURA 1), ambos oriundos a partir do meio MRS e do queijo fabricado com “pingo” (TABELA 3).



Figura 1. Produção de exopolissacarídeo (EPS) pelos isolados obtidos do queijo Minas artesanal do Serro-MG.

Tabela 3. Relação dos isolados obtidos do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” com resultado positivo para a produção de exopolissacarídeo

| Isolado | Meio de isolamento | Característica do isolado |
|----------------|---------------------------|----------------------------------|
| P1T2-1* | MRS | bacilo, gram positivo |
| P1T2-3 | MRS | coco, gram positivo |
| P1 T8-3 | MRS | bacilo, gram positivo |
| P1 T15-5 | MRS | bacilo, gram positivo |
| P1 T22-3 | MRS | bacilo, gram positivo |
| P1 T 29-3 | MRS | bacilo, gram positivo |

*identificação do isolado; P: identificação do produtor; T: período de maturação (dias);

Dados sobre isolados de BAL produtoras de EPS oriundos de QMA são escassos na literatura. Dertli et al. (2016) analisaram 47 cepas de BAL oriundas de trigo turco e verificaram que todas apresentavam o gene para a produção de EPS. Já Dal Bello et al. (2012) não encontrou nenhuma bactéria produtora de EPS das 20 BAL obtidas de produtos fermentados.

EPS são secretados pelas células bacterianas formando uma camada protetora que pode auxiliar na adesão da célula a superfícies, a concentrar nutrientes, evitar a dessecação, evitar o contato com o hospedeiro, proteger contra moléculas tóxicas, além de possuir função de proteção em ambientes naturais contra a fagocitose, ação de antibióticos ou condições adversas como, por exemplo, o estresse osmótico. (DENNY, 1995).

O ambiente natural das BAL ao longo do processamento e maturação dos QMA favorece a produção de EPS devido a presença de elevadas concentrações de NaCl. A presença de bactérias com essa característica no queijo fabricado com “pingo” ao longo de toda a maturação é um fator importante que confere a elas sobrevivência. Esse aspecto pode ainda conferir uma segurança adicional a esses queijos, pois essas bactérias podem se sobressair no meio, ao mesmo tempo em que, outras indesejáveis que não apresentam essa característica sejam eliminadas.

Além disso, quando devidamente identificadas e caracterizadas, essas culturas poderiam ser utilizadas na fabricação de queijos (CAGNO et al., 2014; NEPONUCENO et al., 2016) e iogurtes (GENTÈS et al., 2016),

melhorando textura e funcionalidade.

Embora a produção de EPS seja facilmente encontrada em diferentes espécies microbianas, a utilização de espécies isoladas e utilizadas em ambientes semelhantes ao seu natural e com ausência de características patogênicas, pode ser uma alternativa interessante. Além da melhoria de propriedades como viscosidade, textura e brilho haverá também a agregação de valor ao produto, já que a presença de EPS dispensa o uso de estabilizantes, emulsificantes, texturizantes, geleificantes e outros aditivos não naturais.

3.4. Produção de diacetil

A capacidade de produzir diacetil foi observada pela formação de um halo lilás na superfície no tubo (FIGURA 2).

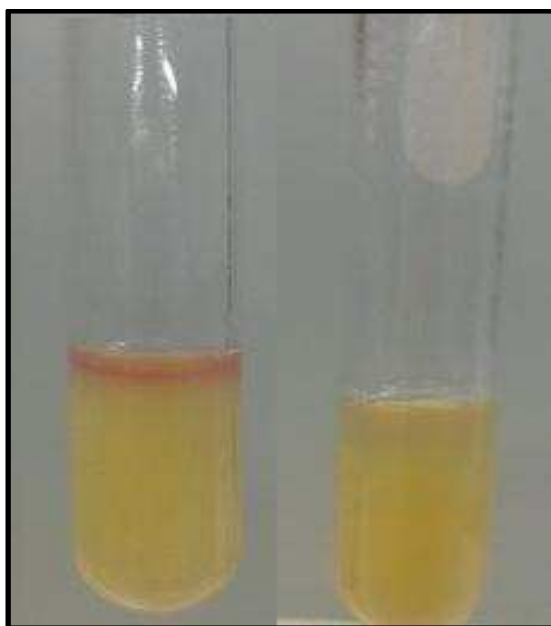


Figura 2. Presença e ausência de produção de diacetil pelos isolados de queijo Minas artesanal do Serro-MG.

Dos 200 isolados 66 % daqueles oriundos do queijo fabricado com a “rala” produziram diacetil, enquanto somente 25 % dos isolados do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram essa capacidade (TABELA 4).

Tabela 4. Relação do número de isolados (MRS e M17) obtidos dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com resultado positivo para produção de diacetil ao longo de 29 dias de maturação

| Tipo de Queijo | Período de maturação (dias) | Número de isolados* | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------|-----------|
| | | MRS | M17 |
| Pingo | 2 | 0 | 2 |
| | 8 | 0 | 4 |
| | 15 | 1 | 6 |
| | 22 | 2 | 6 |
| | 29 | 1 | 3 |
| | Total | 4 | 21 |
| Rala | 2 | 5 | 8 |
| | 8 | 8 | 10 |
| | 15 | 8 | 10 |
| | 22 | 1 | 10 |
| | 29 | 3 | 3 |
| | Total | 25 | 41 |
| Total Geral | | 29 | 62 |

A capacidade de produzir diacetil foi observada por grande parte dos isolados obtidos (45,5 %), entretanto, a maioria desses oriundos do queijo fabricado com a “rala” e a partir do meio M17. Esse fenômeno pode ser novamente explicado pela diferença qualitativa e quantitativa das bactérias predominantes em cada tipo de fermento utilizado, que conseqüentemente predominarão durante a fabricação dos queijos e ao longo de sua maturação. As bactérias *NSLAB* ou maturadoras predominantes no fermento tipo “rala” são as principais responsáveis pela produção de diacetil no meio, sendo que, a maioria dos isolados obtidos do queijo fabricado com esse fermento apresentou essa característica.

Um maior número de isolados com produção de diacetil também foi observado quando obtidos a partir do meio M17. Como já mencionado no teste de produção de acidez, refere-se a um meio mais seletivo para o isolamento de cocos, onde os gêneros *Streptococcus* spp, *Leuconostoc* spp., e *Pediococcus* spp. são geralmente os principais responsáveis pela produção desse composto (JAY, 1982).

Independente do tipo de queijo analisado, após dois dias de fabricação, observa-se uma menor quantidade de isolados que

apresentaram essa característica devido à predominância nessa fase de bactérias *starters*. Como esperado, à medida que se aumentou o período de maturação dos queijos, observa-se um aumento no número de bactérias com a produção desse composto, devido à predominância de bactérias *NSLAB* em fases mais avançadas da maturação (BROADBENT et al., 2016). A produção de diacetil trata-se de um mecanismo de defesa da bactéria, onde na presença de citrato, além da outra fonte de energia como a lactose, produz-se quantidade elevada de ácido pirúvico, sendo tóxico para a célula bacteriana quando em excesso. Dessa forma, a célula o transforma em compostos neutros como o diacetil, um dos compostos responsáveis pelo aroma e sabor dos QMA (WALSTRA et al., 2002).

Além de conferir características sensoriais peculiares aos queijos artesanais, o diacetil apresenta atividade antimicrobiana já demonstrada em estudos envolvendo diferentes micro-organismos (LANCIOTTI et al., 2003; LANGA et al., 2014; PIARD e DESMAZEAUD, 1991). A sensibilidade de diferentes bactérias ao diacetil foi testada a partir de preparações de três fontes comerciais deste composto, sendo os resultados encontrados para ambas as formulações semelhantes quando testadas contra um conjunto de 28 culturas, incluindo 10 bactérias do ácido láctico, 4 leveduras e 14 bactérias gram negativas. O composto mostrou-se eficaz a um pH inferior ou igual a 7,0 e progressivamente ineficaz a um pH superior a este valor, apresentando ainda melhor atividade antimicrobiana entre as temperaturas de 10 - 20 °C, sendo ineficiente à 37 °C. As bactérias do ácido láctico não foram praticamente afetadas pela concentração entre 100 e 350 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de diacetil em pH na faixa de 5,0 a 7,0. Três leveduras e 13 bactérias gram negativas que cresceram em pH 5,5 foram inibidas por 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de diacetil (JAY, 1982).

Dessa forma, a produção de diacetil por BAL presentes nos QMA além de conferir sabor e aroma característicos ao produto, mostra-se um fator adicional na segurança microbiológica desses, já que, durante a fabricação desses queijos e ao longo de sua maturação esses compostos são produzidos em faixas de pH ($\text{pH} < 7$) e temperaturas (10 – 20 °C) favoráveis para sua atuação de acordo com o observado no estudo anterior, podendo afetar em grande parte bactérias indesejáveis.

3.5. Tolerância ao NaCl

Devido a falta de padronização ao longo da fabricação dos QMA na região do Serro, existe uma grande variação na concentração de sal encontrados na literatura que variam de 0,8 a 4 % (MACHADO et al., 2004; MATA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013).

Todos os isolados obtidos a partir do meio MRS e M17, tanto os provenientes do queijo fabricado com “pingo” quanto com a “rala” foram capazes de crescer nas concentrações de NaCl (2 e 6 % m/v) analisadas, entretanto, a densidade ótica (OD 650 nm) diminuiu com o aumento da concentração do sal (NaCl 6 %), mostrando um menor crescimento dos isolados no meio mais concentrado. Os isolados obtidos do meio M17 apresentaram uma menor a densidade ótica (OD 650 nm) em todas as concentrações de NaCl utilizadas, quando comparados com os isolados obtidos do meio MRS. Em geral as BAL são consideradas resistentes a ambientes salinos, podendo multiplicar em concentrações de até 6,5 % dependendo da espécie (CABELLI et al., 1979; EMBRAPA, 2009; OSTROLENK et al., 1947).

Assim como para a produção de exopolissacarídeos, a resistência das BAL a condições salinas é um aspecto que pode conferir uma segurança adicional aos QMA, pois essas bactérias se sobressaem no meio, ao mesmo tempo em que outras indesejáveis que não apresentam essa característica são eliminadas.

3.6. Atividade antimicrobiana

Para se avaliar a capacidade inibitória dos isolados de QMA frente aos micro-organismos patogênicos, observou-se a formação de halos de inibição bem definidos ao redor das cepas das BAL isoladas, e sua presença foi relacionada com a capacidade de inibição direta no micro-organismo indicador testado (FIGURA 3). Os micro-organismos patogênicos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), (TABELA 5).

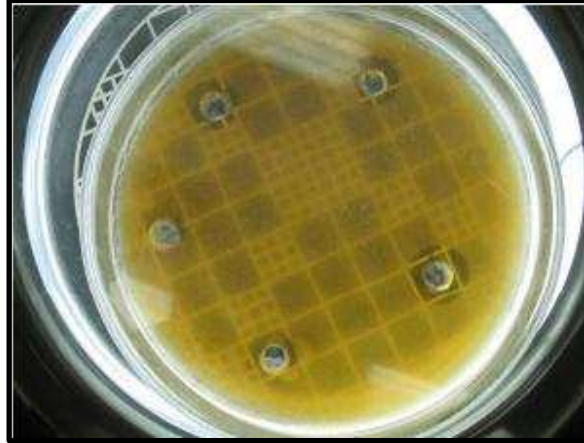


Figura 3. Formação de halo no teste de antagonismo frente aos patógenos analisados.

Analisando-se os isolados oriundos do meio MRS frente aos patógenos testados observa-se que *S. aureus* foi inibido por 77 % dos isolados obtidos, sendo 42 oriundos do queijo fabricado com “pingo” e 35 do queijo fabricado com a “rala”. *E. coli* foi inibida por grande parte dos isolados (81 %), sendo 35 provenientes do queijo fabricado com “pingo” e 46 do fabricado com a “rala”. Resultados semelhantes foram observados por Dias (2014), onde grande maioria das BAL testadas quanto à atividade antimicrobiana foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* (82,89 %) e *E. coli* (88,15 %).

Com relação à atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, 81 % dos isolados apresentaram essa atividade, sendo semelhante para os queijos fabricados com os diferentes fermentos. Resultado próximo foi encontrado por Tamanini et al. (2012), que avaliaram a atividade antagonista de 671 BAL isoladas de leite cru, onde 81,8 % apresentaram inibição frente a esse patógeno.

Uma menor inibição foi observada frente à *S. enteritidis* (26 %) (TABELA 5).

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos isolados (MRS) de QMA fabricados com “pingo” e “rala” frente aos micro-organismos patogênicos

| Tipo de queijo | Micro-organismo patogênico | Percentual do antagonismo |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| pingo | <i>S. aureus</i> | 84 % |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 80 % |
| | <i>E. coli</i> | 70 % |
| | <i>S. enteritidis</i> | 36 % |
| Rala | <i>S. aureus</i> | 70 % |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 84 % |
| | <i>E. coli</i> | 92 % |
| | <i>S. enteritidis</i> | 20 % |

Isolados oriundos do meio M17 a atividade antimicrobiana foi menor frente a todos os patógenos testados. *L. monocytogenes* foi o patógeno mais inibido pelos isolados obtidos desse meio, onde 84 % e 42 % dos isolados dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” apresentaram essa inibição respectivamente. Apenas 42 % dos isolados (31 do queijo fabricado com “pingo” e 11 do queijo fabricado com a “rala”) apresentaram antagonismo frente *E. coli*. Nenhum isolado foi capaz de inibir *S. enteritidis* (TABELA 6).

Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos isolados (M17) de QMA fabricados com “pingo” e “rala” frente aos micro-organismos patogênicos

| Tipo de queijo | Micro-organismo patogênico | Percentual do antagonismo |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Pingo | <i>S. aureus</i> | 62 % |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 84 % |
| | <i>E. coli</i> | 62 % |
| | <i>S. enteritidis</i> | 0 % |
| Rala | <i>S. aureus</i> | 28 % |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 42 % |
| | <i>E. coli</i> | 22 % |

Os isolados obtidos dos QMA fabricados com “pingo” e “rala” mostraram-se mais eficientes na inibição frente aos micro-organismos patogênicos quando comparados com alguns estudos já realizados. Prado et al. (2000), ao testarem a atividade inibitória direta de cepas de bactérias lácticas isoladas de embutidos cárneos, observaram que das 336 cepas isoladas, somente 40 (11,9 %) inibiram cepas de *L. monocytogenes*. Dabéset et al. (2001) encontraram resultados semelhantes, 13,5 %, enquanto que Coventry et al. (1997) observaram que 13 % das cepas isoladas de produtos cárneos inibiram o crescimento do *S. aureus* e 25 % das cepas originárias de produtos lácteos conseguiram essa inibição.

Os diâmetros dos halos de inibição mensurados nesse estudo variaram de 4 a 18 mm, corroborando com os resultados encontrados na literatura. Alguns desses estudos avaliaram a atividade antagonista de bactérias lácticas frente a micro-organismos patogênicos. Poppi et al. (2008) analisaram a atividade antagonista de diferentes espécies de *Lactobacillus* spp. sobre *L. monocytogenes* onde observaram a formação de áreas de inibição variando de 9,0 a 13,5 mm de diâmetro. Chioda et al. (2007) observaram a inibição de *E. coli* por todas as cepas de *Lactobacillus acidophilus* testadas pela presença de halos variando de 9,0 a 15,0 mm de diâmetro. Por sua vez, Pereira e Gómez (2007) avaliaram a ação de *Lactobacillus acidophilus* sobre *E. coli* e *S. aureus* ocasionando o aparecimento de halos de inibição de 14,75 e 15,0 mm de diâmetro respectivamente. Também, Costa et al. (2012) observaram halos de inibição variando entre 23,0 e 29,0 mm formados por ação de *Lactobacillus acidophilus* frente a *S. aureus* e *E. coli*.

No presente estudo não foi avaliada a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas lácticas, porém, as atividades inibitórias podem ser verificadas pela observação dos halos de inibição formados frente aos patógenos, indicando a possibilidade de produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil, acetaldeído, peróxido de hidrogênio, ou outras substâncias inibidoras de crescimento.

De maneira geral, os isolados obtidos a partir do queijo fabricado com “pingo” apresentaram melhor desempenho no antagonismo dos micro-organismos patogênicos testados. Esse resultado pode ser oriundo da maior

capacidade de produzir ácido eliminando dessa forma os patógenos e também da produção de compostos de defesa própria (EPS) e resistência a condições adversas (alta concentração salina), que são responsáveis pela sua predominância do meio, competindo com os indesejáveis que possam estar presentes.

A atividade antimicrobiana por bacteriocinas, em geral, são uma das opções para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos. Após seleção e identificação dos isolados obtidos e determinação dos produtores de bacteriocinas, esses ainda podem ser aplicados na preservação de alimentos, ajudando na redução de conservantes químicos, resultando em produtos naturalmente preservados e ricos em propriedades sensoriais e nutricionais.

4. CONCLUSÃO

Os isolados obtidos dos queijos fabricados com os diferentes tipos de fermentos apresentaram características fenotípicas diferentes que podem influenciar na qualidade, tempo de maturação e segurança microbiológica dos QMA. Os isolados obtidos do queijo fabricado com o “pingo” apresentaram maior capacidade de acidificação que aliada a produção de compostos de defesa (EPS) e a resistência a elevadas concentrações de NaCl, tornam-se características essenciais para a sobrevivência e eliminação de micro-organismos indesejáveis.

A exploração de bactérias selvagens de ambientes ecológicos naturais, como é o caso desses queijos, é uma abordagem inovadora para a descoberta de estirpes que expressem fenótipos de interesse na indústria de produtos fermentados, uma vez que a descaracterização do produto artesanal pode levar a extinção do mesmo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A. **Nutricines. Food components in Health and Nutrition.** Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 400p.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

BROADBENT, J. R.; BUDINICH, M. F.; STEELE, J. L. Cheese: NSLB. **Reference Module in Food Science**, p. 639-644, 2016.

CABELLI, V. J.; DUFOUR, A. P.; LEVIN, M. A.; MCCABE, L. J.; HABERMAN, P. W. Byappanahalli et al. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. **American Journal of Public Health**, v. 69, p. 690-696, 1979.

