

Maria de Fátima Silva de Resende

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA SERRA DA CANASTRA:
INFLUÊNCIA DA ALTITUDE E DO NÍVEL DE
CADASTRAMENTO DAS QUEIJARIAS NAS CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2010


R433q Resende, Maria de Fátima Silva de, 1980-
Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas / Maria de Fátima Silva de Resende. - 2010.
72 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

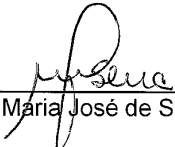
1. Queijo-de-minas - Análise - Teses. 2. Queijo-de-minas - Qualidade - Teses.
3. Queijo-de-minas - Microbiologia - Teses. I. Souza, Marcelo Resende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD - 637.3

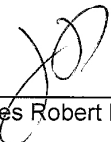
Dissertação defendida e aprovada em 04 de março de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente



Profª. Maria José de Sena



Prof. Jacques Robert Nicoli

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha família.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Resende de Souza, pelos ensinamentos, confiança e amizade, desde a graduação.

Ao meu co-orientador, Professor Álvaro Cantini Nunes, pela acolhida e importante contribuição a realização deste trabalho.

Aos membros da banca de dissertação, Professores Jacques Robert Nicoli e Maria José de Sena, pelas sugestões e presença.

À Professora Cláudia Penna pelo apoio e amizade.

Aos professores do DTIPOA.

Aos funcionários do DTIPOA – Evaldo, Fatinha, Marco Antônio, Maura, Miltinho, Taynara e Valéria - pela ajuda indispensável e paciência.

Aos amigos de pós-graduação, Adriano Cunha, Alice Drummond, Bianca Seridan, Cláudio Paiva, Débora Pinheiro, Elisa Andrade, Fernanda Andrade, Hugo Costa e Isabela Oliveira. Obrigada por toda ajuda durante o experimento, pelos momentos de descontração e pela convivência maravilhosa e inesquecível.

Aos meus “estagiários”, Guilherme Lamego, Leonardo Acúrcio, Mário Abatemarco e Vitor Viggiano, pela colaboração imprescindível durante a condução do experimento.

Ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do ICB.

A todos do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitos do ICB, em especial ao João Moreira, pela disponibilidade e ajuda.

Ao LabUFMG pela realização das análises de leite deste experimento.

À EMATER-MG, especialmente Elmer Luiz de Almeida, Marinalva Soares e Viviani de Melo, pelo total apoio durante a realização deste projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1.	Histórico da produção de queijos	14
2.2.	Queijos artesanais do Brasil	15
2.3.	Queijo Minas artesanal	15
2.3.1.	Histórico	15
2.3.2.	Aspectos legais da produção de Queijo Minas artesanal	15
2.3.3.	Caracterização do queijo Minas artesanal	16
2.4.	Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra	17
2.4.1.	Caracterização regional	17
2.4.2.	Aspectos agroecológicos	18
2.4.3.	Processo de produção do queijo	18
2.5.	Qualidade dos queijos artesanais produzidos no Brasil	19
2.6.	Bactérias ácido-lácticas (BAL)	21
2.7.	Bactérias ácido-lácticas em queijos artesanais	22
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Aquisição do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e amostragem	24
3.2.	Avaliação microbiológica e contagem de células somáticas de leite	25
3.3.	Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal	25
3.3.1.	Pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C	25
3.3.2.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	25
3.3.3.	Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp.	26
3.3.4.	Pesquisa de bolores e leveduras	26
3.4.	Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e purificação de bactérias ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal	26
3.5.	Identificação dos isolados de bactérias ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal de acordo com técnicas de Biologia Molecular	27
3.6.	Avaliação físico-química	30
3.6.1.	Leite	30
3.6.2.	Queijo Minas artesanal	31
3.7.	Análise Estatística	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1.	Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas do leite	31
4.2.	Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal	34
4.3.	Isolamento, enumeração e caracterização fisiológica de bactérias ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal	38
4.3.1.	Isolamento e enumeração	38
4.3.2.	Caracterização fisiológica	41
4.4.	Identificação de bactérias ácido-lácticas isoladas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal, de acordo com técnicas de Biologia Molecular	43
4.5.	Qualidade físico-química de leite	49
4.6.	Qualidade físico-química do queijo Minas artesanal	51
5.	CONCLUSÕES	53
6.	PERPECTIVAS FUTURAS	54

7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8.	ANEXOS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) da contagem bacteriana total e da contagem de células somáticas de leite coletado em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	31
Tabela 2 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) da contagem bacteriana total e da contagem de células somáticas de leite coletado em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	32
Tabela 3 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) de parâmetros microbiológicos de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	34
Tabela 4 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros microbiológicos de amostras de queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	34
Tabela 5 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) das contagens de BAL, isoladas em ágar MRS e ágar M17, em amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais nas diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	38
Tabela 6 -	Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) das contagens de BAL em amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	39
Tabela 7 -	Características fisiológicas (morfologia, coloração de Gram e teste de catalase) de microrganismos isolados em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite (n=18), soro-fermento (n=18) e queijo Minas artesanal (n=18) coletadas na região da Serra da Canastra (MG)	42
Tabela 8 -	Bactérias ácido-lácticas isoladas em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	45
Tabela 9 -	Bactérias ácido-lácticas isoladas em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	46