CASALTA, E.; SORBA, J. M.; AIGLE, M.; OGIER, J. C. 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.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; PIGATTO, C. P.; RIBEIRO, C. A. M.; RAGAZZANI, A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

COGAN, T. M. History and taxonomy of starter cultures. **Dairy Starter**

Cultures, p. 1–23, 1996.

COSTA, G. N.; SUGUIMOTO, H. H.; MIGLIORANZA, L. H. S.; GOMEZ, R. J. H. C. Atividade Antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro”. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.

CAGNO, R. D.; PASQUALE, I.; ANGELIS, M.; BUCHIN, S.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Use of microparticulated whey protein concentrate, exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*, and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 72-84, 2014.

COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 248-258, 1997

DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 53, p. 136-140, 2001.

DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 58-65, 2012.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophiles*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 274-277, 2008.

DENNY, T. P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 173-97, 1995.

DERTLI, E.; MERCAN, E.; ARLICI, M.; YLMAZ, M. T. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. **Food Science and Technology**, v. 71, p. 116-124, 2016.

DIAS, G. M. P. **Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa - Pernambuco**. Recife: UFPE, 2014. 114p. Tese de doutorado em Ciência Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, 2014.

DIEZHANDINO, I.; FERNÁNDEZ, D.; GONZÁLEZ, A.; MCSWEENEY, P. L. H.; FRESNO, J.M. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry**, v. 168, p. 134-141, 2015.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, p. 26-34, 2012.

EL GALIOU, O.; ZANTAR, S.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A. Lipolysis and proteolysis during the ripening of fresh moroccan goats' milk cheese. **Journal of Dairy e Food Science**, v 8, p. 201-206, 2013.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Fortaleza, CE. 2009. 29p.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; FRANCESCO, V. Maciacular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, v. 26, p. 228-231, 2009.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an 891 isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. **Applied Microbiology**, n. 30, v. 6, p. 892-1040, 1975.

FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNASKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 3-11, 2009.

GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNTEZ, M. Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes'milk, **Journal of Applied Microbiology**, v. 62, p. 321-326, 1987.

GENTÈS, M. C.; TURGEON, S.; GELAIS, D. Impact of starch and exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on the properties of set and stirred yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 55, p.79-86, 2016.

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

HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. **Anaerobe Laboratory Manual**. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, USA, 1987, 908 167p.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002. **Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal**. Disponível em: < <http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acessado em: 01 de junho de 2016.

JAY, J. M. Antimicrobial activity of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 525-532, 1982.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

KING, N. Modifications of the Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. **Dairy Industry** n. 13, p. 800, 1948.

LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food microbiology**, v. 20, n. 5, p. 537-543, 2003.

LANGA, S.; CABREJAS, M.; MONTIEL, R.; LANDETE, J. M.; MEDINA, M.; ARQUÉS, J. L. **Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens**. Journal of Dairy Science, v. 97, n. 9, p. 6116-6121, 2014.

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

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2004.

MAYO, B. **Dairy Lactococci. Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food**, p. 191 - 194, 2010.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2014.

MASOUD, W.; TAKAMIYA, M.; VOGENSEN, F. K.; LILLEVANG, S.; ABU AL-SOUD, W.; SORENSEN, S. J.; JAKOBSEN, M. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing, **International Dairy Journal**, v. 21, p. 142-148, 2011.

MATAA, G. M. S. C.; MARTINS, E.; MACHADO, S. G.; PINTO, M. S.;

CARVALHO, A. F.; VANETTI, M. C. D. Performance of two alternative methods for *Listeria* detection throughout Serro Minas cheese ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 47, p. 749-756.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 01 de junho de 2016.

MORANDI, S., BRASCA, M., LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. **Dairy Science and Technology**, n. 91, p. 341-359, 2011.

NEPONUCENO, R. S. C.; JUNIOR, L. C. G. C.; COSTA, R. G. B. Exopolysaccharide-producing culture in the manufacture of Prato cheese. **Food Science and Technology**, v. 72, p. 383-389, 2016.

NESPOLO, C. R.; BRANDELLI, A. Production of bacteriocin like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.1009-1018, 2010.

O'BRYAN, C. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; NDAHETUVE, J.B. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, v.16, p. 117-136, 2015.

OLIVEIRA, D. F.; CRIVELLARI, M. A.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Caracterização físico-química de queijos minas artesanais produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Economia Doméstica**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013.

OSTROLENK, M.; KRAMER, N.; CLEVERDON, R. C. Comparative studies

of enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. **Journal of Bacteriology**, v. 53, p. 197-203, 1947.

PEREIRA, V. G.; GOMÉZ, R. J. H. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria-1. Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

PICON, A.; GARDE, S.; AVILA, M.; NUNEZ, M. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. **International Dairy Journal**, v. 58, p. 14-22, 2016.

POPPI, L. B.; MANCILHA, I. M.; FERREIRA, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.113-119, 2008.

PRADO, C. S.; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C. R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de embutidos cárneos frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 417-423, 2000.

PSONI, L.; KOTZAMANIDES, C.; YIANGOU, M.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKIS, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, n. 114, p. 211–220, 2007.

RIBEREAU-GAYON, P.; DUBOUDIEU, D.; DONECHE, B.; LONVAUD, A. **Tratado de enologia**. Microbiologia del vino. Zagarosa, Espanha: MP Ediciones, 2003.

ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products**, 3. ed., 2002.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**. v. 27, p. 691-697, 2010.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; ANGELA, H. L.; YAMADA, A. K.; BATTAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A. A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, 2012.

TORMO, H.; AGABRIEL, C.; LOPEZ, C.; LEKHAL, D. H. A.; ROQUES, C. Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. **International Journal of Dairy Science**, v. 6, p. 13-28, 2011.

TORTORA, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Porto Alegre. Artmed Editora, 6^a edição. 2000. 827p.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. **Dairy technology. Principles of milk farm units and processes**. Marcel Dekker, 412p. 2002.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, FÍSICOS, PROTEÓLISE E TEXTURA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL FABRICADO COM PINGO E RALA AO LONGO DA MATURAÇÃO

Resumo

Este estudo avaliou a influência do tipo de fermento endógeno utilizado na fabricação de queijo Minas artesanal (QMA) do Serro-MG sobre as características físico-químicas, físicas, características de textura e de proteólise ao longo de 60 dias maturação. Foram analisados queijos oriundos de 12 unidades produtoras, onde 4 utilizaram o fermento tradicional “pingo” e 8 a “rala” em sua fabricação. Para as variáveis pH, atividade de água e cloretos não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos produzidos com “pingo” e “rala” em cada período de maturação analisado. As principais diferenças observadas foram com relação à acidez, umidade, textura, cor e índice de maturação. A acidez e a umidade dos queijos apresentaram diferença ($p < 0,05$) com 2 e 8 dias de maturação, sendo ambas maiores naqueles fabricados com o fermento tradicional (“pingo”). Foi observado um maior índice de proteólise ($p < 0,05$) nos queijos fabricados com “pingo” comparado aos fabricados com a “rala” durante toda a maturação. Em relação à textura, a principal diferença entre os queijos foi com relação aos parâmetros de mastigabilidade e elasticidade (com valores maiores nos queijos fabricados com a “rala”). A cor da casca e massa dos queijos apresentou diferença ($p < 0,05$) em praticamente todas as coordenadas avaliadas, com destaque para as coordenadas *L e b*. A utilização de fermentos distintos modifica a dinâmica da microbiota dos queijos, acarretando dessa forma em produtos com características diferentes, causando uma descaracterização do QMA quando não se utiliza o fermento tradicional.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um produto artesanal e tradicional do estado de Minas Gerais que atualmente é produzido em seis regiões caracterizadas (Serro, Serra da Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes e Triângulo Mineiro), que totalizam uma produção anual de aproximadamente 30 mil toneladas, envolvendo cerca de 10.000 produtores rurais (EMATER, 2015).

O “pingo” utilizado em sua fabricação é o fermento endógeno (FE) que direciona a fermentação dos queijos, sendo definido como o soro fermentado resultante da dessoragem dos queijos já salgados e coletados de um dia para o outro para ser utilizado na produção seguinte (DORES e FERREIRA, 2012).

Esse fermento contém uma série de micro-organismos endógenos, com destaque para as bactérias do ácido láctico (BAL) que direcionam uma fermentação desejável, devido a redução do pH. Além de facilitar a formação da coalhada e conferir segurança aos queijos (COELHO et al., 2014), essas bactérias contribuem para as características finais do produto ao longo de sua maturação, onde envolvem uma série de alterações físicas, físico-químicas e bioquímicas, definindo suas características peculiares. (EL GALIOU et al., 2013; MACEDO et al., 2004; SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

Embora ainda feito artesanalmente, a partir de 2002 (IMA, 2002), uma série de adaptações têm sido sugeridas a fim de adequar a produção dos QMA à legislação brasileira, principalmente no que tange à natureza dos equipamentos utilizados à sua produção, originalmente em madeira e então substituídos por materiais como fibras de vidro, polipropileno, aço inox, dentre outros. No entanto, segundo os produtores, essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem.

Na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, alguns produtores passaram a utilizar o próprio queijo na forma de “rala” como fermento, que consiste em um queijo maturado, produzido em um lote anterior, ralado, substituindo então o “pingo”, resultando agora em

um produto com deessoramento adequado. Embora a implementação da “rala” tenha resolvido o problema tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização de um fermento não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar à alterações em suas características finais.

Dessa forma, esse estudo teve como finalidade verificar o impacto do tipo fermento utilizado nas características físicas, físico-químicas, de textura e proteólise de QMA produzidos na região do Serro – MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e condições de maturação dos queijos

Foram estudadas 12 unidades produtoras de queijo Minas artesanal (QMA) cadastradas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizadas na região do Serro-MG, onde 4 utilizaram o “pingo” e 8 utilizaram a “rala” como fermento endógeno na fabricação dos queijos. A produção ocorreu no período da seca (julho). Sete queijos oriundos do mesmo dia de fabricação de cada propriedade foram coletados após dois dias de fabricação, ao completar a salga, totalizando 84 unidades experimentais. Um queijo de cada produtor foi analisado no dia da coleta e os demais foram maturados na condição ambiente (23 – 25 °C e UR 62 %), sem embalagem e em prateleiras de madeira ao longo de 60 dias, reproduzindo-se as condições de maturação desses queijos nas propriedades de origem. Nos dias 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação um queijo de cada propriedade foi submetido às análises. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 611.817).

2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras foram analisadas para determinação da acidez titulável, gordura, umidade e cloretos (BRASIL, 2006).

A determinação do teor de gordura no extrato seco foi realizada de modo indireto, por meio da razão entre o teor de gordura e o teor de extrato seco total do queijo (PEREIRA et al. 2001).

As análises de nitrogênio total (NT), proteína total (PT), nitrogênio solúvel (NS) em pH 4,6 e NS em TCA 12 % (m/v) foram determinadas pelo método Kjeldhal, segundo a técnica descrita pela International Dairy Federation 20b (IDF -FIL, 1993). A extensão de maturação (EM) e profundidade de maturação (PM) foi calculada indiretamente (WOLFSCHOONPOMBO, 1983).

O pH (APHA, 1985) dos queijos foi medido utilizando o medidor de pH digital portátil da marca Tecnal, modelo pH Meter-102 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). A atividade de água (a_w) foi determinada utilizando-se medidor digital Aqualab (Decagon 3TE, Decagon Dewires Inc., USA).

2.3. ANÁLISES FÍSICAS

2.3.1. Altura e diâmetro

A altura e o diâmetro foram medidos momentos antes das análises sendo quantificados com auxílio de um paquímetro (FORTGPRO-FG8330).

2.3.2. Análise colorimétrica

A determinação da cor instrumental foi realizada em colorímetro Konica Minolta, modelo CECF-9, utilizando o sistema CIELAB - CIE, 1986 (PATHARE et al., 2013).

2.4. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)

Para a realização da análise do perfil de textura (TPA) (AWAD, 2006) foi utilizado o aparelho Universal de Testes Instron (Modelo 3367, Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA).

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa SigmaPlot

v.11, no qual foi realizado o teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala”

A acidez titulável e o pH dos queijos aumentou ao longo do período de maturação, independentemente do tipo de fermento utilizado em sua fabricação (TABELA 1).

Tabela 1. Média da acidez titulável (% ácido láctico) e pH das amostras de queijo Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação

| Parâmetro | Fermento utilizado* | Período de maturação (dias) | | | | | | |
|------------------|---------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 2 | 8 | 15 | 22 | 29 | 36 | 60 |
| Acidez titulável | Pingo | 0,69a | 0,76a | 0,78a | 0,89a | 0,91a | 1,03a | 1,05a |
| | Rala | 0,57b | 0,66b | 0,74a | 0,84a | 0,87a | 0,97a | 1,00a |
| Ph | Pingo | 5,07a | 4,98a | 5,17a | 5,34a | 5,41a | 5,28a | 5,44a |
| | Rala | 4,99a | 4,92a | 5,11a | 5,43a | 5,28a | 5,32a | 5,57a |

*fermento utilizado na fabricação dos queijos Minas artesanal; médias seguidas pela mesma letra em cada coluna para cada parâmetro não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) quando comparadas pelo teste t de Student;

Os valores de acidez estão de acordo com aqueles normalmente encontrados nos queijos dessa região fabricados com “pingo” (MARTINS, et al. 2014; PINTO et al, 2011). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de acidez dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” somente com 2 e 8 dias de maturação, sendo maior naqueles fabricados com o fermento tradicional (“pingo”).

O aumento na acidez titulável dos queijos ao longo do tempo é

resultante dentre outros motivos da fermentação da lactose por bactérias “*starters*” ou fermentadoras. A maior acidez observada nos queijos fabricados com o “pingo” nos dias 2 e 8 está relacionada com as características da microbiota presente nesse fermento. O “pingo”, por conter predominância de bactérias “*starters*” (LAVASANI et al., 2011; LIMA et al., 2009; MARTINS et al., 2014; SILVA et al., 2011), levou a uma maior e mais rápida produção de ácido láctico no início da fabricação e nos primeiros dias de maturação. A “rala”, pelo fato de ser um fermento coletado a partir de um queijo já maduro (aproximadamente 8 dias de maturação), apresenta uma microbiota distinta do fermento tradicional, com predominância de *Non-starter lactic acid bacteria* (NSLAB) ou bactérias maturadoras, resultando dessa forma na menor quantidade de ácido produzida nos queijos em sua fase inicial e no início de sua maturação. Entre 15 e 60 dias de maturação essa diferença foi eliminada pela predominância de bactérias NSLB em ambos os queijos.

A maior quantidade de ácido presente nos queijos fabricados com o “pingo” pode levar a eliminação de uma maior quantidade de bactérias patogênicas presentes nos queijos nessa fase inicial, seja pela diminuição do pH ou pela presença desse na forma não dissociada, promovendo uma maior segurança desse produto nesse período.

Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) no pH dos queijos produzidos com os diferentes fermentos durante todo o período de maturação. O aumento do pH ao longo do tempo decorre da degradação proteica proveniente da atividade de proteases com formação de compostos alcalinos (BERTOLINO et al., 2011; MARTINS et al., 2014; SALAUN et al., 2005), da síntese de compostos aromáticos como diacetil, oriundos do metabolismo do citrato por bactérias homo e heterofermentativas (RUEDA et al., 1991) e de compostos aminados oriundos da atuação de descarboxilases de origem microbiana sobre diferentes aminoácidos (GLÓRIA, 2005). Os valores de pH do presente estudo foram similares aos encontrados em estudos anteriores realizados com QMA fabricados com “pingo”. Martins et al. (2014) analisaram QMA dessa região durante 64 dias de maturação, com variação do pH entre 4,80 e 5,10. Resultados semelhantes também foram encontrados em QMA do Serro analisados por Figueiredo et al. (2015), que

encontraram valores de pH que variaram de 4,53 a 5,31, e Pinto et al. (2011) com variação de pH entre 4,85 e 5,28 para os queijos com 7 e 60 dias de maturação respectivamente.

A atividade de água (a_w) dos queijos diminuiu com a maturação, não sendo observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” durante todo o período (FIGURA 1).

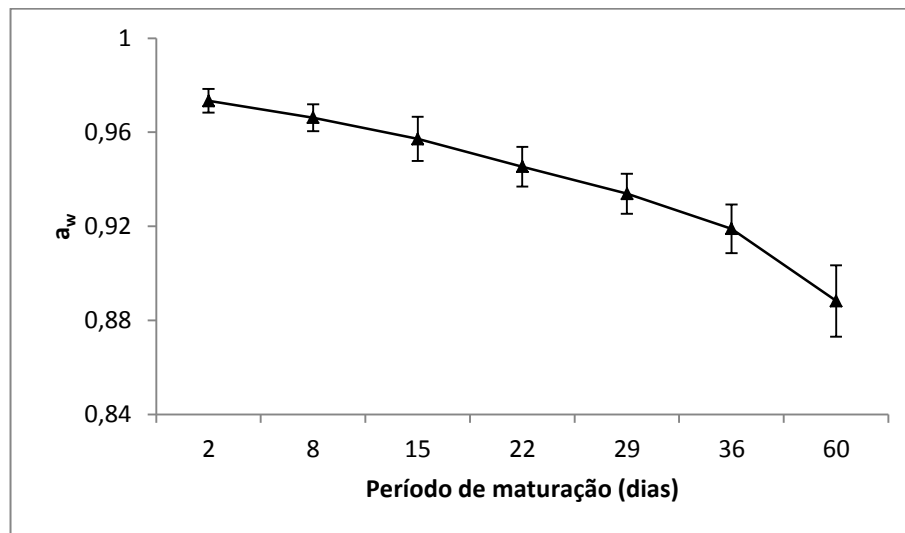


Figura 1. Atividade de água (a_w) dos queijos Minas artesanais ao longo de 60 dias de maturação.

Alguns fatores interferem diretamente na redução da a_w dos queijos como o índice de maturação. Sua influência está relacionada com a presença de aminoácidos oriundos da proteólise, que, devido a presença de cadeias laterais contendo grupos polares, interagem com moléculas de água com facilidade e, conseqüentemente reduzem a a_w (PINTO, et al., 2011).