Tabela 10 -	Resultados médios (\bar{x}) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de leite coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	50
Tabela 11 -	Resultados médios (\bar{x}) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de leite coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	50
Tabela 12 -	Resultados médios e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)	51
Tabela 13 -	Resultados médios e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Parâmetros microbiológicos estabelecidos pelo Decreto nº 44.864, para inspeção de queijo Minas artesanal, e determinados pela Portaria nº146, para queijos industrializados	16
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	PCR 16S-23S de DNA de algumas amostras de microrganismos fermentadores de lactose, isolados de queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra, em ágar MRS	65
Figura 2 -	PCR 16S-23S de DNA de algumas amostras de microrganismos fermentadores de lactose, isolados de queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra, em ágar M17	65
Figura 3 -	Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como <i>Lactobacillus casei</i>	67
Figura 4 -	Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	67
Figura 5 -	Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como <i>Lactobacillus hilgardii</i>	68

Figura 6 -	Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como <i>Weissella paramesenteroides</i>	68
Figura 7 -	Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como <i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum</i>	69
Figura 8 -	Produtos da amplificação da região do gene <i>recA</i> a partir da técnica de PCR <i>multiplex</i> de algumas amostras de culturas identificadas como <i>Lactobacillus plantarum/Lactobacillus paraplantarum</i>	69

ANEXOS

Anexo 1 -	Percentual de microrganismos isolados de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (MG) que apresentaram crescimento nas condições de cultivo do teste respiratório	64
Anexo 2 -	Amplificação da região intergênica 16S-23S por PCR	65
Anexo 3 -	Perfil de restrição enzimática dos fragmentos amplificados por PCR do espaçador 16S-23S rDNA de diferentes espécies de BAL isoladas de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (MG)	66
Anexo 4 -	Restrição enzimática dos produtos de PCR	67
Anexo 5 -	Contagem das populações de bactérias ácido-láticas (UFC/g) isoladas de 18 amostras de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra (MG) em ágar MRS	70
Anexo 6 -	Contagem das populações de bactérias ácido-láticas (UFC/g) isoladas de 18 amostras de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra (MG) em ágar M17	71

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitros
$^{\circ}\text{D}$	Graus Dornic
ARDRA	Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado
BAL	Bactérias ácido-lácticas
BSA	Albumina sérica bovina
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CO_2	Dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EMATER-MG	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
g	Grama
GES	Gordura no extrato seco
H_2	Hidrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Cloreto de hidrogênio
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LabUFMG	Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG
m	Metros
M	Molar
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
N_2	Nitrogênio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	Número mais provável
PCR	Reação de polimerização em cadeia
rDNA	DNA ribossomal
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Volts
<i>W.</i>	<i>Weissella</i>

RESUMO

Em Minas Gerais, a produção de queijo Minas artesanal é uma atividade tradicional de vários municípios, além de ser a principal atividade geradora de renda. As informações sobre o queijo Minas artesanal, produzido na região da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nesta ainda são limitadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da altitude e do tipo de cadastramento oficial pelo Instituto Mineiro de Agropecuária das queijarias sobre características microbiológicas e físico-químicas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra. Foram coletadas amostras de leite, soro-fermento e queijo de 18 propriedades rurais localizadas na região da Serra da Canastra, distribuídas em três níveis de altitude e dois estágios de cadastramento oficial. As médias da CBT e da CCS das amostras de leite foram semelhantes ($p > 0,05$), independentemente da altitude e cadastramento. Houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias de NMP de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C das amostras de queijo quando foi considerado o tipo de cadastramento. *Staphylococcus* spp. foi encontrado em contagens elevadas em queijos produzidos em queijarias cadastradas e não cadastradas nas diferentes altitudes. *Salmonella* spp. não foi isolado nas amostras de queijo. Elevadas populações de bactérias ácido-lácticas (BAL) foram observadas nas amostras de leite, soro-fermento e queijo. A altitude foi relevante nas contagens média de BAL nas amostras de queijo. Os gêneros de BAL mais frequentemente isolados de leite, soro-fermento e queijo foram *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, respectivamente. As espécies de BAL mais isoladas em queijo foram *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, sendo que *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus paraplantarum* foram isolado de queijos, sem haver descrições prévias na literatura consultada. As amostras de leite provenientes de queijarias cadastradas apresentaram teores percentuais de gordura e EST mais elevados e verificou-se falta de padronização processo de produção do queijo nas diferentes queijarias. Os resultados deste trabalho mostraram a necessidade de melhorias no controle do processo de produção do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, visando à obtenção de um produto de qualidade uniforme e garantindo segurança alimentar á um alimento tradicional considerado como “Patrimônio Cultural Brasileiro”.

Palavras chave: Queijo Minas artesanal, inspeção, microbiologia, físico-química, qualidade

ABSTRACT

The production of Minas artisanal cheese is traditional in Minas Gerais State and there are few data about the microbiota present in this food. The influences of altitude and official registration at the state inspection office (SIO) on the microbiological and physical-chemical characteristics of *Serra da Canastra* Minas artisanal cheese were evaluated. Samples of milk, cheese whey, and cheese from 18 rural properties were analyzed. Means of most probable number of coliforms in cheeses were different ($P < 0.05$) considering the registration at the SIO. *Staphylococcus* spp. was found in high numbers in cheeses, irrespectively of the studied factors. *Salmonella* spp. was not isolated in the samples of cheese. High counts of lactic acid bacteria (LAB) were observed in all samples, being mostly affected by the altitude. *Enterococcus*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* were predominantly identified (PCR ARDRA-16S-23S) in milk, cheese whey, and cheese samples, respectively. In cheeses, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum* were the major LAB. *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus paraplantarum* were also identified and it is probably the first description of these LAB in artisanal cheese. Indeed, improvement in this cheese making is strongly recommended in order to obtain a uniform quality product considering it as a “Brazilian Cultural Patrimony”.