A redução da a_w ao longo da maturação interfere diretamente na atividade da microbiota do queijo, visto que, quanto menor seu valor, menor será a multiplicação microbiana. Entretanto, os valores encontrados durante toda a maturação não são baixos o suficiente para garantir segurança desse produto, sendo que alimentos com a_w acima de 0,86 permitem o crescimento de algumas formas microbianas, como é o caso de *S. aureus* (ANDRADE, 2008). Resultados similares foram encontrados nos queijos dessa região fabricados com “pingo” por Pinto et al. (2011) no qual foram encontrados valores de a_w que variaram de 0,94 a 0,85 durante um período de 7 a 60

dias de maturação e Figueiredo et al. (2015) com uma média de 0,91 para os QMA com 3 dias de maturação.

Da mesma forma, a umidade dos QMA diminuiu ao longo da maturação, sendo observada diferença ($p < 0,05$) entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” nos tempos 2 e 8 dias (FIGURA 2).

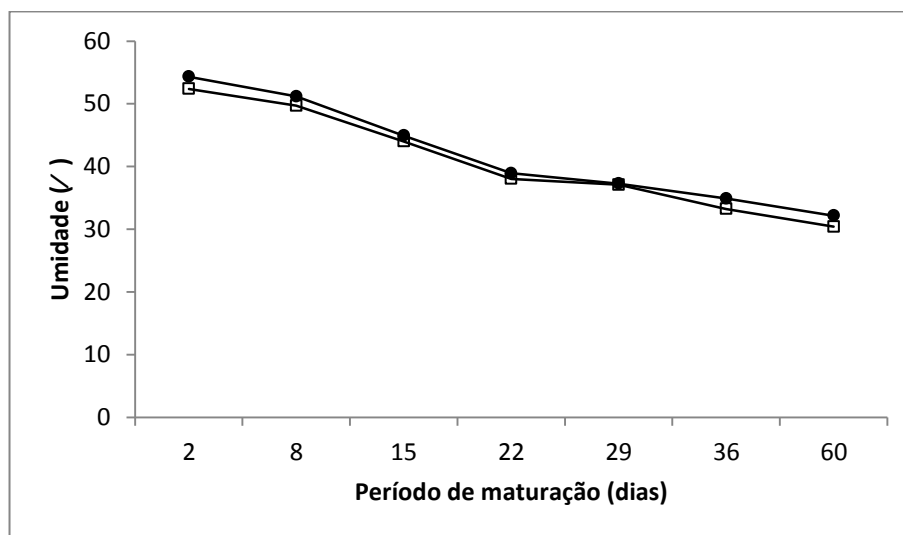


Figura 2. Umidade (%) dos queijos Minas artesanais fabricados com “pingo” (●) e “rala” (□) ao longo de 60 dias de maturação.

Os queijos fabricados com “pingo”, conforme relatado pelos produtores, atualmente apresentam uma textura mais macia no início de sua fabricação, que, segundo eles, é resultado de uma exsudação inadequada. Com essa textura esses queijos não têm sido aceitos pela cooperativa local que faz o intermédio da comercialização. Na tentativa de remediar esta situação, alguns produtores passaram a utilizar a “rala” como fermento, que, resolveu o problema de exsudação do produto, resultando em um queijo mais firme. Essa informação se confirma pelos menores valores de umidade encontrados nos queijos produzidos com a “rala”.

A razão de se obter um produto mais firme ou macio pode relacionar-se a uma exsudação mais ou menos eficiente respectivamente, mas também, ao conteúdo de água presente em cada tipo de fermento adicionado ao leite de produção. A adição do “pingo” ao leite (0,5 % v/v) resulta em um maior conteúdo de água nos queijos fabricados com esse fermento, que constituiu-se de um soro fermentado retirado no momento da

salga que contém cerca de 93 % de água (Valsechi, 2001). Já a “rala”, por constituir de um queijo ralado maturado (com aproximadamente 8 dias), apresenta um maior conteúdo de sólidos totais. Dessa forma, após a fabricação, os queijos fabricados com “pingo” apresentarão maior conteúdo de água e menor conteúdo de sólidos totais, o que resulta em um produto com consistência mais macia, visto que o contrário ocorre com os queijos fabricados com a “rala”.

Com relação à umidade os QMA foram classificados como de alta, média e baixa umidade, ao longo da maturação (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação dos queijos Minas artesanais fabricados com “pingo” e “rala” conforme conteúdo de umidade

| Classificação (umidade) | Queijos fabricados com “pingo” | Queijos fabricados com “rala” | Parâmetro* (<i>S. aureus</i>) |
|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Alta umidade > 45,9 % | 2 e 8 dias de maturação | 2 e 8 dias de maturação | 2 log UFC.g ⁻¹ |
| Média umidade 36 – 45,9 % | 15, 22 e 29 dias de maturação | 15, 22 e 29 dias de maturação | 2 log UFC.g ⁻¹ |
| Baixa umidade até 36 % | 36 e 60 dias de maturação | 36 e 60 dias de maturação | 3 log UFC.g ⁻¹ |

*parâmetro exigido pela legislação (BRASIL, 1996) para a contagem máxima de *S. aureus* permitida em queijos de alta, média e baixa umidade;

A determinação da umidade é importante para a segurança dos QMA, pois as contagens microbiológicas permitidas estão diretamente relacionadas a esse parâmetro e devem atender ao disposto na Lei Estadual/MG nº 14.185/2002 que segue os mesmos padrões da legislação federal (BRASIL, 1996). Os queijos analisados nesse estudo com 2 a 29 dias de maturação devem apresentar de acordo com a legislação contagens de *S. aureus* máxima de 2 log UFC.g⁻¹, se enquadrando nessa situação o QMA maturado por 17 dias, período estipulado pela legislação para comercialização dos queijos dessa região. Martins et al. (2014) também classificou os QMA dessa região fabricados com “pingo” como de média umidade após 17 dias de maturação. Caso esses queijos fossem maturados

por períodos superiores a 29 dias (classificados como de baixa umidade), a contagem de *S. aureus* permitida aumentaria em um log devido a uma maior concentração de bactérias no produto.

Os conteúdos de gordura, cloretos e proteína aumentaram com a maturação (FIGURAS 3, 4 e 5), em função da perda de umidade e consequente aumento na proporção dos constituintes sólidos (FIGUEIREDO et al., 2015; PINTO et al., 2011). Foi observada diferença ($p < 0,05$) entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” para o conteúdo de gordura em todo o período analisado.

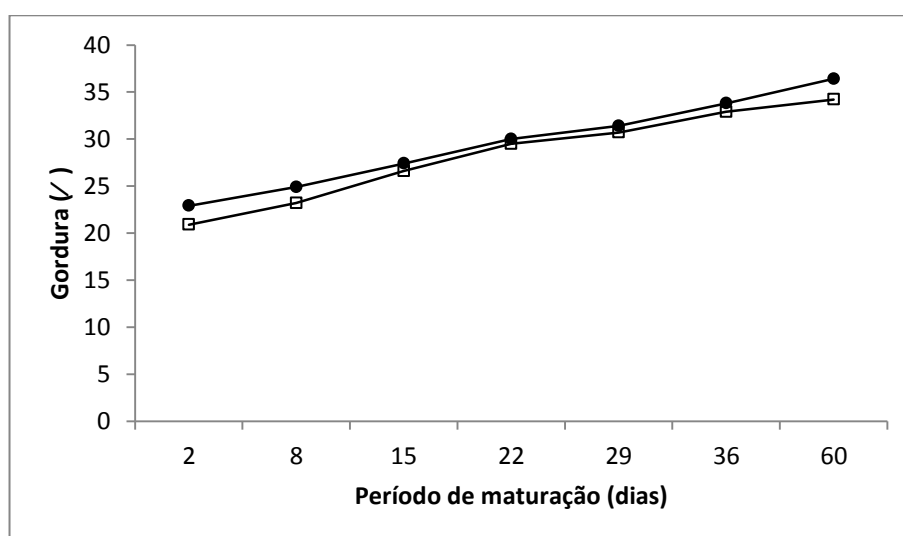


Figura 3. Conteúdo de gordura (%) dos queijos Minas artesanais fabricados com “pingo” (●) e “rala” (□) ao longo de 60 dias de maturação.

Baseado no teor de gordura no extrato seco (GES) que possuem, os queijos também são classificados de acordo com padrões estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1996). Assim, os QMA da região do Serro-MG analisados neste estudo, independentemente do período de maturação e do tipo de fermento utilizado em sua fabricação foram classificados como gordos, com valores médios de GES entre 45 % e 59,9 %.

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) com relação ao teor de cloretos para os queijos fabricados com os diferentes fermentos (FIGURA 4).

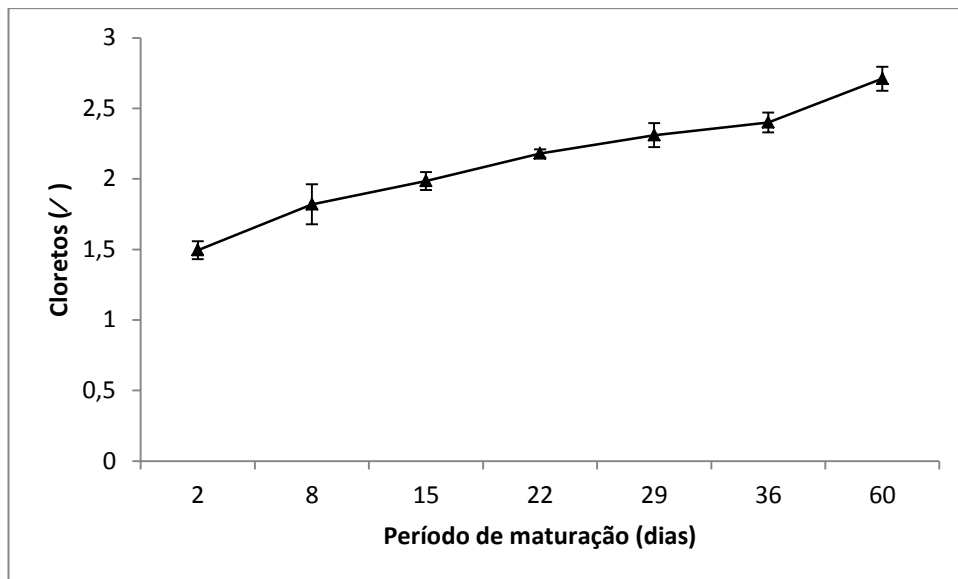


Figura 4. Teor de cloretos (%) dos queijos Minas artesanais fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Resultado semelhante foi encontrado por Martins et al. (2014), com valores que variam de 1,7 a 2,8 % para QMA da região do Serro fabricado com “pingo” com 8 e 64 dias de maturação respectivamente.

A adição de sal ao queijo tem dentre outras finalidades dificultar a multiplicação de micro-organismos contaminantes como coliformes e *Escherichia coli*. Micro-organismos como *S. aureus* são tolerantes a elevadas concentrações de sal (JAY et al., 2005), entretanto são eliminados ao longo da maturação devido à produção de compostos antimicrobianos produzidos por BAL (MARTINS et al., 2014; PINTO et al., 2011).

Para o conteúdo de proteína não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” após dois dias de fabricação, entretanto esse parâmetro foi menor ($p < 0,05$) nos demais períodos nos queijos fabricados com o “pingo”.

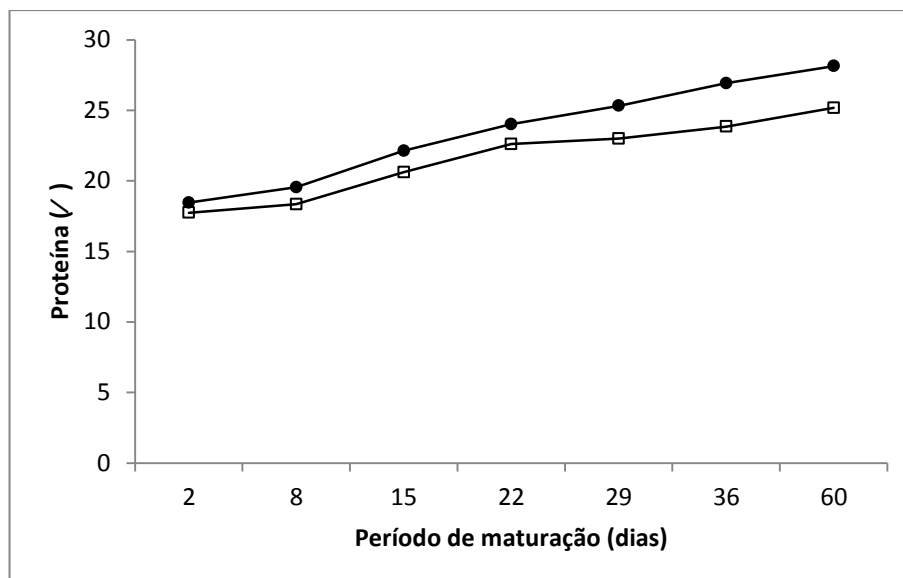


Figura 5. Conteúdo de proteína (%) dos queijos Minas artesanais fabricados com “pingo” (●) e “rala” (□) ao longo de 60 dias de maturação.

3.2. Extensão e profundidade de maturação

A extensão de proteólise ou de maturação é a relação entre a porcentagem de NS em pH 4,6 e a concentração de NT da amostra, sendo uma resposta da ação proteolítica das enzimas do coalho e naturais do leite sobre a caseína do queijo, liberando peptídeos de alto peso molecular (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1983). Já a profundidade de proteólise ou maturação é resultado da relação entre a porcentagem de NS em TCA 12 % e a concentração de NT da amostra, que permite inferir o grau de formação de substâncias de baixo peso molecular, principalmente aminoácidos, em função da atividade proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados resultantes da degradação da caseína (SILVA et al., 1995).

A extensão de maturação (EM) e profundidade de maturação (PM) para os queijos fabricados com o “pingo” foram maiores ($p \geq 0,05$) no período de 8 a 29 dias (TABELA 3). Isso mostra uma alteração importante nos queijos quando se utiliza outro tipo de fermento que não o tradicional.

Tabela 3. Evolução da proteólise do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” e “rala” ao longo de 29 dias de maturação

| Índice de maturação | Fermento utilizado* | Período de maturação (dias) | | | |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|
| | | 8 | 15 | 22 | 29 |
| Extensão de maturação | Pingo | 14,04a | 17,90a | 20,14a | 18,31a |
| | Rala | 12,14b | 13,57b | 15,75b | 17,52b |
| Profundidade de maturação | Pingo | 7,95a | 11,06a | 16,85a | 20,47a |
| | Rala | 6,58b | 9,87b | 13,69b | 14,63b |

*fermento utilizado na fabricação dos queijos Minas artesanal; médias seguidas pela mesma letra em cada coluna para cada parâmetro não diferem significativamente ($p \geq 0,05$) quando comparadas pelo teste t de Student;

A microbiota presente na “rala” e conseqüentemente nos queijos resultou em uma menor degradação dos compostos nitrogenados presentes. Isso provavelmente ocorre pela inserção ao leite de estirpes predominantes em somente em uma fase de maturação dos queijos (momento em que é obtida a “rala”). Na fase em que a “rala” é coletada, não se sabe se as bactérias predominantemente presentes são capazes de produzir endopeptidases e exopeptidases responsáveis pela proteólise adequada dos queijos. Ao contrário, o “pingo” contém um balanceamento adequado de BAL e outras bactérias, que vão se adaptando ao meio e criando condições que estimulam a diminuição de algumas espécies, enquanto outras começam a predominar. Isso gera um ecossistema complexo responsável pelas características sensoriais peculiares desses queijos (DORES e FERREIRA, 2012; MONTEL, 2014).

Dessa forma, um queijo com maior grau de proteólise conseqüentemente irá influenciar em sua textura. Isso poderá ser confirmado pelos resultados da TPA.

3.3. Análise do perfil de textura (TPA) dos queijos Minas artesanal fabricados “pingo” e “rala”

A textura de um queijo é resultado de uma série de fatores, dentre eles a proteólise. Uma vez que houve diferença com relação à esse parâmetro para os queijos fabricados com “pingo” e “rala”, torna-se necessário avaliar a influência destes fermentos na textura dos queijos.

Foi observada diferença ($p < 0,05$) entre os queijos produzidos com “pingo” e “rala” para os parâmetros de mastigabilidade, elasticidade e coesividade durante toda a maturação (FIGURAS 6, 7 e 8). Por outro lado, a adesividade não variou em relação aos queijos fabricados com os diferentes fermentos sendo observada uma média que variou entre $- 0,001$ e $- 0,004$ $N.cm^{-1}$, semelhante ao encontrado por Pinto et al. (2011).