Keywords: Minas artisanal cheese, inspection, microbiology, physical-chemical, quality

1. INTRODUÇÃO

Os produtos artesanais participam da identidade sócio-cultural e gastronômica de um povo, constituindo patrimônio que merece ser preservado (Machado, 2002). Alguns tipos de queijo são produzidos artesanalmente em diversas regiões do mundo, apresentando grande variedade quanto às características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas. Os queijos artesanais seriam aqueles produzidos de forma única e tradicional, com limitado grau de mecanização (Kupiec e Revell, 1998).

Os queijos são alimentos fermentados elaborados a partir do leite e que, devido ao processo de fermentação, apresentam uma microbiota bastante diversificada, podendo ser constituída de microrganismos desejáveis e indesejáveis. As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem importante exemplo de microrganismos desejáveis presentes nos diferentes tipos de queijo. No entanto, microrganismos indesejáveis deteriorantes e/ou patogênicos também podem estar presentes nos queijos, em função de contaminações resultantes de higiene deficitária, relacionada a todo o processo de produção, desde a obtenção do leite até o consumo do produto final (Guedes Neto, 2004).

Embora conhecidos e procurados pelo consumidor, os queijos artesanais brasileiros nem sempre possuem a segurança alimentar adequada. Os queijos artesanais, quando produzidos a partir de leite obtido higienicamente e oriundo de vacas sadias mantidas sobre pastos naturais, podem apresentar características de segurança sanitária para o consumidor. Os queijos elaborados com leite cru, produzidos a partir de matéria-prima obtida de animais sadios, apresentam propriedades sensoriais diferenciadas dos demais queijos obtidos a partir de leite pasteurizado (Vargas *et al.*, 1998).

Em Minas Gerais, a produção de queijo Minas artesanal é uma atividade tradicional de vários municípios e, além de ser a principal atividade geradora de renda, está incorporada à identidade sócio-cultural da população mineira (Furtado, 1980). Com pequenas diferenças, tratadas como “segredos bem guardados”, cada fazenda produtora de queijo Minas artesanal busca dar uma especificidade ao seu produto (Meneses, 2006).

A Secretaria de Estado da Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais (SEAPA-MG) criou, em 2002, o Programa de Melhoria do Queijo Minas Artesanal. O Programa, executado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), em parceria com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), tem como objetivos garantir a segurança alimentar, a partir do controle sanitário do rebanho e das boas práticas no processo de produção, incentivar e fortalecer a organização dos produtores, cadastrar os produtores e definir a cadeia produtiva do queijo artesanal (Instituto..., 2009).

Estudos históricos, agro-geológicos e de condições de solo e clima identificam as regiões tradicionalmente produtoras do queijo Minas artesanal, elaborado a partir de leite cru (Instituto..., 2009). A EMATER-MG identificou quatro microrregiões tradicionais de produção do queijo Minas artesanal: Araxá, Cerrado, Serra da Canastra e Serro. Nestas regiões, existem cerca de 9.015 produtores de queijo artesanal, com uma produção anual de 26.000 toneladas. Além desta relevância econômica, dados mostram a geração de 26.500 empregos diretos no setor, acusando a importância social do produto. Também é expressiva a área de abrangência destas regiões, ocupando 55.527 km² em 46 municípios (Almeida e Soares, 2008).

Em 2009, a microrregião do Campo das Vertentes foi reconhecida como produtora no Programa de Melhoria do Queijo Minas Artesanal (Minas Gerais, 2009). Com a inclusão desta microrregião, o número de municípios mineiros pertencentes ao Programa subiu para 62.

O queijo Minas artesanal da Serra de Canastra só é produzido nesta região, onde se combinam, de maneira única, solo, pastagem, clima, altitude e água (Silva, 2007). As informações sobre o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nesta microbiota ainda são limitadas.

Considerando a realidade de elaboração de queijos artesanais e sua importância sócio-econômica, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a influência da altitude e do nível de cadastramento dos produtores (condições higiênico-sanitárias das queijarias) em características físico-químicas e microbiológicas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra; identificar microrganismos desejáveis e indesejáveis presentes no queijo; isolar, quantificar e identificar, ao nível de espécie, as bactérias ácido-lácticas predominantes; relacionar a microbiota presente no leite e no soro-fermento (“pingo”) com as características físico-químicas e microbiológicas do queijo e, finalmente, verificar a influência da altitude e do cadastramento oficial pelo IMA das queijarias na microbiota do queijo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da produção de queijos

Por definição oficial, queijo é o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite (integral, parcialmente desnatado ou desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho ou outros coagulantes apropriados, e

submetido aos processamentos necessários a formação das características próprias de cada tipo (Brasil, 1996).

O queijo é um dos alimentos processados mais antigos registrados pela história da humanidade. Acredita-se que tenha sido originado na região entre os rios Tigre e Eufrates, no Iraque, há aproximadamente 8.000 anos, época na qual os animais começavam a ser domesticados. (Fox, 1993).

Os queijos contribuíram significativamente para o desenvolvimento das civilizações. Historicamente, esse alimento permitiu a sobrevivência de populações em períodos de fome e forneceram nutrientes vitais à boa saúde, tornando-se alimento desejável na dieta humana diária (Kosikowsky, 1970).

Na antigüidade clássica, Grécia e Império Romano testemunharam a produção de queijos. A produção de queijo fresco em Roma era feita pela adição do *coagulum*, extraído do quarto estômago de cordeiro ou cabrito, ao leite. O leite coagulado era espremido para a retirada do soro, salpicado e deixado endurecer ao sol. Atribui-se, então, a Roma a consolidação da produção de queijos, segundo normas de qualidade e técnicas de produção, o que garantiu ao produto prestígio de alimento nobre (Kosikowsky, 1970).

Durante a Idade Média, a Igreja Católica começou a participar mais ativamente na economia da Europa Ocidental, principalmente com a produção de queijos realizada em mosteiros. Os monges introduziram inovações na fabricação do produto, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de muitos tipos de queijos comercializados atualmente (Kosikowsky, 1970).

Mais de 1.000 variedades de queijos são produzidas atualmente no mundo, com uma produção que excede a 14 milhões de

toneladas. O Brasil, com uma produção anual de 640 mil toneladas de queijos, ocupa o terceiro lugar no cenário mundial, sendo superado apenas pela União Européia e pelos Estados Unidos (Estatísticas..., 2008). As variedades de queijos mais produzidas no Brasil incluem os queijos tipo mussarela, prato, requeijão e Minas frescal (Estatísticas..., 2008).

2.2. Queijos artesanais do Brasil

A produção de queijos artesanais no Brasil iniciou-se no período colonial por portugueses que traziam consigo rebanhos bovinos. Os animais tinham parte de sua escassa produção leiteira destinada à fabricação de um queijo frescal, semelhante ao da Serra de Estrela, de Portugal. A diferença entre o queijo português e o produzido no Brasil referia-se ao tipo de material usado para coagulação do leite. Em Portugal, eram utilizados extratos de flores e brotos de cardo silvestre (*Cynara cardunculus* L.), que no Brasil foram substituídos por estômago seco e salgado de mocó, bezerro ou cabrito (Ribeiro, 1959).

No Brasil, são considerados como artesanais o queijo Minas, produzido nas regiões de Araxá, Serra da Canastra, Cerrado, Serro e Campo das Vertentes, no estado de Minas Gerais; o queijo de Coalho e o queijo de Manteiga, produzidos na Região Nordeste; o queijo Serrano e o queijo Colonial, produzidos na Região Sul; e o queijo Caipira, produzido no estado do Mato Grosso do Sul. As estatísticas sobre a produção e consumo de queijos artesanais brasileiros são escassas (Instituto..., 2009; Silva, 2007).

2.3. Queijo Minas artesanal

2.3.1. Histórico

A produção e consumo de queijo em Minas Gerais se confundem com a história do povoamento local, iniciado com a busca de

minerais e pedras preciosas, ainda no século XVIII. Segundo Ribeiro (1959), a produção de queijo Minas em fazendas era semelhante a do queijo Serra da Estrela de Portugal. Os primeiros produtores do queijo Minas teriam sido os ilhéus portugueses estabelecidos no interior de Minas Gerais, ainda no período colonial (Brown, [193-]).

Relatos de naturalistas, contratados à época do Brasil Colônia, são ricos em descrições detalhadas da vegetação, tipo de solo, serras, rios e habitantes das Minas Gerais. Entre os costumes e hábitos alimentares descritos, o queijo, produzido de forma artesanal, já era incluído (Empresa..., 2004).

2.3.2. Aspectos legais da produção de queijo Minas artesanal

A legislação brasileira permite a comercialização de queijos elaborados a partir de leite cru, regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal, desde que o produto seja submetido ao tempo mínimo de 60 dias de maturação (Brasil, 2000).

Diante da possibilidade de retaliações ao comércio do queijo Minas artesanal, as principais regiões produtoras (Serro, Serra da Canastra e Cerrado, com seus respectivos municípios) têm se mobilizado em defesa do queijo tradicional fresco ou maturado (meiacura), reivindicando a diminuição do período de maturação determinado pela legislação federal (Ornelas, 2005). Os produtores alegam que este período de maturação ocasionaria perda das características sensoriais tradicionais do queijo, além de aumentar os custos com a estocagem do produto (Brant, 2003).

O governo estadual de Minas Gerais, no intuito de resguardar a produção artesanal do queijo Minas, elaborou e publicou a Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal (Minas Gerais, 2002b). Essa lei definiu normas de fabricação, de

embalagem e de transporte do queijo artesanal, estabelecendo ainda a obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias junto ao IMA.

Segundo o Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002 (Minas Gerais, 2002a), que regulamentou o processo de produção do queijo Minas artesanal, o IMA certificará as condições higiênico-sanitárias necessárias para produção do queijo artesanal, observando a higiene dos manipuladores, os processos de obtenção do leite e de elaboração do queijo, o armazenamento e o transporte do queijo para comercialização, bem como a sanidade do rebanho.