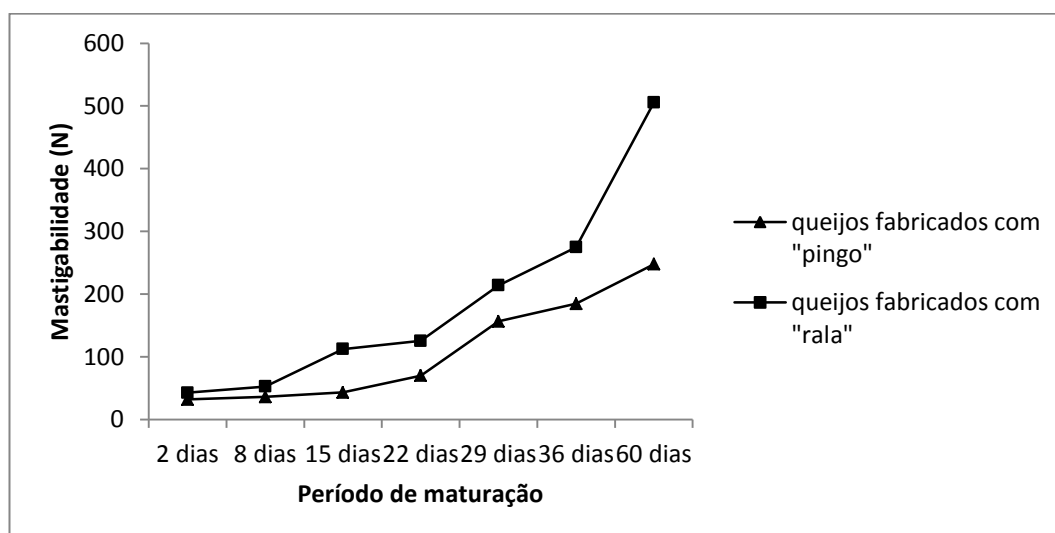


Figura 6. Mastigabilidade (N) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

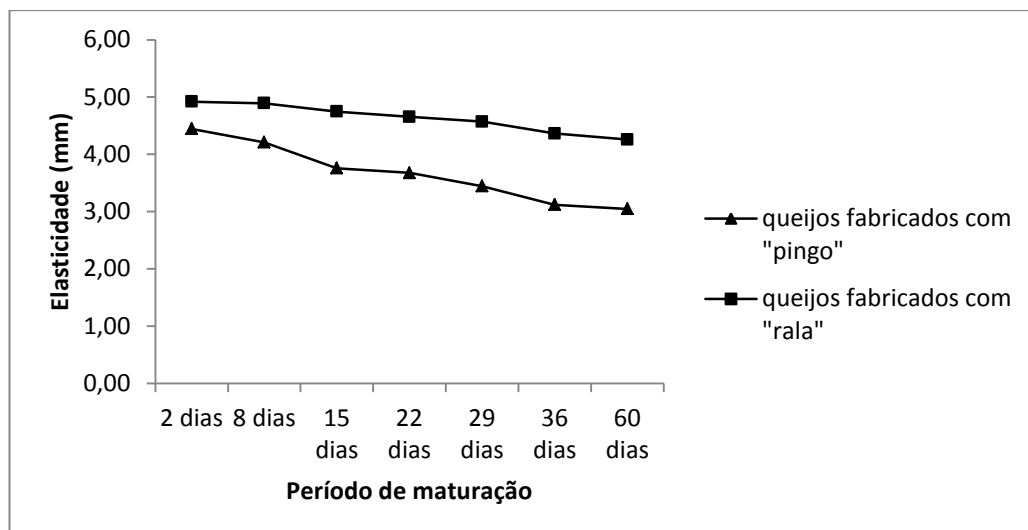


Figura 7. Elasticidade (mm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

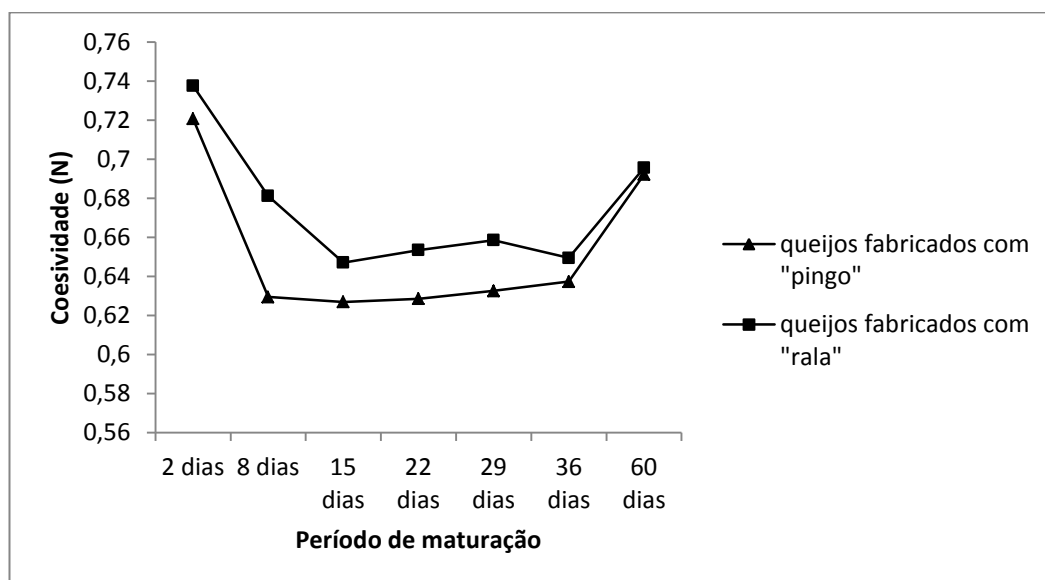


Figura 8. Coesividade (N) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Define-se mastigabilidade como um esforço necessário para que o alimento sólido esteja pronto para ser deglutido, sendo que a partir dele é possível deduzir sua dureza. Dessa forma, quanto maior os valores de mastigabilidade, mais duro é o alimento (FOX et al., 2000). Observa-se que os queijos fabricados com “rala” requerem uma força maior de mastigação ($p < 0,05$) em relação aos queijos fabricados com o “pingo” durante todo o

período de maturação. Essa diferença pode ser justificada pela menor umidade e menor índice de proteólise deste primeiro.

A elasticidade é a tendência que o queijo apresenta em recuperar sua forma original após a remoção de uma força aplicada (FOX et al., 2000). Observa-se uma na redução desses valores ao longo da maturação em ambos os queijos, havendo diferença ($p < 0,05$) nos valores obtidos entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” para essa variável em todos os períodos analisados. A diminuição da elasticidade com o passar do tempo pode ser justificada em decorrência da proteólise da caseína, principal proteína responsável pela rigidez desse produto (TUNICK et al., 1993). Quanto maior quantidade de caseína é degradada, maiores as frações resultantes de peptídeos menores, formando uma a rede proteica mais enfraquecida. Tal rede proteica resulta então em uma menor elasticidade.

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, os queijos fabricados “pingo” apresentaram maior extensão da maturação. Isso se relaciona com uma predominância de bactérias proteolíticas presente nesse fermento e posteriormente nos queijos, onde maior quantidade de caseína é degradada, resultando em uma menor elasticidade.

A coesividade é a interação entre os constituintes da matriz, sendo em queijos definida como a medida da força das ligações entre as proteínas (FOX et al., 2004). Observa-se diferença ($p < 0,05$) entre os queijos fabricados com os diferentes fermentos entre 2 a 29 dias de maturação, sendo que aqueles fabricados com a “rala” apresentaram valores mais elevados, o que também pode ser justificado pela sua menor proteólise.

A TPA é uma ferramenta importante para a caracterização de queijos e, além disso, poucos são os dados publicados que fornecem informações sobre esses parâmetros com relação aos QMA dessa região. Esses resultados podem ser importantes para mostrar a descaracterização desse produto quando modificações são feitas em seu processo de fabricação como é o caso da alteração do FE utilizado.

3.4. Características físicas dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala”

3.4.1. Altura e diâmetro

A maturação causou o efeito que é previsto nas características físicas dos queijos, reduzindo os valores de altura e diâmetro. Foi observada diferença ($p < 0,05$) com relação à esses parâmetros com 2 e 8 dias de maturação, onde os queijos fabricados com “pingo” apresentaram maiores valores (FIGURAS 9 e 10).

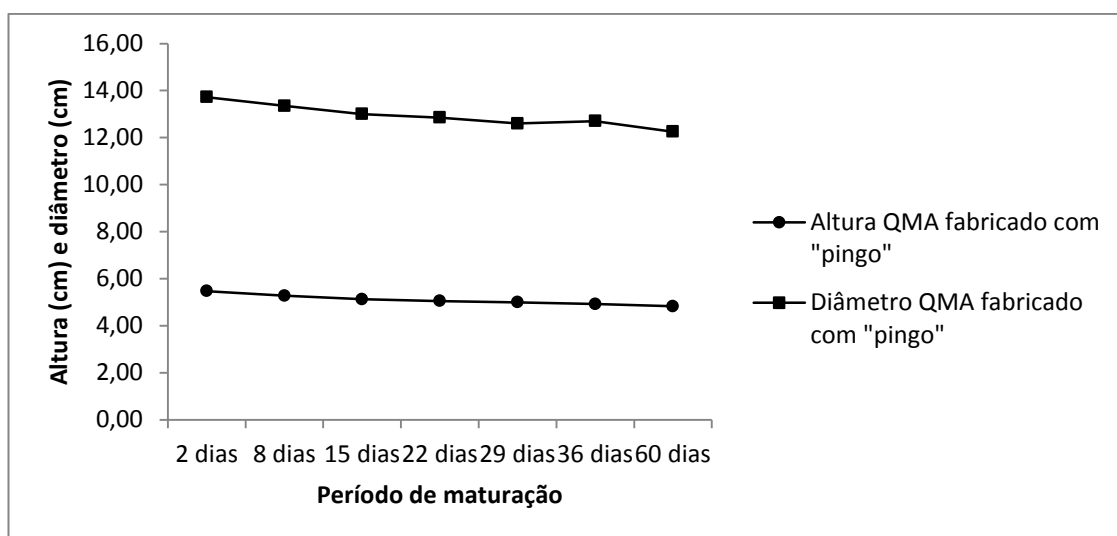


Figura 9. Altura (cm) e diâmetro (cm) do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” ao longo de 60 dias de maturação.

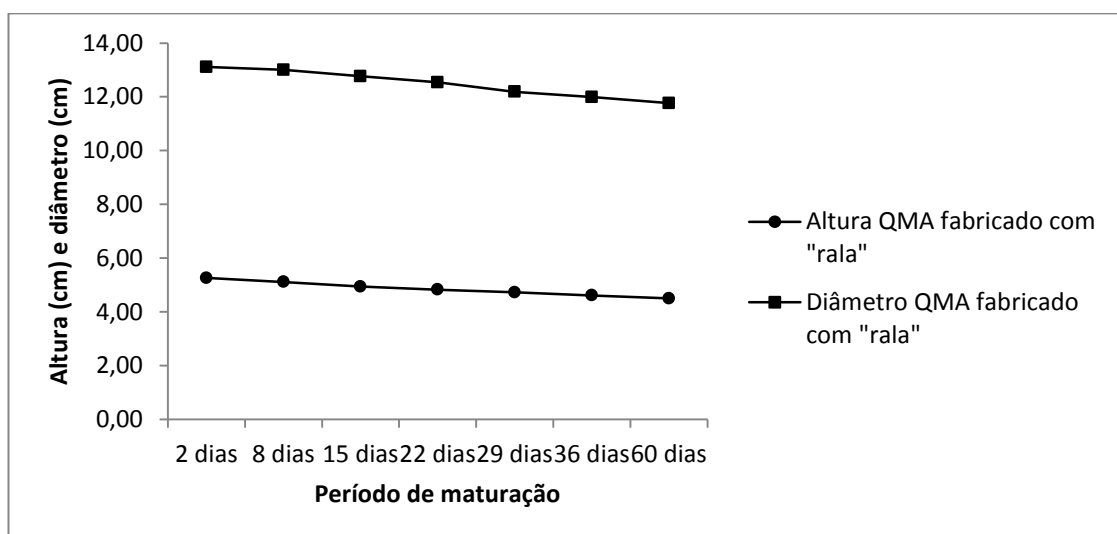


Figura 10. Altura (cm) e diâmetro (cm) do queijo Minas artesanal fabricado com “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

A redução dos parâmetros analisados está relacionada com a perda de umidade ao longo do tempo. Os queijos fabricados com a “rala” apresentaram com 2 e 8 dias de maturação altura e diâmetros menores em razão do menor conteúdo de umidade logo após sua fabricação e no início de sua maturação.

Os resultados mostraram-se semelhantes a estudos já realizadas, onde queijos típicos dessa região apresentaram diâmetros de aproximadamente 12 a 14 cm e altura variando de 4 a 6 cm (MARTINS et al., 2014). Em algumas unidades produtoras são produzidos queijos com diâmetro ligeiramente maior e um altura um pouco menor. Resultado aproximado também foi encontrado por Machado et al. (2004) que obteve uma média de 5,58 cm e 13,60 cm de altura e diâmetro respectivamente para os QMA do Serro-MG com 6 dias de maturação.

Para verificar a padronização e o efeito do tipo de fermento endógeno utilizado sobre a altura e o diâmetro dos QMA dessa região, foram utilizados gráficos “teia de aranha” para melhor visualização dos resultados (FIGURAS 11 e 12). Esses foram representados no período de maturação igual a 15 dias, dada a sua proximidade com o período mínimo de maturação desses queijos para a sua segurança microbiológica (atualmente de 17 dias).

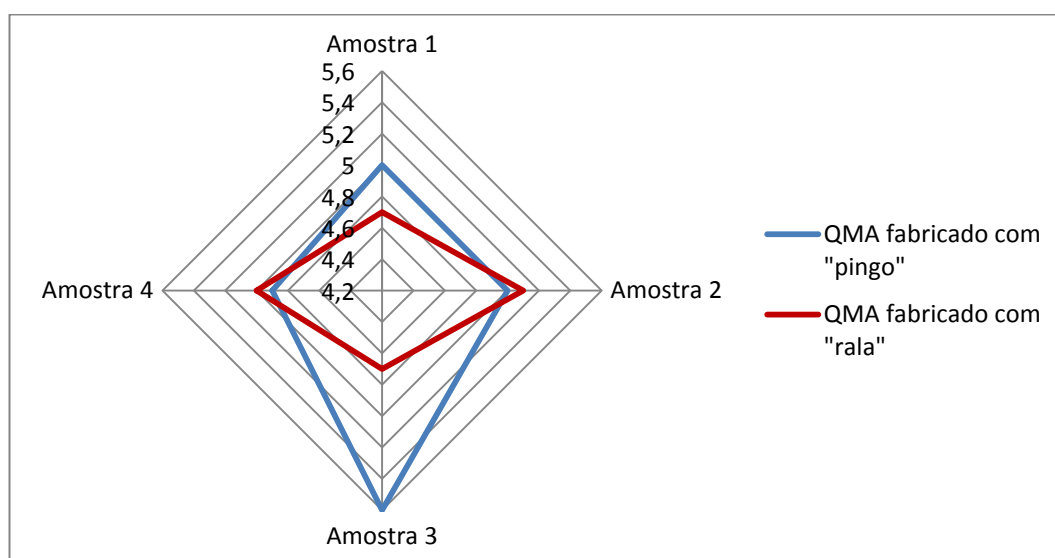


Figura 11. Altura (cm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com 15 dias de maturação.

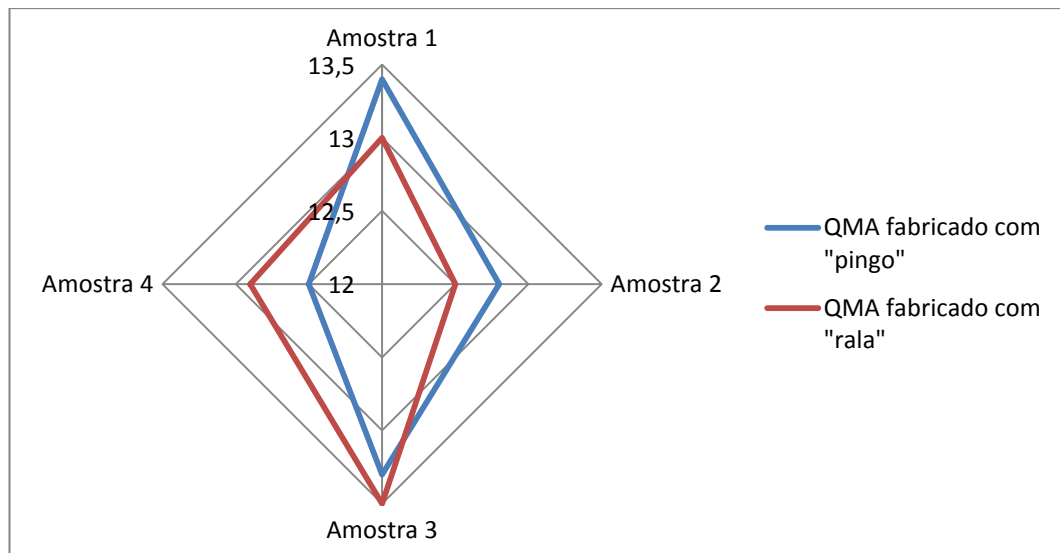


Figura 12. Diâmetro (cm) dos queijos Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala” com 15 dias de maturação.

Para os dois parâmetros analisados, as linhas azul e vermelha deveriam se sobrepôr na mesma figura, o que indicaria boa padronização dos queijos referente aos diferentes tipos de fermentos utilizados em sua fabricação. Entretanto, isto não ocorreu com a precisão que deveria, confirmando a diferença em alguma das etapas do processo de fabricação dos queijos fabricados com “pingo” e “rala”.

3.4.2. Avaliação da cor do queijo Minas artesanal fabricados com “pingo” e “rala”

3.4.2.1. Cor da casca QMA

Foi observada variação ($p < 0,05$) com relação à cor da casca dos QMA produzidos com “pingo” e “rala” ao longo da maturação (FIGURA 13).

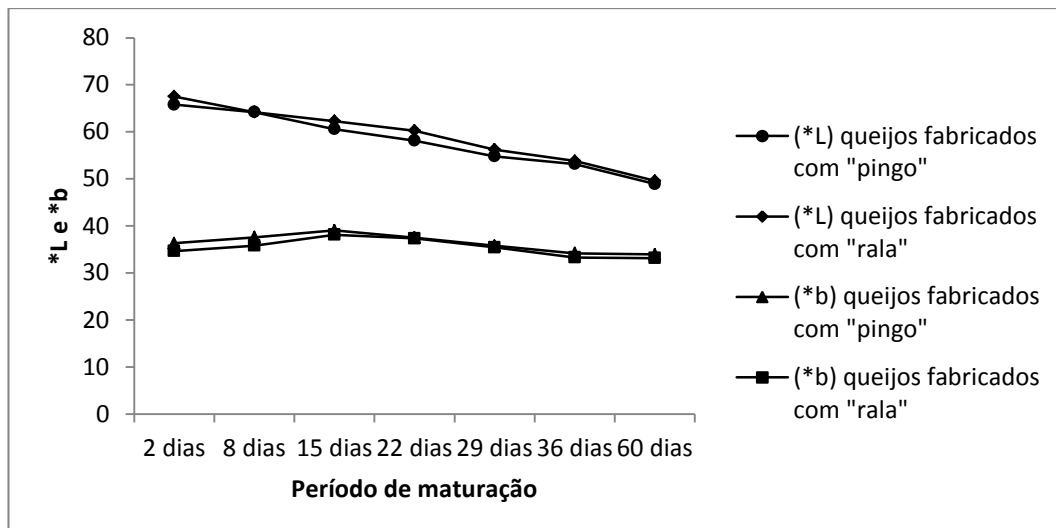


Figura 13. Coordenadas L* e b* da casca dos queijos Minas Artesanal fabricados com “pingo” e “rala”.

O parâmetro L* indica a luminosidade e refere-se à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de 0 a 100. Quanto maior o valor de L*, mais claro o objeto. À medida que se aumentou o período de maturação, os QMA apresentaram-se mais escuros. Os queijos fabricados com a “rala” apresentaram um maior valor ($p < 0,05$) desse parâmetro de 2 a 29 dias, eliminando essa diferença a partir desse período.

A casca dos queijos fabricados com “pingo” além de apresentar-se mais escura nesse período (menor valor de *L), obteve coloração amarela mais intensa comparada aos fabricados com a “rala” com 2 e 8 dias de maturação, característica confirmada pelos valores de *b, onde valores positivos indicam cor mais próxima do amarelo (FIGURA 14). A partir de 15 dias essa diferença foi eliminada (FIGURA 15).

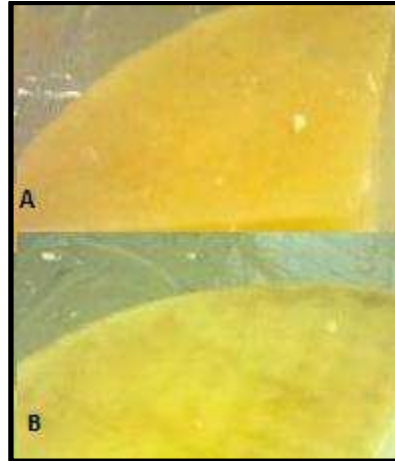


Figura 14. Queijo Minas artesanal (QMA) fabricado com “pingo” (A) e “rala” (B) com 8 dias de maturação.

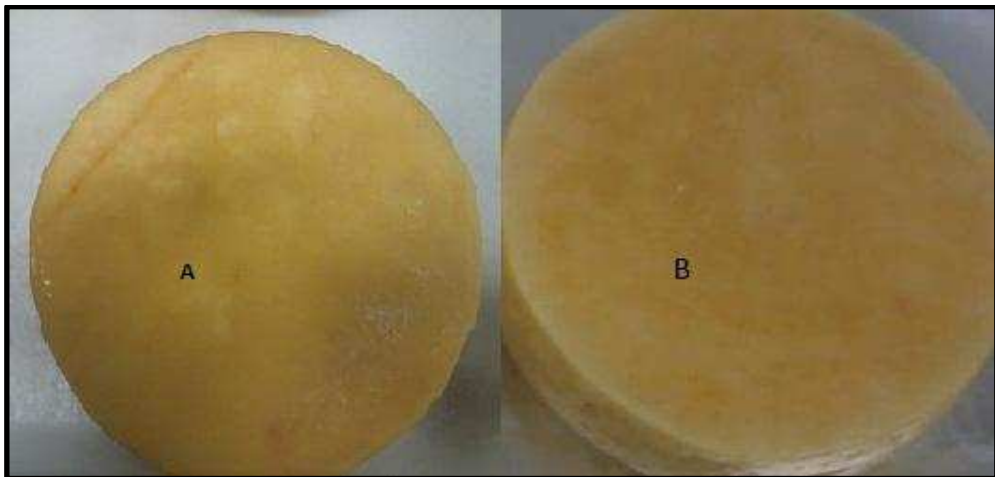


Figura 15. Queijo Minas artesanal (QMA) fabricado com “pingo” (A) e “rala” (B) com 15 dias de maturação.

Os valores de b^* aumentaram de 2 à 15 dias de maturação, mostrando um aumento na intensidade da cor amarela dos queijos ao longo do tempo. A partir de 22 dias observa-se uma diminuição desse parâmetro até completar a maturação. Essa diminuição pode ser explicada pelo aumento no crescimento de fungos na casca do QMA, tornando-o menos amarelado, não havendo diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos fabricados com “pingo” e “rala” nesse período.

3.4.2.2. Cor da massa dos QMA

Com relação à massa dos QMA também houve variação ($p < 0,05$) ao longo da maturação para os queijos fabricados com os diferentes fermentos (FIGURA 16).

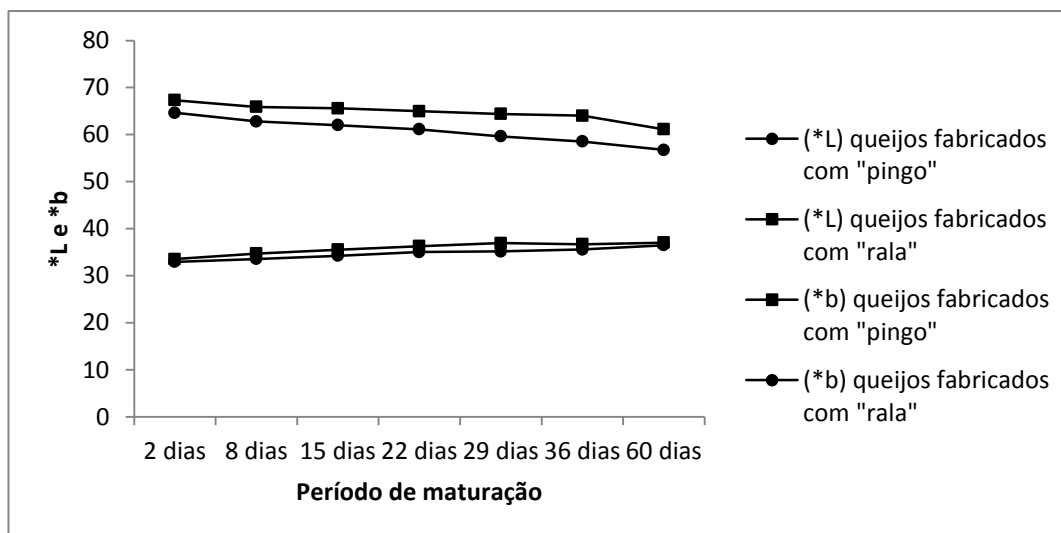


Figura 16. Coordenadas L^* e b^* da massa dos queijos Minas Artesanal fabricado com “pingo” e “rala”.

A coordenada $*L$ diminuiu ao longo do tempo, concluindo que a massa dos queijos torna-se mais escura à medida que se aumentou o período de maturação. Os queijos fabricados com a “rala” foram considerados mais claros ($p < 0,05$) em todos os períodos analisados.

Com o aumento da maturação o parâmetro $*b$ aumentou para ambos os queijos, ou seja, a mediada em que esses maturavam, sua massa adquiriu coloração amarela mais intensa. Maiores valores ($p < 0,05$) foram observados nos queijos fabricados com “pingo” em todos os períodos, mostrando-se mais amarelos do que aqueles fabricados com a “rala”.

Para os queijos fabricados com o fermento tradicional (“pingo”) observa-se também em cada período de maturação um maior ($p < 0,05$) conteúdo de gordura. Carotenoides são importantes pigmentos cromogênicos do leite e dos queijos (PERRY, 2004), que por sua natureza lipossolúvel se distribuem nos glóbulos de gordura e, por esta razão, quanto maior a quantidade de glóbulos, maior tende a ser a sua participação na

formação da cor da matriz alimentar. Isso pode ter resultado na maior intensidade da coloração amarela da massa dos queijos fabricados com o “pingo”

Esses resultados também confirmam a obtenção de um produto mais amarelo quando fabricado com o fermento tradicional, como mencionado pelos produtores. Resultados semelhantes aos queijos fabricados com “pingo” para os parâmetros *L e b* foram observados por Araújo (2013), que analisou QMA do Serro-MG de 8 a 60 dias de maturação.

Os valores do parâmetro *a não diferiram ($p \geq 0,05$) em toda a maturação entre os queijos fabricados com os diferentes tipos de fermento. A relação entre as coordenadas a*e b* estão apresentadas na TABELA 4.

Tabela 4. Índice de saturação *C (%) e Ângulo de tonalidade H° (graus) dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” ao longo do período de 60 dias de maturação

| | Porção do QMA | Tipo de fermento** | Período de maturação (dias) | | | | | | |
|----|---------------|--------------------|-----------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | 2 | 8 | 15 | 22 | 29 | 36 | 60 |
| C* | Casca | Pingo | 38,05* | 39,51* | 40,98 | 39,56 | 38,03 | 36,06 | 35,97 |
| | | Rala | 36,54* | 37,70* | 40,22 | 39,60 | 37,38 | 35,06 | 34,98 |
| | Massa | Pingo | 35,44 | 36,47 | 37,26 | 38,06 | 38,62 | 38,42 | 38,73 |
| | | Rala | 34,84 | 35,38 | 36,22 | 37,84 | 37,07 | 37,36 | 38,06 |
| H° | Casca | Pingo | 88,51 | 87,9 | 87,36 | 88,01 | 88,68 | 88,4 | 89,12 |
| | | Rala | 88,93 | 88,1 | 87,79 | 88,1 | 88,21 | 88,4 | 88,19 |
| | Massa | Pingo | 89,13 | 88,98 | 89,01 | 88,67 | 89,23 | 88,90 | 89,25 |
| | | Rala | 89,21 | 89,01 | 88,97 | 87,99 | 89,72 | 88,65 | 88,62 |

**fermento utilizado na fabricação dos queijos Minas artesanal; *médias diferem significativamente ($p \geq 0,05$) quando comparadas pelo teste t de Student;

O índice de saturação (Croma, C*) mede o grau de saturação da cor, sendo igual a 0 no centro e aumentando conforme aumenta a distância em relação a ele (KONICA MINOLTA, 1998). Valores de C* mais elevados estão relacionados à pigmentação ou saturação de cor. Assim, observa-se que os

valores de C^* divergiram ($p < 0,05$) somente na casca dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” com 2 e 8 dias de maturação.

Mesmo havendo diferenças nas intensidades de coloração ($*L$ e $*b$) estas não foram suficientes para promover variações significativas no matiz (H°), ou seja, os queijos fabricados com “pingo” e “rala” mantiveram uma cor semelhante em seu centro geométrico e, pela proximidade do ângulo do matiz (H°) a 90° considera-se que a cor predominante dos queijos é a amarela (KONICA MINOLTA, 2007).

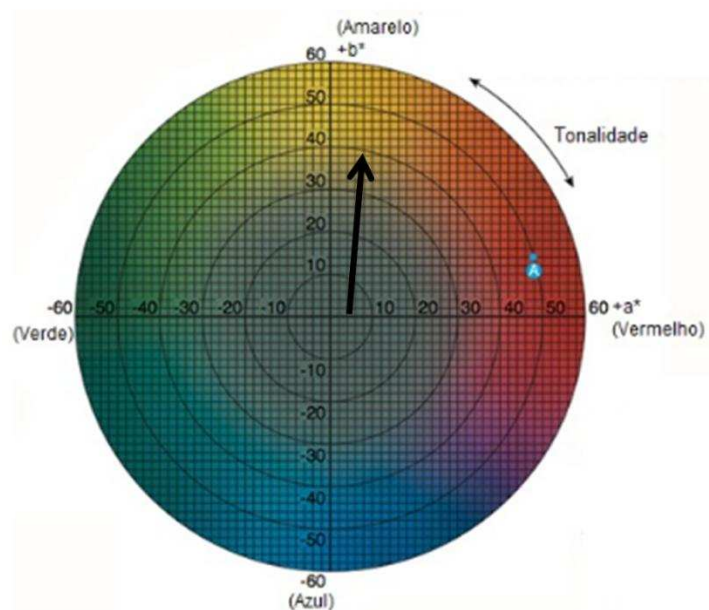


Figura 17. Diagrama de cromaticidade de a^*b^* para a cor dos queijos minas artesanais (QMA) fabricados “pingo” e “rala”

A modificação do fermento na fabricação dos QMA ocasionou na alteração de características importantes na qualidade final desses queijos que visualmente e sensorialmente pode trazer grande impacto ao consumidor.

4. CONCLUSÃO

A substituição do fermento “pingo” tradicionalmente utilizado pela “rala” na fabricação do queijo Minas artesanal resultou em diferença nos parâmetros físicos, físico-químicos, de textura e proteólise do produto final.

O queijo feito com a “rala” resultou em um produto com propriedades distintas em diferentes variáveis analisadas em relação ao queijo fabricado com “pingo”, mas que ao longo da maturação, em alguns casos, tendeu-se a aproximar das características do queijo tradicional.

Possivelmente a diferença nas características das estirpes predominantes em cada fermento foi capaz de causar alteração na microbiota presente em cada tipo de queijo, que ao longo da maturação que vão se reequilibrando dentro de uma dinâmica ecológica peculiar de cada um, gerando características distintas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 400p.

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of dairy products**. APHA Standard (15th ed.), Washington, DC, USA, (1985).

ARAÚJO, R. A. B. M. **Potencial de amins bioativas como indicadores do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo minas artesanal** Viçosa: UFV, 2013. 127p. Tese de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2013.

AWAD, S. Texture and flavour development in ras cheese made from raw and pasteurized milk. **Food Chemistry**, v. 97, p. 394-400, 2006.

BERTOLINO M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; RULLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1001-1011, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.** Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 8. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146 de 7 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos.** Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, página 3977. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

EL GALIOU, O.; ZANTAR, S.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A. Lipolysis and proteolysis during the ripening of fresh moroccan goats' milk cheese. **Journal of Dairy e Food Science**, v 8, p. 201-206, 2013.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk: determination of nitrogen content.** Brussels: 1993. 12p. (FIL 20B: 1993).

FIGUEIREDO, S. P.; BOARI, C. A.; SOBRINHO, P. S. C.; CHAVES, A. C. S. D.; SILVA, R. B.; CORREIO, H. B. F. S. Características do leite cru e do queijo minas artesanal do serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 68-82, 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.** London: Chapman & Hall, v.1, 617, p.

2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspen Publishers, Inc. Gatherburg, Maryland, 544p. 2000.

GLÓRIA, M. B. A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. **Handbook of Food Science Technology and Engineering**. New York, Marcel Dekker, Cap.13. , 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**, New York, NY, USA (2005).

KONICA MINOLTA. Konica Minolta Sensing. Japan 1998. **Precise color Communication: Color control from perception to instrumentation**. Disponível em: < <http://www.konicaminolta.com>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

LAVASANI, A.; R. S.; EHSANI, M. R.; MIRDAMADI, S. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 64-70, 2011.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

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

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo

Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2004.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2014.

PATHARE, P. B. et al. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. **Food and Bioprocess Technology Dublin**, v. 6, n. 1, p. 36 - 60, 2013.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. G. C. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 1. ed. Juiz de Fora, MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 190 p.

PERRY, K. S. P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; PIRES, A. C. S.; SOUZA, A. A. C.; SILVA, P. H. F.; SOBRA, D.; PAULA, J. C. J.; SANTOS, A. L. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2011.

RUEDA, P. A.; FERREIRA, C. L. L. F.; FURTADO, M. M.; FURTADO, C. F. Consumo de ácido cítrico e produção de diacetil por culturas lácticas produtoras de aroma em leites desnatados de vaca e de cabra. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 46, p. 10-14, 1991.

SALAUN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 2, p. 95-109, 2005.

SILVA, P. H. F.; PINHEIRO, A. J. R.; GOMES, J. C.; PARREIRAS, J. F.M.; MOSQUIM, M. C. A. V.; FURTADO, M. M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 295, v. 50. p. 15-29, 1995.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; RESPLANDE, F. A. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**. v. 27, p. 691-697, 2010.

TUNICK, M. H; MALIN, E. L.; SMITH, P. W.; SHIEH, J. J.; SULLIVAN, B. C.; MACKEY, K. L.; HOLSINGER, V. H. Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3621-3628,1993.

VALSECHI, O. A. **O leite e seus derivados**. São Paulo: Araras, 2001. 36p.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do leite**, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.

CAPÍTULO 5

IMPACTO DO TIPO DE FERMENTO ENDÓGENO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO SERRO - MG

RESUMO

Análises microbiológicas foram realizadas em 84 amostras de queijo Minas artesanal (QMA) da região do Serro-MG ao longo de 60 dias de maturação para verificar a influência do tipo de fermento endógeno utilizado na qualidade microbiológica desses queijos. Os queijos foram produzidos na estação da seca (julho), sendo que 4 unidades produtoras utilizaram o “pingo” e 8 utilizaram a “rala” como fermento na fabricação. A maturação foi imprescindível para redução dos patógenos presentes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes), entretanto, os queijos fabricados com o “pingo” apresentaram segurança microbiológica adequada a partir de 17 dias de maturação, ao contrário dos produzidos com a “rala”, que atingiram essa condição somente após 27 dias. *Listeria monocytogenes* foi detectada após 2 dias de fabricação em 11 dos 12 queijos analisados, não estando presente a partir desse período ao longo de toda a maturação. *Salmonella* sp. não ocorreu em nenhuma das amostras analisadas em todo período. A utilização da “rala” como fermento comprometeu a qualidade microbiológica dos queijos, sugerindo-se a alteração no período mínimo de maturação dos QMA da região do Serro-MG que originalmente é de 17 dias, ou um desmembramento da legislação para os queijos fabricados com “pingo” e “rala”.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, sendo responsável pela geração de renda de 9.789 pequenos produtores rurais que produzem cerca de 30.000 toneladas de queijo por ano (EMATER, 2016). Sua produção centenária é caracterizada pela utilização de leite de vaca cru recém-ordenhado em

propriedades rurais, pelo uso de um fermento endógeno conhecido como “pingo” (MINAS GERAIS, 2002) e pela maturação ao qual são submetidos, sendo esta específica de cada região (IMA, 2013). O “pingo” é o soro fermentado resultante de produções anteriores, originado dos queijos durante o processo de salga e utilizado para conduzir a fermentação (DORES e FERREIRA, 2012).

Na composição do “pingo” destacam-se as bactérias do ácido láctico (BAL) que apresentam importante papel na segurança microbiológica de queijos artesanais (COELHO et al., 2014; MARTINS et al., 2014), contribuindo na rápida redução do pH e no acúmulo de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos (JAY, 2005), diacetil, acetaldeído (JAY, 1982; PIARD e DESMAZEAUD, 1991) e bacteriocinas (COELHO et al., 2014; NESPOLO e BRANDELLI, 2010).