Para obter essa certificação, o produtor de queijo Minas artesanal que se encontre em cada uma das microrregiões tradicionais deve se cadastrar junto ao IMA, mediante apresentação dos seguintes documentos: exame médico dos manipuladores; cópia do cartão de controle sanitário que comprove a vacinação do rebanho contra a febre aftosa e contra a raiva dos herbívoros; atestado de vacinação do rebanho contra brucelose e atestado de teste negativo contra brucelose e

tuberculose, emitido por médico veterinário credenciado; resultado de exame microbiológico e físico-químico da água, emitido por laboratório credenciado pelo IMA; resultado de exame microbiológico e físico-químico do leite e queijo, emitido por laboratório credenciado pelo IMA, para as queijarias já existentes; planta baixa da propriedade contendo localização do curral, sala de ordenha, queijaria com equipamentos e pontos de água e de esgotos, na escala de 1/100; carta-compromisso, com firma reconhecida, na qual o produtor assume a responsabilidade pelo queijo artesanal produzido; modelo do rótulo a ser utilizado no queijo; laudo técnico da queijaria preenchido e assinado por médico veterinário (Minas Gerais, 2002a).

O Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008), estabeleceu alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos para o queijo Minas artesanal. Alguns parâmetros analíticos considerados neste decreto estão descritos no Quadro 1, sendo os mesmos idênticos aos da legislação federal (Brasil, 1996) para queijos de média umidade (entre 36% e 45,9%).

Quadro 1. Parâmetros microbiológicos estabelecidos pelo Decreto nº 44.864, para inspeção de queijo Minas artesanal, e determinados pela Portaria nº146, para queijos industrializados de média umidade (36% a 45,9%)

Parâmetro microbiológico*	Critérios de inspeção	
	Estadual (Decreto nº 44.864)	Federal (Portaria nº 146)
Pesquisa de coliformes 30° C (NMP/g)	n = 5; c = 2; m = 1.000; M = 5.000	
Pesquisa de coliformes 45° C (NMP/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 500	
Enumeração de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC/g)	n = 5; c = 2; m = 100; M = 1.000	
Pesquisa de <i>Listeria</i> spp./25g	n = 5; c = 0; m = 0	
Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp./25g	n = 5; c = 0; m = 0	

* Plano de amostragem (n; c; m; M) segundo Brasil (2001)

Fontes: Minas Gerais (2008); Brasil (1996)

2.3.3. Caracterização do queijo Minas artesanal

O queijo Minas artesanal é aquele elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, integral e recém-obtido, e que utiliza em sua produção somente a quimosina pura de bezerro e, no ato da

prensagem, apenas o processo manual. O produto final apresenta consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme e isenção de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde foi produzido (Minas Gerais, 2002a).

O início do processamento do queijo Minas artesanal deve ser até 90 minutos após o início da ordenha e a produção deve ser com leite que não tenha sofrido tratamento térmico, utilizando-se como ingredientes culturas lácticas naturais (“pingo”, soro fermentado ou soro-fermento), coalho e sal (Minas Gerais, 2002b). “Pingo” é a denominação utilizada para uma fração de soro fermentado, originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior, que é coletado e utilizado como fermento. A composição do soro-fermento é característica de cada região produtora e contém culturas lácticas selecionadas. A composição destas culturas varia entre as regiões mineiras e, até mesmo, entre produtores de uma mesma região. O soro-fermento é responsável pelas características sensoriais peculiares do queijo Minas artesanal (Leite, 1993).

O Conselho Consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) aprovou em 15 de maio de 2008, por aclamação, o registro do Modo Artesanal de Fazer o Queijo de Minas como patrimônio imaterial brasileiro. O IPHAN inventariou as regiões do Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Cerrado), onde predominam fazendas que mantêm a tradição de fazer um queijo reconhecido mundialmente como “artesanal tipo Minas”. Cada uma dessas regiões forjou um modo de fazer próprio, expressado na forma de manipulação do leite, dos coalhos, do soro-fermento e das massas, na prensagem, na cura e até no comércio. O registro poderá incentivar o aumento da cooperatividade e da associatividade dos produtores em outras

regiões, além da criação de empregos e de infra-estrutura onde houver necessidade (Ascom, 2008).

2.4. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra

2.4.1. Caracterização regional

A região da Serra da Canastra localiza-se no sudoeste de Minas Gerais. Suas coordenadas apontam para 47° 30’ de longitude Oeste, 45° 30’ de longitude Leste e 19° 45’ a 20° 34’ de latitude Sul. Privilegiada pela localização próxima a grandes centros consumidores, pela grande quantidade de água e pelo clima ameno, a região tem na agropecuária uma das principais fontes de riqueza (Empresa..., 2004).

Os primeiros habitantes da Serra da Canastra descendem dos índios Caiapós e Cataguases, além dos quilombos que foram numerosos por toda a região. Famílias oriundas de São João del Rei, Barbacena e do Sul de Minas se deslocaram para a Canastra em busca de diamantes e outras pedras preciosas (Empresa..., 2004).

Na microrregião da Canastra, a produção de queijo artesanal é feita de modo tradicional nos seguintes municípios: Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí e Vargem Bonita. A microrregião é formada por pequenos municípios, sendo que alguns deles ainda apresentam bom número de pessoas no campo. Grande parte da produção de queijos desta região é comercializada nos mercados de Belo Horizonte e São Paulo (Empresa..., 2004).

Segundo informações fornecidas pela EMATER-MG¹, existem na região da Serra da Canastra, atualmente, cerca de 1.350 produtores de queijo Minas artesanal. Destes produtores, apenas 21 estão devidamente

¹ Comunicação pessoal

cadastrados no IMA. Os produtores cadastrados estão distribuídos nos municípios de São Roque de Minas, Medeiros e Tapiraí.