Por serem produzidos com leite cru os QMA podem veicular micro-organismos patogênicos (MONTEL et al., 2014; OMBARAK et al., 2016; YOON et al., 2016). A quantidade desses contaminantes nos queijos pode ser controlada pela maturação, onde a presença das bactérias endógenas (BAL) é fundamental para sua estabilidade e segurança microbiológica (MARTINS et al., 2014; MONTEL et al., 2014).

Estudos realizados com QMA na região do Serro-MG definiram 17 dias como o seu período mínimo de maturação (MARTINS et al., 2014). A partir daí esses queijos seriam considerados microbiologicamente seguros para o consumo. Esse período foi baseado na presença de *Staphylococcus aureus*, por ser considerado o micro-organismo patogênico que permanece por mais tempo até que se atinjam as contagens estabelecidas pela legislação vigente ($< 2 \log \text{ UFC/g}$) (BRASIL, 1996).

Embora ainda feito artesanalmente, a partir de 2002, uma série de adaptações têm sido sugeridas a fim de adequar a produção dos QMA à legislação brasileira, principalmente no que tange à natureza dos equipamentos utilizados à sua produção, originalmente em madeira e então substituídos por materiais como fibras de vidro, polipropileno, aço inox, dentre outros (IMA, 2002). No entanto, segundo os produtores, essas alterações têm contribuído para a descaracterização do produto e falhas no processo, principalmente na etapa de dessoragem, resultando em um produto muito

macio que não é aceito pela cooperativa local que intermedia a comercialização.

Na tentativa de eliminar o problema da diminuição da sinérese dos queijos, alguns produtores passaram a utilizar o próprio queijo na forma de “rala” como fermento, que consiste em um queijo maturado, produzido em um lote anterior, ralado, substituindo então o “pingo”, resultando agora em um produto com dessoramento adequado e textura mais firme. Embora a implementação da “rala” tenha resolvido o problema tecnológico durante a fabricação desses queijos, a utilização de um fermento não estudado e que não faz parte do “saber e fazer” tradicional dos QMA da região pode levar à alterações em sua qualidade final, principalmente no que tange à qualidade microbiológica.

Dessa forma, esse estudo teve como finalidade verificar o impacto do tipo fermento utilizado na qualidade microbiológica de QMA produzidos na região do Serro – MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e condição de maturação dos queijos

Foram estudadas 12 propriedades produtoras de queijo Minas artesanal (QMA) cadastradas ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizadas na região do Serro-MG, onde 4 utilizaram o “pingo” e 8 utilizaram a “rala” como fermento na fabricação dos queijos. A produção ocorreu no período da seca (julho).

Amostras de água, leite e fermento (“pingo” ou “rala”) de cada propriedade amostrada foram coletadas em recipientes esterilizados, sendo mantidas refrigeradas até o momento das análises.

Além disso, 7 queijos oriundos do mesmo dia de fabricação de cada propriedade foram coletados, após dois dias de fabricação, ao completar a salga, totalizando 84 unidades experimentais. Um queijo de cada produtor foi analisado no dia da coleta e os demais foram maturados na condição ambiente (23 – 25 °C e UR 62 %), sem embalagem e em prateleiras de madeira ao longo de 60 dias, reproduzindo-se as condições de maturação

desses queijos nas propriedades de origem. Nos dias 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias de maturação um queijo de cada propriedade foi retirado e submetido à análises físico-químicas e microbiológicas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 611.817).

2.2. Análises microbiológicas

Análises microbiológicas foram realizadas para as amostras de água, leite, fermento (“pingo” e “rala”) e queijo a fim de enumerar mesófilos aeróbios (WEHR e FRANK, 2004), fungos (WEHR e FRANK, 2004), coliformes totais, *Escherichia coli* (WEHR e FRANK, 2004), *Staphylococcus aureus* (AOAC, 2001) e verificar a presença ou ausência de *Salmonella* sp. (AOAC Licença 2014.01) e *Listeria monocytogenes* (AOAC Licença 995.22).

2.3. Análises estatísticas

Para análise dos resultados físico-químicos foi utilizado o programa SigmaPlot v.11, no qual foi realizado o teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Para os resultados microbiológicos foi realizada análise de regressão em função do período de maturação utilizado o programa SAS 9.3 (Statistical Analysis System) (UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil), cujos coeficientes foram testados pelo teste t até 5 % de significância.

3. RESULTADOS

Os leites utilizados na fabricação dos QMA apresentaram contagens de coliformes totais e *S. aureus* elevadas. Para *E. coli* todas as amostras analisadas encontraram-se dentro do limite estabelecido pela legislação (BRASIL, 2011a) (TABELA 1). Todas as amostras de leite obtiveram resultado negativo para a presença de *Salmonella* spp., e *L. monocytogenes* (resultados não mostrados).

Tabela 1. Média das contagens (log UFC.mL⁻¹) de *Staphylococcus aureus* (SA), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) dos leites utilizados na fabricação dos queijos Minas artesanal (QMA)

| Amostra* | Grupo microbiano | | |
|--------------|------------------|-------------|-------------|
| | AS | CT | EC |
| P1 | 4,52 | 3,65 | 1,49 |
| P2 | 3,81 | 3,72 | 1,54 |
| P3 | 3,88 | 3,51 | <1** |
| P4 | 2,45 | 2,58 | <1** |
| P5 | 3,38 | 3,65 | <1** |
| P6 | 3,41 | 1,36 | <1** |
| P7 | 2,56 | 2,62 | 1,57 |
| P8 | 3,53 | 2,52 | 1,11 |
| P9 | 2,25 | 1,36 | 1,08 |
| P10 | 3,43 | 1,75 | <1** |
| P11 | 2,28 | 3,04 | 1,58 |
| P12 | 2,51 | 3,18 | <1** |
| Média | 3,17 | 2,74 | 0,70 |

*identificação do produtor; **sem crescimento de células na menor diluição;

A água utilizada na fabricação dos queijos apresentou-se contaminada com coliformes totais em concentrações superiores ao estabelecido pela legislação brasileira (ausência em 100 mL), sendo observada a presença desse grupo em 1 mL de cada amostra analisada (BRASIL, 2011b). Essa foi considerada microbiologicamente aceitável (ausência em 1 mL) em relação aos outros micro-organismos analisados (*E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*) (resultados não mostrados).

Com relação aos fermentos analisados, a média das contagens de *S. aureus* apresentou-se maior ($p < 0,05$) na “rala” quando comparada com o “pingo”. Coliformes totais ocorreram somente na “rala”, não havendo contagens de *E. coli* em ambos os fermentos nas diluições realizadas (TABELA 2). Em nenhuma das amostras de fermento foi detectada a presença de *Salmonella* spp., e somente uma, proveniente do produtor 4

(“rala”), apresentou resultado positivo para *L. monocytogenes*.

Tabela 2. Média das contagens de *Staphylococcus aureus* (SA), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) dos fermentos “pingo” e “rala” utilizados na fabricação dos queijos Minas artesanal

| Fermento | Amostra* | Grupo microbiano | | |
|--------------------------------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | SA | CT | EC |
| Pingo (log UFC.mL ⁻¹) | 1 | 2,57 | <1 | <1 |
| | 6 | 1,23 | <1 | <1 |
| | 8 | 1,30 | <1 | <1 |
| | 9 | 2,36 | <1 | <1 |
| | Média | 1,78 ^A | <1 ^A | <1 ^A |
| Rala (log UFC.g ⁻¹) | 2 | 4,08 | 3,51 | <10 |
| | 3 | 3,50 | 3,30 | <10 |
| | 4 | 3,69 | 3,53 | <10 |
| | 5 | 4,08 | 3,23 | <10 |
| | 7 | 3,20 | 3,63 | <10 |
| | 10 | 2,65 | 2,49 | <10 |
| | 11 | 2,41 | 3,67 | <10 |
| 12 | 3,62 | 3,08 | <10 | |
| | Média | 3,40 ^B | 3,31 ^B | <10 ^A |

*identificação do produtor; médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade; <1; <10 sem crescimento na menor diluição;

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) determina a ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em 25 g de produtos lácteos como parâmetro de segurança. Dos 12 queijos analisados, 11 apresentaram resultado positivo para a presença de *L. monocytogenes* no segundo dia de fabricação. Entretanto, já com 8 dias de maturação esse patógeno não foi detectado, cessando-se após esse período as análises para o mesmo. No teste de detecção de *Salmonella* sp., todas as amostras de queijo apresentaram resultado negativo após 2 dias de fabricação, onde cessou-se também sua análise.

A média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de mesófilos aeróbios e fungos dos queijos foi menor com 2 dias de fabricação, ocorrendo um aumento com 8 dias de maturação e se estabilizando nos períodos 8, 15, 22, 29, 36 e 60 dias. Com relação aos queijos fabricados com “pingo” e “rala” não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre eles para esse grupo em todos os períodos analisados (FIGURAS 3 e 4).

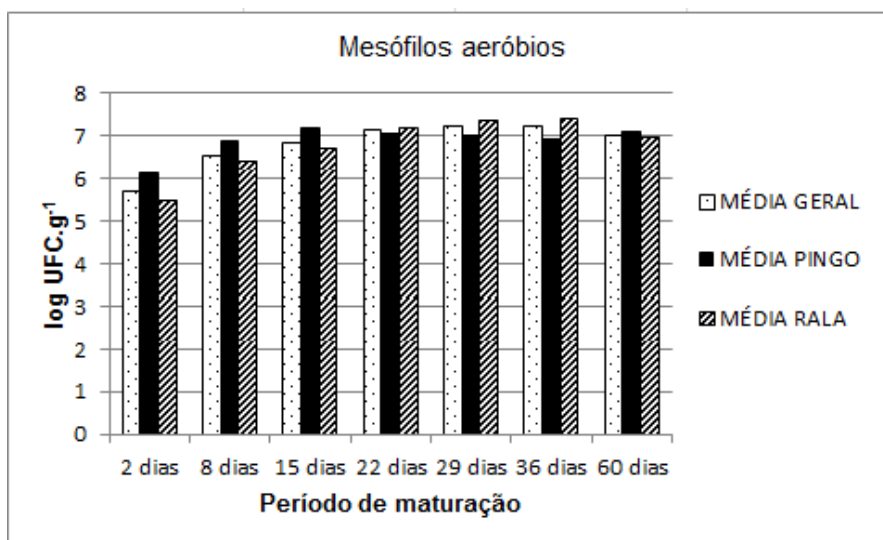


Figura 3. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de mesófilos aeróbios nos queijos Minas artesanal (QMA) fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

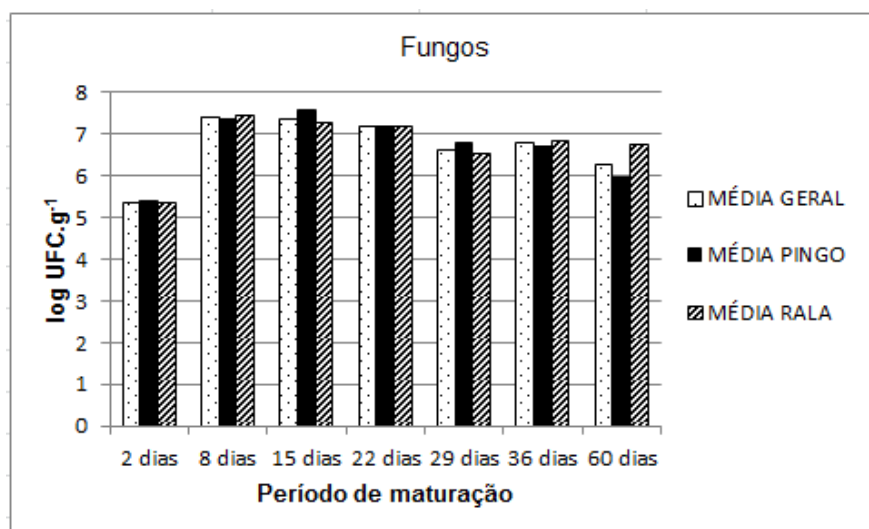


Figura 4. Média das contagens ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) de fungos filamentosos e não filamentosos nos queijos Minas artesanal (QMA) fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação.

Para o grupo dos contaminantes (*S. aureus*, coliformes totais e *E. coli*), a maturação dos queijos foi determinante no sentido de promover a redução de suas contagens. Nos queijos fabricados com o fermento tradicional (“pingo”) essa redução foi mais lenta, mas atingiu mais rapidamente as exigências microbiológicas estabelecidas pela legislação (FIGURAS 5, 6, e 7 respectivamente).

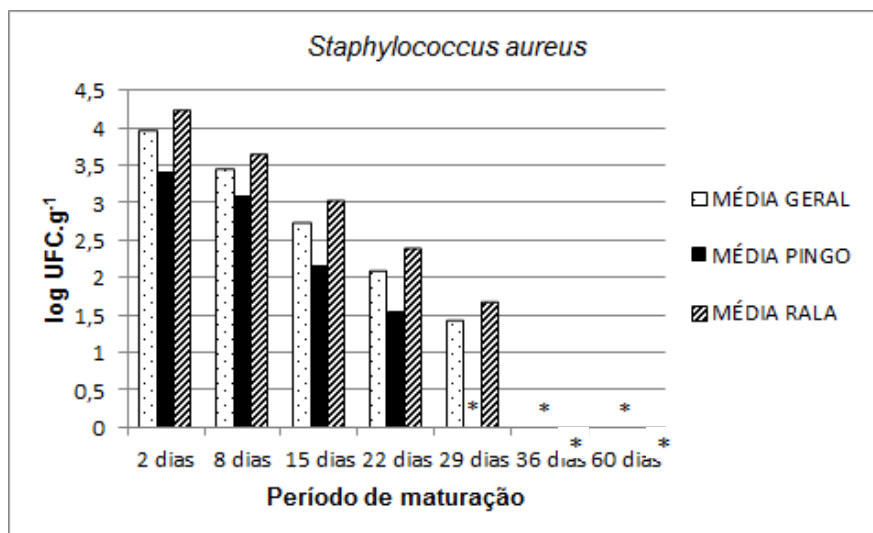


Figura 5. Média das contagens (log UFC.g⁻¹) de *Staphylococcus aureus* nos queijos Minas artesanal (QMA) fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação; *sem crescimento de célula na menor diluição;

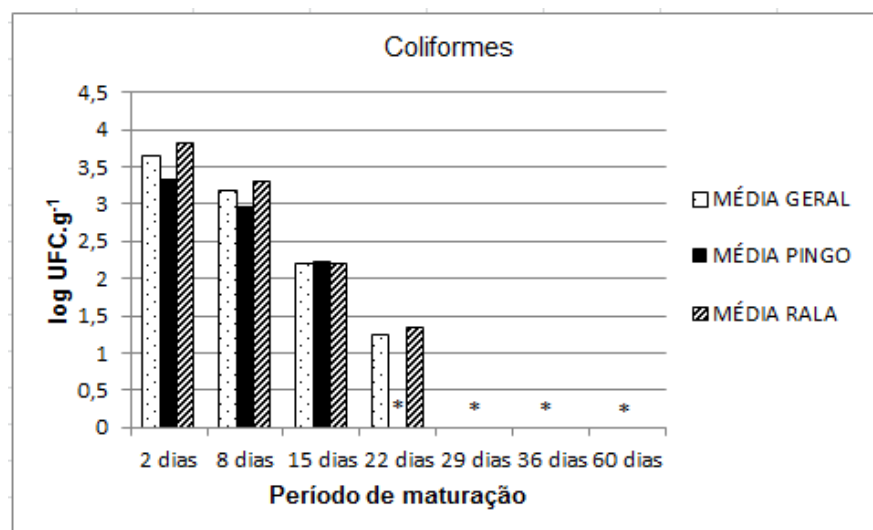


Figura 6. Média das contagens (log UFC.g⁻¹) de coliformes totais nos queijos Minas artesanal (QMA) fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação; *sem crescimento de célula na menor diluição;

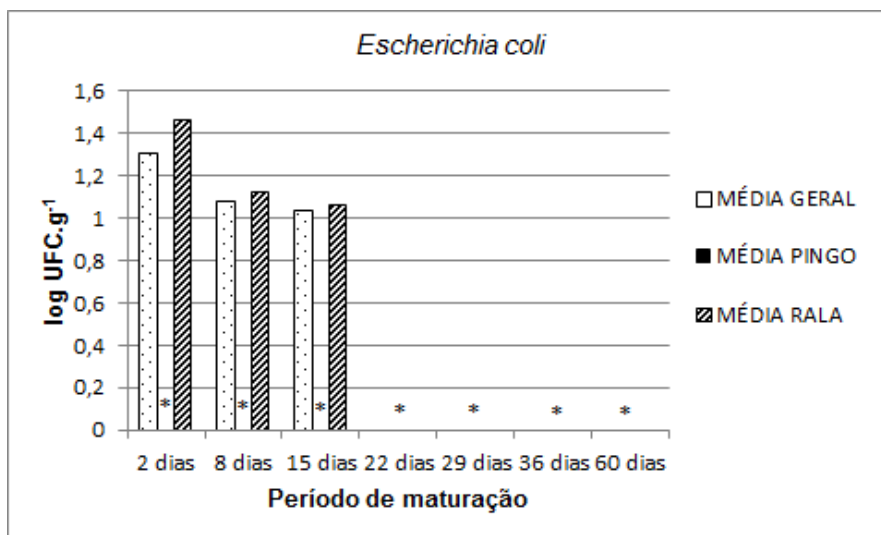


Figura 7. Média das contagens (log UFC.g⁻¹) de *Escherichia coli* nos queijos Minas artesanal (QMA) fabricados com “pingo” e “rala” ao longo de 60 dias de maturação; *sem crescimento de célula na menor diluição;

A média das contagens (log UFC.g⁻¹) de *S. aureus* deste estudo mostrou que os queijos fabricados a partir do fermento tipo "pingo" apresentaram segurança microbiológica após 17 dias de maturação, como o estipulado por lei (FIGURA 8).

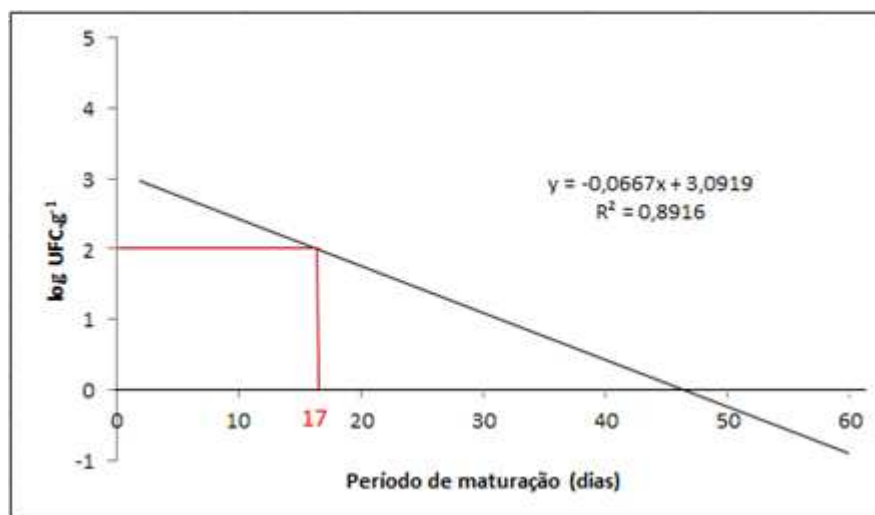


Figura 8. Estimativa do período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal fabricado com “pingo” para adequação às exigências microbiológicas estabelecidas pela da legislação.

Ao contrário, os queijos produzidos com o fermento tipo "rala"

alcançaram a segurança microbiológica apropriada apenas após 27 dias de maturação (com um aumento de 9 dias em relação ao recomendado pela legislação brasileira) (FIGURA 9).

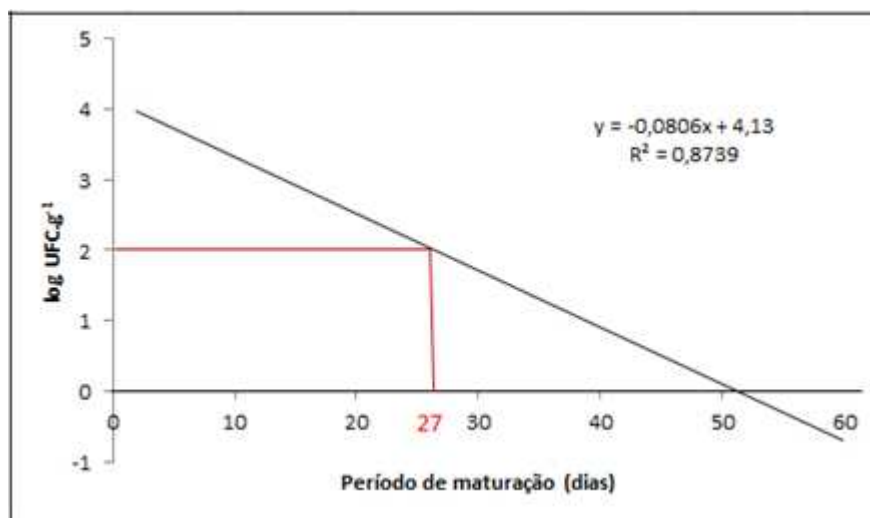


Figura 9. Estimativa do período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal fabricado com “rala” para adequação às exigências microbiológicas estabelecidas pela da legislação.

4. DISCUSSÃO

Os leites utilizados na fabricação dos QMA da região do Serro-MG amostrados nas diferentes propriedades apresentaram grande variação em relação às contagens microbianas dos grupos analisados (TABELA 1), indicando diferenças relacionadas às condições higiênico-sanitárias durante a manipulação da matéria prima.

Uma maior média na contagem de *S. aureus* com relação a coliformes e *E. coli* foi observada. Esse patógeno, quando presente em concentrações elevadas pode vir a produzir toxinas causando intoxicação alimentar (JOHLER et al., 2015), além de ser um indício da presença de mastite no animal, infecção bacteriana nas glândulas mamárias (THOMPSON-CRISPI et al., 2014), aumentando as contagens de células somáticas (CCS) e diminuição da qualidade do leite (BARKEMA et al., 2006).

Um estudo anterior realizado por Martins et al (2014) na mesma região mostrou a presença de *S. aureus*, *E. coli* e coliformes em

concentrações médias de 2,46; 2,18; e 3,08 log UFC.mL⁻¹, respectivamente, nos leites utilizados para a produção dos QMA. Nesse caso, as unidades produtoras ainda não encontravam-se cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e não mantinham implementadas as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Boas Práticas Agropecuárias (BPA).

No presente estudo, as propriedades encontravam-se cadastradas ao IMA e apresentavam os programas para melhoria de qualidade implementados. Esperava-se, portanto, uma melhora na qualidade microbiológica dos leites utilizados para a fabricação dos queijos. No entanto, isso não foi observado, e os resultados não diferem dos encontrados em unidades não registradas. A baixa qualidade da matéria-prima pode ser atribuída a uma higienização deficiente na ordenha, ao uso de água não potável, a limpeza inadequada de utensílios e equipamentos, a falta de armazenamento do leite a baixas temperaturas, e no caso de altas contagens de *S. aureus*, pode indicar a presença de mastite no rebanho. Essas condições podem ser atribuídas à não aplicação das BPF e BPA e/ou à ausência de fiscalização pelos órgãos competentes.

A produção dos QMA utilizando uma matéria prima fora dos padrões de qualidade tem predominado e conseqüentemente o produto pode vir a não atingir a qualidade microbiológica esperada ao final do processo. Além disso, a microbiota contaminante presente na matéria prima irá contaminar o fermento endógeno utilizado na fabricação dos queijos, que é sempre oriundo de uma produção anterior, afetando também sua qualidade microbiológica.

Por sua vez, o fermento utilizado influencia no processo produtivo e na qualidade microbiológica dos queijos pela incorporação de uma maior ou menor quantidade de contaminantes ao leite para a fabricação dos mesmos. Por estarem interligados, ambos (fermento e matéria prima), esses devem apresentar uma boa qualidade, com a menor contaminação possível.

Uma melhor qualidade microbiológica do fermento endógeno tradicional (“pingo”) foi observada, sendo que, micro-organismos presentes nos fermentos utilizados estarão presentes nos queijos de toda produção, onde aqueles fabricados com a “rala” apresentarão já inicialmente uma maior quantidade desses contaminantes.

A “rala” é definida como um subproduto que é obtido a partir do queijo maduro (aproximadamente 8 dias) ralado em sua parte externa para retirada da casca mais dura, essencial para terminar o produto e dar-lhe características estéticas que favoreçam a sua comercialização, sendo um costume da região do Serro e não realizado em outras regiões como Serra da Canastra, Serra do Salitre e Araxá. Embora de extrema importância para melhor apreciação do produto, não é recomendada sua utilização como fermento, já que trata-se de um produto muito manipulado e com chances aumentadas de contaminação por patógenos como corroborado pelos resultados apresentados nessa pesquisa.

O fermento tipo “pingo” apresenta tanto BAL “*starters*” (iniciadoras) quanto “*NSLAB*” (maturadoras). Já o fermento tipo “rala”, por não ser originário diretamente do leite e sim oriundo do próprio queijo maturado ralado, apresenta uma predominância de bactérias “*NSLAB*”. Dessa forma, diferenças quali e quantitativa desses fermentos podem afetar as características finais dos queijos, principalmente relacionadas à sua qualidade microbiológica.

Vários estudos têm demonstrado o papel das BAL que estão presentes no “pingo” na inibição de micro-organismos patogênicos (O’BRYAN et al., 2016; ORTOLANI et al., 2010), como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium tyrobutyricum* (CALLON et al., 2016; COELHO et al., 2014; DAL BELLO et al., 2010; RENYE et al., 2011).

A diminuição nas contagens de *S. aureus*, coliformes totais e *E. coli* ao longo da maturação dos queijos (Figuras 5, 6 e 7), indica a importância da maturação e da utilização do fermento, seja ele “pingo” ou “rala”, na segurança microbiológica de queijos feitos com leite cru, que em conjunto atuam inibindo a microbiota patogênica presente.

S. aureus é considerado o micro-organismo patogênico que permanece por mais tempo nos QMA até que se atinjam as contagens estabelecidas pela legislação vigente (MARTINS et al. 2014). Considerando as contagens desse micro-organismo conclui-se que os queijos fabricados com o fermento tipo “pingo” apresentaram segurança microbiológica ($< 2 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) após 17 dias de maturação. Isso demonstra que o cadastramento

das unidades produtoras ao IMA e a exigência da aplicação das BPF e BPA continuam contribuindo para manutenção da qualidade ao longo da fabricação desses queijos, embora se esperasse uma melhoria que contribuísse ainda mais para a diminuição do período necessário de maturação para comercialização. Entretanto, esses queijos mantiveram a segurança microbiológica exigida pela legislação no período estipulado.

Ao contrário, os queijos produzidos com o fermento tipo "rala" alcançaram a segurança microbiológica apropriada somente após 27 dias de maturação. Isso constitui um aumento de 6 dias de maturação (de 17 para 24 dias) na média geral para que os QMA sejam considerados microbiologicamente seguros para consumo. Este resultado foi influenciado pelo aumento no período de maturação necessário para que os queijos produzidos com a "rala" alcançassem a segurança microbiológica adequada, principalmente pelo fato de já apresentarem uma contaminação inicial mais elevada.

E. coli não esteve presente em nenhum dos queijos fabricados com "pingo", e apresentou contagens permitidas ($< 2 \log \text{UFC.g}^{-1}$) em todo o período naqueles oriundos de fabricação com a "rala". Coliformes atingiram as concentrações exigidas pela legislação ($< 2 \log \text{UFC.g}^{-1}$) antes do período exigido para comercialização dos QMA em ambos os queijos, embora tenha apresentado maiores contagens naqueles fabricados com a "rala" em todos os períodos de maturação analisados.

Foi observada a presença de *L. monocytogenes* em 91,6 % das amostras de queijo analisadas com dois dias de maturação, entretanto nenhuma das amostras de leite apresentou tal contaminação e somente o fermento de um produtor ("rala") apresentou-se contaminado. Tal bactéria apresenta distribuição ubiqüitária, podendo ser encontrada no solo e em diversos tipos de alimentos, o que pode ter ocasionado a contaminação inicial do fermento. A contaminação dos queijos indica uma possibilidade de contaminação cruzada. Com relação à presença de *Salmonella* spp., todas as amostras de queijo apresentaram resultado negativo com 2 dias de fabricação, cessando as análises nesse período. Os resultados comprovam mais uma vez que *S. aureus* corresponde ao patógeno que permanece por mais tempo durante a maturação dos QMA (MARTINS et al., 2014).

A redução de contaminantes nos queijos ao longo da maturação pode ser explicada pela rápida produção de ácido pelas BAL e com consequente diminuição inicial do pH, além de poder ocorrer a produção de outros agentes antimicrobianos como diacetil, acetaldeído (JAY, 1992; PIARD e DESMAZEAUD, 1991) e bacteriocinas (NESPOLO e BRANDELLI, 2010; O'SHEA et al., 2013; RENYE et al., 2011).

O aumento na acidez titulável dos queijos ao longo do tempo é resultante dentre outros da degradação da lactose por bactérias “*starters*” ou fermentadoras.

Como observado no capítulo 4 a maior acidez dos queijos fabricados com o “pingo” nos dias 2 e 8, pode estar diretamente relacionada com as características das estirpes presentes em cada tipo de fermento utilizado em sua fabricação. O “pingo”, por conter predominância de bactérias “*starters*” (LAVASANI et al., 2011; LIMA et al., 2009; MARTINS et al., 2014; SILVA et al., 2011), possivelmente leva a uma maior e mais rápida produção de ácido no início da fabricação e nos primeiros dias de maturação. A “rala”, pelo fato de ser um fermento coletado a partir de um queijo já maduro (aproximadamente 8 dias), apresenta uma predominância de bactérias maturadoras (NSLAB), influenciando dessa forma na menor quantidade de ácido produzida nos queijos em sua fase inicial e no início de sua maturação. Entre 15 e 60 dias de maturação essa diferença foi eliminada provavelmente pela predominância de bactérias *NSLB* em ambos os queijos.

A produção de ácido pelas BAL contribui para a segurança microbiológica desses queijos por meio de dois processos: 1) diminuição inicial do pH do leite, já que determinados micro-organismos patogênicos são sensíveis (ANDRADE, 2008); 2) concentração de ácidos orgânicos produzidos e presentes na forma não dissociada, que por sua vez depende do pH do meio. A forma não dissociada do ácido, que geralmente é hidrofóbica, favorece a penetração desses compostos através das membranas plasmáticas da célula microbiana. Dentro da célula, em pH mais alto, a molécula se dissocia liberando ânions e prótons que acumulam na célula, causando rompimento de membranas, aumentando o estresse associado ao pH intracelular e acumulando ânions tóxicos (ADAMNS, 1999).

O desuso do fermento tradicional tornou-se necessário em algumas

propriedades rurais devido a modificações no processo de fabricação sugeridas e exigidas pela legislação. A modificação considerada mais marcante é a troca da madeira utilizada ao longo do processo por materiais de mais fácil limpeza como fibra de vidro, polipropileno e aço inoxidável (IMA, 2002). Essas alterações foram sugeridas como medida para diminuir a proliferação de patógenos nos QMA. Entretanto, de acordo com os produtores, isso levou a alterações durante o processo de produção, principalmente na etapa de sinérese, pelo fato dos queijos não dessorarem adequadamente antes de seguirem para maturação. Isso contribuiu para a descaracterização do produto, afetando principalmente a textura tradicional.

Os queijos fabricados com “pingo” atualmente apresentam consistência macia, de maneira que não são aceitos pela cooperativa local que faz o intermédio da comercialização. Na tentativa de remediar esta situação, alguns produtores passaram a utilizar a “rala” como fermento, que, segundo eles, resolvia o problema de dessoramento do produto, resultando em um queijo mais firme. Isso pode ser observado analisando-se a umidade dos mesmos. Os queijos fabricados com “rala” apresentaram menor umidade ($p \geq 0,05$) com relação àqueles fabricados com o “pingo” no segundo dia de fabricação e com 8 dias de maturação, sendo essa pequena diferença a responsável por um produto mais firme.

A razão de se obter um produto mais firme ou macio pode relacionar-se a um “dessoramento” mais ou menos eficiente respectivamente, e também ao conteúdo de água presente em cada fermento adicionado ao leite de produção. A adição do “pingo” ao leite (0,5 %) resulta em um maior conteúdo de água nos queijos fabricados com esse fermento, que constituiu-se de um soro fermentado retirado no momento da salga, podendo conter até 90 % de água. Já a “rala”, por constituir de um queijo ralado maturado, apresenta um maior conteúdo de sólidos totais. Dessa forma, após a fabricação, os queijos fabricados com “pingo” apresentarão maior conteúdo de água e menor conteúdo de sólidos totais o que resulta em um produto com consistência mais macia, visto que o contrário ocorre com os queijos fabricados com a “rala”, como observado no capítulo anterior.

Embora resolvido o problema de dessoramento do produto, a troca do fermento utilizado acarretou ao não atendimento das exigências

microbiológicas para comercialização dos QMA no período de maturação estipulado (17 dias), gerando um produto com maior índice de contaminação. Ao contrário do fermento endógeno tradicional já conhecido e estudado, não se sabe ao certo se a “rala” também apresenta a microbiota adequada com características capazes de eliminar os micro-organismos patogênicos presentes no tempo estabelecido pela legislação, além de originar um queijo com uma maior contagem inicial de patógenos por apresentar maior contaminação.

Com relação às contagens de mesófilos aeróbios nos queijos, observa-se uma menor média ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) no tempo 2, ocorrendo um aumento com 8 dias de maturação e estabilizando-se até 60 dias. Com relação aos queijos fabricados com “pingo” e “rala” não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre eles para esse grupo em todos os períodos analisados. A mesma situação pode ser observada para fungos.

A legislação não estabelece um padrão para a contagem microbiana de mesófilos aeróbios em queijos. Contudo, a sua presença pode ser utilizada como um indicador da população bacteriana de uma amostra, incluindo BAL.

Embora na maioria dos casos a presença de fungos seja vista como contaminação indesejável em alimentos, esses apresentam papel relevante na maturação de queijos artesanais. Os fungos filamentosos principalmente do gênero *Penicillium* spp. possuem endopeptidases que degradam a caseína e exopeptidases que degradam os peptídeos presentes em aminoácidos, produzindo substâncias que contribuem para os componentes de flavor dos QMA (FOX e WALLACE, 1997).

O ácido cítrico metabolizado pelos fungos também contribui para o sabor e aroma característicos desses queijos. No leite, ele é transformado pelas bactérias “starters” em diacetil e outros compostos neutros. Já na massa formada, os fungos o metabolizam para piruvato que é transformado em acetil CoA, entrando posteriormente no ciclo de Krebs para a formação do citrato que em seguida é convertido em compostos (diacetil, acetaldeído) que conferem flavor típico do produto (WALSTRA et al., 2002).

Apesar de não ser um aspecto explorado em QMA, a presença de fungos nos queijos em concentrações elevadas pode ser considerada ainda

um fator adicional na segurança dos mesmos, uma vez que quando presentes principalmente em sua superfície, ocupam espaço que de outra forma poderia ser ocupado por patógenos. Adicionalmente esses fungos ainda podem produzir substâncias antimicrobianas capazes de eliminar patógenos presentes.

A redução da A_w ao longo da maturação interfere diretamente na atividade da microbiota do queijo, visto que quanto menor a A_w menor a taxa de crescimento microbiano. De acordo com os dados obtidos no capítulo anterior, os valores de A_w encontrados durante toda a maturação não foram baixos o suficiente para inibição desse crescimento, estando na faixa de 0,97 à 0,88 entre 2 e 60 dias de maturação respectivamente. Alimentos com A_w acima de 0,86 permitem o crescimento de algumas formas microbianas, como é o caso de *S. aureus* (ANDRADE, 2008). Embora os valores de A_w encontrados não sejam adequados para a inibição dos contaminantes presentes nos QMA, a maturação foi essencial e suficiente para garantir a diminuição desses, embora nos queijos fabricados com o “pingo” essa diminuição tenha sido mais eficiente.