2.4.2. Aspectos agroecológicos

O clima caracterizado na região da Serra da Canastra é classificado como tropical de altitude, com temperatura média anual em torno de 22,2°C. As chuvas na região estão distribuídas entre os meses de outubro a março, com índice pluviométrico médio em torno de 1.390 mm anuais. A umidade do ar é típica de cerrado, com inverno seco e verão úmido. O relevo, constituído de chapadões de altitude, permite o aparecimento de inúmeras nascentes e cachoeiras. A altitude na região da Canastra varia de 637 a 1.485 metros (Empresa..., 2004).

Além das características físicas, os fatores edafo-climáticos encontrados são favoráveis à produção do queijo Minas artesanal na Serra da Canastra, certamente devido a um ambiente propício ao desenvolvimento de bactérias endógenas responsáveis pelo sabor característico do queijo. Esta microbiota endógena da região encontra-se presente no soro-fermento que é adicionado ao leite cru durante o processo de produção do queijo (Silva, 2007). A microbiota endógena presente no leite cru é mais complexa do que os fermentos industriais adicionados ao leite durante a fabricação dos queijos e desempenham forte influência na lipólise e proteólise, originando compostos responsáveis pelas características de aroma e textura, além de produzirem substâncias capazes de inibir a presença de microrganismos patogênicos (Cabezas *et al.*, 2007).

As pesquisas a respeito da diversidade de bactérias endógenas encontradas no queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra ainda são escassas. Borelli (2006), estudando o queijo artesanal da Serra da

Canastra produzido no município de São Roque de Minas, caracterizou a microbiota envolvida no processo de produção e maturação deste alimento. O autor frisa que a microbiota presente no queijo, responsável pela fermentação e maturação, é proveniente do ambiente, do leite e do soro-fermento.

2.4.3. Processo de produção do queijo

O processo de produção do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra inclui diversas etapas. O leite é obtido por meio de ordenha mecânica ou manual, em locais apropriados, cobertos ou não. Em seguida, é filtrado em filtros ou por meio de tecido sintético lavado e desinfetado. O soro-fermento e o coalho são adicionados ao leite e espera-se o tempo de coagulação. Decorrido este tempo, é feito o corte da massa com pá, aproximadamente 50 minutos após a adição do coalho. A mexedura é feita em pequenos intervalos para facilitar o dessoramento. Após a separação do soro, a massa do queijo é colocada em formas circulares, revestidas com tecido sintético. Na fase final, a prensagem é feita com auxílio da pressão e calor das mãos. A massa enformada recebe o sal grosso ou triturado em uma das superfícies. Depois de um período que varia entre seis a doze horas, vira-se o queijo e repete-se o processo de salga. Após 24 horas, o queijo é retirado da forma, colocado em prateleiras de madeira, lavado e seco diariamente, durante sete a oito dias (Ornelas, 2005).

O queijo Minas artesanal da Serra da Canastra apresenta, como características físico-químicas e sensoriais: consistência semidura com tendência a macia, de natureza “manteigosa”; textura compacta; cor branco-amarelada; crosta fina, amarelada e sem trincas; formato cilíndrico; altura entre 4,0 e 6,0 cm; diâmetro de 15,0 a 17,0 cm; peso de 1,0 a 1,2 Kg; e sabor ligeiramente ácido, não picante e agradável (Empresa..., 2004).

Silva (2007), Ornelas (2005) e Borelli (2002) observaram grande variação entre a quantidade de soro-fermento, coalho e tempo de coagulação na produção de queijo Minas artesanal em propriedades rurais da Serra da Canastra, causando diferenças nos resultados dos parâmetros físico-químicos do queijo artesanal. Isto preocupa, pois poderia levar a uma descaracterização dos padrões de identidade e de qualidade desses queijos.

2.5. Qualidade dos queijos artesanais produzidos no Brasil

Trabalhos científicos avaliando os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado diversos problemas relacionados à qualidade microbiológica e físico-química desses produtos. As falhas na aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas são alguns dos fatores que comprometem a qualidade dos queijos artesanais.

Em pesquisa realizada com queijos Coloniais em Santa Catarina, Rossi *et al.* (2007) encontraram apenas 8,57% das amostras apropriadas pra consumo. Das 35 amostras analisadas, 85,71% apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo acima de 10^5 UFC/g, representando um risco potencial à saúde do consumidor. Os autores verificaram ainda amostras positivas para *Salmonella* spp. (6%) e *Listeria monocytogenes* (6%).

A qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em estabelecimentos de beira de estrada no Rio Grande do Sul foi investigada por Zaffari *et al.* (2007). Todas as amostras apresentaram coliformes totais, enquanto que 84% delas registraram contagens acima de 500 UFC/g para coliformes termotolerantes. *Listeria* spp. foi encontrada em 16% das amostras, sendo 3,7% identificadas como *Listeria*

monocytogenes. Segundo os autores, medidas que visem à proteção da saúde da população e que auxiliem no crescimento econômico dos produtores devem ser desenvolvidas, enfocando o incentivo à produção de queijos por cooperativas que adotem boas práticas de fabricação.

Ide e Benedet (2001) avaliaram os constituintes físico-químicos (teores de gordura, proteína e cloretos) e pH de amostras de queijo Colonial produzidos na região Serrana de Santa Catarina. Pela diversidade de valores encontrados no resultado das análises, os autores verificam a inexistência de padrão de técnicas de fabricação entre as fazendas produtoras.

Santana *et al.* (2008), analisando amostras de queijo de coalho comercializadas em Aracaju (Sergipe), classificaram todas como impróprias ao consumo humano. Os autores encontraram amostras positivas para *Salmonella* spp. (26,7%), *Staphylococcus* coagulase positivo (46,7%), coliformes totais (93,3%) e coliformes termotolerantes (80%).

Em estudo microbiológico de queijo de coalho comercializadas nas praias da Salvador (Bahia), Oliveira *et al.* (2007) verificaram contagens elevadas para coliformes totais e bolores e leveduras em todas as amostras. Para os autores, condições inadequadas de armazenamento, comercialização e refrigeração interferem na segurança alimentar do produto.

Feitosa *et al.* (2003) avaliaram a qualidade microbiológica de queijo de coalho e queijo de manteiga artesanais produzidos no Rio Grande do Norte. Altos índices de contaminação com coliformes totais e bolores e leveduras foram verificados nos dois queijos avaliados. *Staphylococcus* coagulase positivo foi detectado em 72,7% e 84,7% das amostras de queijos de coalho e de manteiga, respectivamente. *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. foram detectados em 9%

das amostras de queijo de coalho. No queijo de manteiga, 15% das amostras foram positivas para *Listeria* spp. e *Salmonella* spp.

Sena (2000) isolou e identificou *Staphylococcus* spp. em queijos de coalho comercializados em Recife (Pernambuco). Das 107 amostras analisadas, 98,1 % apresentaram-se contaminadas com 10^3 a 10^7 UFC de *Staphylococcus* spp. por grama de queijo, com valor médio de 10^6 UFC/g. Segundo o autor, os níveis encontrados demonstram risco potencial à saúde pública.

A qualidade físico-química de queijo de coalho e queijo de manteiga comercializados em Natal (Rio Grande do Norte) foi investigada por Nassu *et al.* (2006). Os resultados demonstraram diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados, com exceção para umidade e cinzas para as amostras de queijo de coalho, enquanto que para o queijo de manteiga não foram encontradas diferenças significativas para os parâmetros cloretos e nitrogênio não protéico. Os resultados demonstraram grande variabilidade entre as amostras, o que indica formas diversas de processamento, principalmente no cozimento ou não da massa e na prensagem.

Em Minas Gerais, a qualidade do queijo artesanal foi pesquisada por Menezes *et al.* (2009). Das amostras analisadas, 57% estavam acima dos limites microbiológicos exigidos pela legislação em um ou mais parâmetros. Contagens inaceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positivo e coagulase negativo foram registradas em 42,5% e 51,7% das amostras, respectivamente. *Salmonella* spp. foi detectado em 1,12% das amostras. Segundo os autores, esta condição é indesejável, uma vez que o queijo Minas artesanal não passa por qualquer tratamento que vise eliminar esses microrganismos nocivos à saúde pública.

Amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas Canastra, fresco e maturado, coletadas por Pereira *et al.* (2008) em fazendas na região da Serra de Canastra, foram avaliadas quanto a presença de coliformes. Das amostras de leite avaliadas, 25% apresentaram contagens elevadas para coliformes totais e termotolerantes. A contaminação do soro-fermento por coliformes totais foi detectada em 25% das amostras. Contagens acima de 10^4 NMP/g de coliformes totais foram registradas em 28,6% das amostras de queijo fresco, enquanto que o queijo maturado apresentou baixas contagens de coliformes totais e termotolerantes. Os autores recomendam para consumo o queijo Canastra maturado devido aos baixos índices de coliformes totais e termotolerantes do produto.

Nóbrega (2007), avaliando o soro-fermento utilizado na elaboração do queijo Minas Canastra produzido em fazendas da região de Medeiros (Minas Gerais), encontrou uma amostra (6,25%) positiva para *Salmonella* spp. As contagens de *Staphylococcus aureus* alcançaram valores de 10^3 UFC/ml.

Em pesquisa envolvendo o queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá (Minas Gerais), Araújo (2004) encontrou 18,9% de amostras positivas para *Salmonella* spp. As contagens de *Staphylococcus aureus* estavam acima dos padrões legais em 86,5% das amostras avaliadas.

A qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal produzido na cidade do Serro (Minas Gerais) foi avaliada por Brant (2003). Das 40 amostras analisadas, 37 (92,5%) encontraram-se impróprias para o consumo humano, sendo a principal causa de condenação a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes*.

Pereira *et al.* (1999) avaliaram a qualidade microbiológica de 168 amostras de diferentes variedades de queijo Minas, inspecionado ou não, comercializados em Belo Horizonte (Minas Gerais). Os resultados mostraram que 90% das amostras de queijo frescal, 81,2% do Canastra e 52% do Minas padrão apresentaram contagens de coliformes termotolerantes mais elevadas que os limites oficiais, não havendo diferença significativa entre o Número Mais Provável por grama (NMP/g) encontrado nos queijos inspecionados e naqueles sem inspeção. Nenhuma amostra continha *Salmonella* spp.

Os conteúdos de umidade, proteína, gordura e gordura no extrato seco e acidez de queijo Minas artesanal apresentaram considerável variação de resultados, demonstrando falta de padronização do produto. A pesquisa foi realizada por Ribeiro *et al.* (2009), que analisaram amostras deste queijo comercializado em Uberaba (Minas Gerais).

Silva (2007) verificou que existem queijos Minas artesanal com características de produção e padrões físico-químicos e sensoriais diferentes na região da Serra da Canastra.