As adaptações estabelecidas pela legislação brasileira e implementadas nessas propriedades levaram aos produtores a optarem pelo desuso do “pingo” na fabricação dos QMA, o que trouxe consequências para a qualidade microbiológica dos mesmos.

Modificações que tinham como objetivo à melhoria da segurança microbiológica desses produtos trouxe como consequência a utilização massiva da “rala” agora necessária para obtenção de um produto com textura adequada. Entretanto, essa modificação causou o comprometimento da qualidade microbiológica do produto, aumentando dessa forma o período de maturação necessário para a liberação de um produto seguro microbiologicamente.

5. CONCLUSÃO

Os queijos fabricados com o fermento tipo “pingo” foram considerados microbiologicamente seguros para comercialização e consumo a partir dos 17 dias de maturação, diferentemente dos queijos fabricados com fermento

tipo “rala”, que precisam maturar por pelo menos 27 dias. Isso consiste em um aumento do período mínimo de maturação previsto na legislação, atualmente de 17 dias, mostrando a importância da maturação e da utilização do fermento endógeno tradicional na qualidade microbiológica do queijo artesanal do Serro-MG.

Sugere-se um ajuste no período mínimo de maturação estipulado por lei, aumentando para 27 dias, ou o desmembramento da legislação para queijos produzidos com fermento tipo “pingo” e “rala”, garantindo assim a qualidade e segurança microbiológica do produto final.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. A. **Nutricines. Food components in Health and Nutrition.** Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos.** São Paulo: Varela, 2008. 400p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 2001. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

AOAC. **Official Methods of AOAC International.** Rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Foods. 2001.

AOAC. **Official Methods of AOAC International.** Official Method 995.22. Listeria in foods colorimetric polyclonal enzyme immunoassay screening method (TECRA LISTERIA VIA).

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination of dairy products.** APHA Standard (15th ed.), Washington, DC, USA, (1985).

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877-1895, 2006.

BERTOLINO M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; RULLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1001-1011, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011a. **Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 dez. 2011a. Seção 1, p.1-24. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011b. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 dez. 2011b. Seção 1, página 39. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 13 dez. 2006. Seção 1, página 8. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146 de 7 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 7 mar. 1996. Seção 1, página 3977. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

CALLON, C.; ARLIQUIE, C.; MONTEL, M. C. Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. **Food Microbiology**, v. 53, p. 63-70. 2016.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1151–1159, 2010.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, p. 26-34, 2012.

EMATER – EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENÇÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Programa Queijo Minas Artesanal**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em: 01 jun. 2016.

FOX, P. F.; WALLACE, J. M. Formation of flavor compounds in cheese. **Advances in Applied Microbiology**, v. 45, 0. 17-45, 1997.

GLÓRIA, M. B. A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. **Handbook of Food**

Science Technology and Engineering. New York, Marcel Dekker, Cap.13. , 2005.

IMA – INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 518, de 14 de junho de 2002 – **Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo Minas artesanal.** 2002. Disponível em:<[http:// www.ima.mg.gov.br/](http://www.ima.mg.gov.br/)>. Acesso em: 01 jun. 2016.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

JAY, J. M. Antimicrobial activity of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, p. 525-532, 1982.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, D.; HUQUENIN, M. C.; ROBERT, L.; HUMMERIOHANN.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 2944-2948, 2015.

LAVASANI, A.; R. S.; EHSANI, M. R.; MIRDAMADI, S. Changes in physicochemical and organoleptic properties of traditional Iranian cheese Lighvan during ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 64-70, 2011.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO JR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian**

Journal of Microbiology, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2014.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; PAUS-DELBES, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIRES, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p.136-154, 2014.

NESPOLO, C. R.; BRANDELLI, A. Production of bacteriocin like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.1009-1018, 2010.

O'BRYAN, C. A.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; NDAHETUVE, J.B. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, v.16, p. 117-136, 2015.

OMBARAK, R. A.; HINENOVA, A.; AWASTHI, S. P.; IGUCHI, A.; SHIMA, A.; ELBAGORY, A. R. M.; YAMASAKI, S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 69-76, 2016.

ORTOLANI, M. B. T.; MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; VICOSA, G. N.; CARVALHO, K. G.; SILVA JR. A.; NERO, L. A. Maciacular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2880–2886, 2010.

O'SHEA, E. F., COTTER, P. D., ROSS, R. P., HILL, C. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. **Current Opinion**

in **Biotechnology**, v. 24, p. 130-134, 2013.

PIARD, J. C.; DESMAZED, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

RENYE, J. A., SOMKUTI, G. A., GARABAL, J. I., DU, L. Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. **Food Control**, v, 22, p. 1887-1892, 2011.

RUEDA, P. A.; FERREIRA, C. L. L. F.; FURTADO, M. M.; FURTADO, C. F. Consumo de ácido cítrico e produção de diacetil por culturas lácticas produtoras de aroma em leites desnatados de vaca e de cabra. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 46, p. 10-14, 1991.

SALAUN, F.; MIETTON, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 2, p. 95-109, 2005.

SILVA, J. G.; ABREU, L. R.; RESPLANDE, F. A. Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 16-22, 2011.

THOMPSON-CRISPI, K.; ATALLA, H.; MIGLIOR, F.; MALLARD, B. A. Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 493, p. 1-10, 2014.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. **Dairy technology. Principles of milk farm units and processes.** Marcel Dekker, 412p. 2002.

WEHR, H. M.; FRANK, J. F. **Standard Methods for the examination of dairy products.** In: American public health association. 17th ed. Washington: PC, 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

Os isolados obtidos dos queijos fabricados com os diferentes tipos de fermento apresentaram diferença com relação às características fenotípicas avaliadas, mostrando que os queijos fabricados com o fermento tradicional (“pingo”) apresenta uma microbiota distinta dos fabricados com o fermento tipo “rala” ao longo da maturação.

A diferença na microbiota dos queijos fabricados com “pingo” e “rala” ao longo da maturação resultou em queijos com características microbiológicas, físicas e físico-químicas diferentes.

Os resultados desse estudo indicaram baixa similaridade entre os queijos fabricados com fermentos tipo “pingo” e “rala” para as características físicas, físico-químicas e microbiológicas, havendo necessidade da implementação de sistemas que auxiliem a padronização do processo de fabricação e a melhoria da qualidade dos queijos, como as boas práticas de fabricação.

A utilização do fermento endógeno, independente do tipo utilizado, influenciou diretamente no comportamento microbiano dos queijos, uma vez que os mesmos apresentaram significativa redução nas contagens de *Listeria monocytogenes*, coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ao longo da maturação.

Foi possível observar o fenômeno do antagonismo das bactérias do ácido lático sobre o crescimento de patógenos, com destaque a população de *S. aureus*.

Para os queijos fabricados com o “pingo”, 17 dias foi o período mínimo de maturação para que atingissem os padrões exigidos pela legislação. Por sua vez, os queijos fabricados com a “rala” somente atingiram os níveis de legislação aos 27 dias, indicando que a troca do fermento tradicional colaborou com o aumento da carga microbiana inicial e do período de maturação necessário para liberação desses queijos para o consumo.

A modificação dos equipamentos utilizados na fabricação dos queijos Minas artesanal e a falta de apoio aos produtores rurais resultou na utilização de um fermento desconhecido, o que deve ser revisto pelos

órgãos legislativos competentes, uma vez que esse tipo de tratamento não garante a segurança do produto, principalmente quando o mesmo se encontra com baixa qualidade microbiológica.

MATERIAL COMPLEMENTAR I – Termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado (a) voluntário (a),

Estamos realizando o estudo “Impacto da Adoção das Boas Práticas de Fabricação e do Tempo de Maturação na Qualidade Microbiológica dos Queijos Minas Artesanais Produzidos na Região do Serro – MG” e para isso gostaríamos da sua ajuda. Sua participação incluirá o fornecimento das seguintes informações: nome, endereço, telefone e email. Além disso, será aplicado um questionário a respeito dos produtores dos queijos, assim como aspectos relacionados à produção e comercialização dos mesmos.

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade verificar a segurança microbiológica dos queijos artesanais produzidos na região do Serro a partir de unidades registrados e adequados de acordo com a legislação vigente.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para a caracterização dos queijos artesanais produzidos em minha unidade, bem como a confirmação de sua qualidade, garantindo dessa forma, que o produto possa estar sendo distribuído com total segurança aos consumidores.
3. Terei que doar para a realização dessa pesquisa, os seguintes materiais: amostras do leite e do pingo utilizados como matéria prima para a fabricação dos queijos e os queijos oriundos da minha produção no dia da coleta. Terei que responder um longo questionário, cuja recusa não me causará nenhum dano e nenhuma penalidade. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de um ano, sendo que a visita e as coletas serão realizadas duas vezes ao ano.
4. Durante a execução do projeto poderão ocorrer riscos de constrangimento devido à coleta de informações de dados pessoais que serão atenuados com o devido sigilo de todos os dados informados. A coleta do material será realizada conforme procedimentos técnicos

- recomendados e usuais. Ao mesmo tempo estarei recebendo como benefícios pela minha participação os resultados referentes à pesquisa.
5. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos morais, físicos, financeiros ou religiosos.
 6. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo.
 7. Poderei deixar de participar do estudo a qualquer momento sem prejuízo do meu tratamento.
 8. Meu nome será mantido em sigilo, assegurado assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado dos resultados dessa pesquisa.
 9. O sucesso deste trabalho dependerá de minha participação, mas esta é voluntária, dessa forma não receberei nenhuma remuneração.

O trabalho é de interesse científico e está sob responsabilidade da Professora Dra Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira, professora da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esse estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFV. Qualquer transgressão das normas éticas, dúvidas ou solicitação de esclarecimentos, o(a) participante poderá recorrer a esse comitê, dirigindo-se a sua presidente: Patrícia Aurélia Del Nero, pessoalmente no endereço listado na última página deste documento, pelo telefone: (31) 3899-2492 ou pelo email: cep@ufv.br. Em qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimento o(a) participante poderá entrar em contato com a equipe científica pelo telefone (31) 3899-3813 (Laboratório de Culturas Láticas da Universidade Federal de Viçosa). Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo “Impacto da Adoção das Boas Práticas de Fabricação e do Tempo de Maturação na Qualidade Microbiológica dos Queijos Minas Artesanais Produzidos nas Regiões do Serro e Serra da Canastra – MG”, na qualidade de voluntário (a).

Viçosa, ____ de _____ de _____

Assinatura do voluntário

Atenciosamente, _____

Érika Carla da Costa Brumano DTA/UFV

MATERIAL COMPLEMENTAR II – Características fenotípicas dos isolados (MRS) de queijo Minas artesanal fabricado com “pingo”

| MRS/P1* | Morfologia | Produção de diacetil | Produção de catalase | Produção de exopolissacarídeo | Capacidade de acidificação | Resistência a NaCl | | Atividade antimicrobiana | | | |
|----------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | 2 % | 6 % | S.A | L.M | E.C | S.E |
| P1T2 1** | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | Alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 2 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 5 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 6 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T2 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T2 8 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T2 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | sim | sim | Não | Sim |
| P1T2 10 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T8 1 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | não | não | Não | Não |
| P1T8 2 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Média | Sim | Sim | não | não | Sim | Sim |
| P1T8 3 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T8 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | não | não | Sim | Sim |
| P1T8 5 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | não | Não | Não |
| P1T8 6 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T8 7 | bacilo, gram posito | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T8 8 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T8 9 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T8 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Alta | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T15 1 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T15 2 | coco, gram positivo | negativo | positivo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | não | não | Sim | Sim |
| P1T15 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T15 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T15 5 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | Baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T15 6 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | não | não | Sim | Não |
| P1T15 7 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | não | não | Não | Não |
| P1T15 8 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | sim | não | Não | Não |
| P1T15 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T15 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T22 1 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | não | não | Não | Não |
| P1T22 2 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | Negativo | Baixa | Sim | Sim | não | não | Não | Sim |
| P1T22 3 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T22 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 5 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 6 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 7 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 8 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T22 10 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T29 1 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T29 2 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T29 3 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Positivo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T29 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |
| P1T29 5 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T29 6 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | Negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T29 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T29 8 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T29 9 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T29 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Não | Não |

*Isolados obtidos do queijo fabricado com “pingo” e a partir do meio MRS; **identificação do isolado; P: identificação do produtor; T: período de maturação (dias); S.A – *Staphylococcus aureus*; L.M – *Listeria monocytogenes*; E.C – *Escherichia coli*; S.E – *Salmonella enteritidis*;

MATERIAL COMPLEMENTAR III – Características fenotípicas dos isolados (MRS) de queijo Minas artesanal fabricado com “rala”

| MRS/P12* | Morfologia | Produção de diacetil | Produção de catalase | Produção de exopolissacarídeo | Capacidade de acidificação | Resistência a NaCl | | Atividade antimicrobiana | | | |
|----------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | 2 % | 6 % | S.A | L.M | E.C | S.E |
| P1T2 1** | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T2 2 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T2 3 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T2 4 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | sim | sim | Sim | Sim |
| P1T2 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | não | sim | Sim | Sim |
| P1T2 6 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | não | sim | Sim | Não |
| P1T2 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | não | não | Não | Não |
| P1T2 8 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | Sim | não | não | Sim | Sim |
| P1T2 9 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Sim | Não |
| P1T2 10 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | média | Sim | sim | não | não | Sim | Sim |
| P1T8 1 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | não | Não | Sim |
| P1T8 2 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | não | Não | Não |
| P1T8 3 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | Não |
| P1T8 4 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | Não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T8 5 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | Sim |
| P1T8 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Sim | não |
| P1T8 7 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T8 8 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | não | Sim | não |
| P1T8 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Sim | não |
| P1T8 10 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T15 1 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | sim |
| P1T15 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T15 3 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T15 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | sim |
| P1T15 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 8 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 1 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 2 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 3 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 4 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 5 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | sim |
| P1T22 6 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 8 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 9 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 1 | bacilo, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | sim |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T29 2 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 3 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 8 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 9 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T29 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |

*Isolados obtidos do queijo fabricado com “rala” e a partir do meio MRS; **identificação do isolado; P: identificação do produtor; T: período de maturação (dias); S.A – *Staphylococcus aureus*; L.M – *Listeria monocytogenes*; E.C – *Escherichia coli*; S.E – *Salmonella enteritidis*;

MATERIAL COMPLEMENTAR IV – Características fenotípicas dos isolados (M17) de queijo Minas artesanal fabricado com “pingo”.

| M17/P1* | Morfologia | Produção de diacetil | Produção de catalase | Produção de exopolissacarídeo | Capacidade de acidificação | Resistência a NaCl | | Atividade antimicrobiana | | | |
|----------|---------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | 2 % | 6 % | S.A | L.M | E.C | S.E |
| P1T2 1** | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 2 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 5 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T2 6 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 7 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | não | Não | não |
| P1T2 8 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T2 9 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T8 1 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T8 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T8 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T8 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T8 5 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | média | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T8 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T8 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T8 8 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T8 9 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | alta | Sim | sim | sim | não | Não | não |
| P1T8 10 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 1 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T15 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | não | Sim | não |
| P1T15 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 8 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T15 9 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T15 10 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T22 1 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T22 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T22 3 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T22 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Não | não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T22 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T22 7 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T22 8 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T22 9 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | não | Sim | não |
| P1T22 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T29 1 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Sim | não |
| P1T29 2 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T29 3 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T29 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | sim | sim | Não | não |
| P1T29 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T29 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |
| P1T29 7 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Não | não |
| P1T29 8 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Não | não |
| P1T29 9 | bacilo, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Não | não |
| P1T29 10 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Não | não |

*Isolados obtidos do queijo fabricado com “pingo” e a partir do meio M17; **identificação do isolado; P: identificação do produtor; T: período de maturação (dias); S.A – *Staphylococcus aureus*; L.M – *Listeria monocytogenes*; E.C – *Escherichia coli*; S.E – *Salmonella enteritidis*;

MATERIAL COMPLEMENTAR V – Características fenotípicas dos isolados (M17) de queijo Minas artesanal fabricado com “rala”.

| M17/P12* | Morfologia | Produção de diacetil | Produção de catalase | Produção de exopolissacarídeo | Capacidade de acidificação | Resistência a NaCl | | Atividade antimicrobiana | | | |
|----------|---------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|-----|--------------------------|-----|-----|-----|
| | | | | | | 2 % | 6 % | S.A | L.M | E.C | S.E |
| P1T2 1** | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | Sim | não |
| P1T2 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | Não | não |

| | | | | | | | | | | | |
|---------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T2 3 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | Não | não |
| P1T2 4 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T2 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T2 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | Sim | sim | não | não | não | não |
| P1T2 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T2 8 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | Sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T2 9 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | média | sim | sim | não | sim | sim | não |
| P1T2 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T8 1 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | sim | não | não |
| P1T8 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | sim | não |
| P1T8 3 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | média | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T8 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T8 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T8 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | sim | não |
| P1T8 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T8 8 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T8 9 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | sim | não |
| P1T8 10 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | sim | não |
| P1T15 1 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | não | não |
| P1T15 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | não | não |
| P1T15 3 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T15 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T15 5 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T15 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T15 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | sim | não | não |
| P1T15 8 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T15 9 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | não | não |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------------------|----------|----------|----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P1T15 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | sim | não |
| P1T22 1 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | não | não |
| P1T22 2 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 3 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 4 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 5 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T22 6 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | não | sim | não |
| P1T22 7 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 8 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 9 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T22 10 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | sim | não | não |
| P1T29 1 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | sim | sim | sim | não |
| P1T29 2 | coco, gram positivo | negativo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 3 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 4 | bacilo, gram negativo | negativo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 5 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 6 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 7 | coco, gram positivo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 8 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 9 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |
| P1T29 10 | bacilo, gram negativo | Positivo | negativo | negativo | baixa | sim | sim | não | não | não | não |

*Isolados obtidos do queijo fabricado com “rala” e a partir do meio M17; **identificação do isolado; P: identificação do produtor; T: período de maturação (dias); S.A – *Staphylococcus aureus*; L.M – *Listeria monocytogenes*; E.C – *Escherichia coli*; S.E – *Salmonella enteritidis*;