Ornelas (2005) e Machado (2002), em pesquisas envolvendo parâmetros físico-químicos de queijo Minas artesanal produzido nas regiões da Serra da Canastra e Serro, respectivamente, evidenciam a necessidade de orientação aos produtores quanto à obtenção da matéria-prima e boas práticas de fabricação. Segundo os autores, atitudes como higiene pessoal dos ordenhadores, higienização dos tetos dos animais, sanificação dos utensílios e controle de qualidade da água contribuem para a melhoria da qualidade físico-química do queijo artesanal.

2.6. Bactérias ácido-lácticas (BAL)

Muitos microrganismos isolados e caracterizados durante o último século têm recebido atenção considerável de indústrias de bebidas e alimentos fermentados e da indústria farmacêutica. As bactérias ácido-lácticas (BAL) são tradicionalmente usadas nessas indústrias, desempenhando ainda papel essencial para produção de derivados lácteos fermentados, como iogurtes, leites fermentados e queijos (Garabal, 2007).

O grupo das BAL compreende 13 gêneros de bactérias Gram-positivo (Jay *et al.*, 2005): *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*.

As BAL são naturalmente encontradas em *habitats* nutritivos, como vegetais, grãos, leite, carne e seus derivados, constituindo ainda a microbiota dos tratos gastrointestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais. Essas bactérias são classificadas morfológicamente como bastonetes ou cocos não esporulados, podendo ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maioria delas é inativada a temperaturas superiores a 70°C. Esses microrganismos utilizam preferencialmente a lactose como fonte de carbono. A fermentação pode ser do tipo homofermentativa, quando produz uma intensa quantidade de ácido láctico, ou heterofermentativa, quando outras substâncias, além do ácido láctico, como o ácido acético, dióxido de carbono e etanol, são também produzidas durante a fermentação da lactose (Salminen e Von Writgh, 1993).

A elevada capacidade das BAL em transformar substratos por vias metabólicas específicas, inicialmente usadas como incremento na fermentação de alimentos, é hoje também utilizada para preservação de silagens e na produção industrial de biopolímeros, enzimas, etanol e ácido

lático. Além disso, estas bactérias exercem efeitos positivos na microbiota gastrointestinal de humanos e animais e podem ser usadas como veículo de antígenos vacinais. Outros efeitos benéficos das BAL à saúde humana envolvem a proteção contra infecções, imunomodulação e redução dos níveis plasmáticos de colesterol e da incidência de câncer (Randazzo *et al.*, 2009; Gomes e Malcata, 1999).

Tradicionalmente, a identificação das BAL isoladas a partir de alimentos é baseada no crescimento destas em meios de cultura seletivos, com subsequente identificação ao nível de gênero e/ou espécie baseada em critérios bioquímicos e fisiológicos. Apesar de essa metodologia ser razoavelmente sensível, ela apresenta certa restrição para *Lactobacillus* spp. e nem sempre permite a distinção exata entre espécies ou linhagens e a detecção de relações filogenéticas entre as bactérias. Assim, a aplicação de técnicas de biologia molecular, em particular aquelas que envolvem a amplificação de genes específicos por intermédio de reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), tem se destacado (Randazzo *et al.*, 2009). As variações observadas na seqüência e comprimento da região espaçadora entre as subunidades ribossomais 16S-23S do DNA ribossomal (rDNA) são utilizadas para identificação de espécies de microrganismos. Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de microrganismos, porém, bastante conservada em microrganismos da mesma espécie, sendo então, utilizada em pesquisas de identificação microbiana, ao nível molecular. (Tannock *et al.*, 1999).

Um método específico e reprodutível para a identificação de espécies e linhagens de BAL seria a amplificação por PCR da região do 16S-23S e posterior restrição com endonucleases específicas (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* - ARDRA). Este método tem se mostrado mais rápido, fácil e preciso para

identificação dessas bactérias em comparação com as metodologias baseadas no perfil de assimilação de carboidratos (Moreira *et al.*, 2005).

2.7. Bactérias ácido-láticas em queijos artesanais

Em muitos países, queijos produzidos em pequena escala, a partir de leite cru, ordenhado pelos próprios produtores, são elaborados artesanalmente, a partir de técnicas tradicionais. Na produção desses queijos, normalmente não se empregam culturas iniciadoras comerciais, sendo esta função desempenhada pelas BAL naturalmente presentes no leite e no ambiente (Cogan *et al.*, 1997).

A microbiota de queijos compreende o grupo de microrganismos iniciadores, composto por BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, e o grupo de microrganismos secundários. As BAL estão envolvidas no desenvolvimento da acidez durante a produção de queijos, contribuindo também no processo de maturação. A microbiota secundária, embora não contribua para a acidez, geralmente desempenha papel significativo na fase de maturação de queijos, influenciando as características sensoriais do produto final. Esse grupo inclui as BAL não iniciadoras, como espécies mesofílicas dos gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus*, e outros microrganismos a exemplo de *Micrococcus*, *Brevibacterium*, bactérias propiônicas, bactérias corineformes, bolores e leveduras (Beresford *et al.*, 2001).

A identificação de BAL envolvidas na produção e maturação de queijos artesanais tem sido objeto de estudo em várias regiões do mundo. Na África, Ouadghiri *et al.* (2005), pesquisando a microbiota de queijo artesanal marroquino Jben, encontraram, por meio de técnicas de biologia molecular, *Lactobacillus* como gênero dominante (34 %

dos isolados), com destaque para a espécie *Lactobacillus plantarum*.

Terzic-Vidojevic *et al.* (2009) estudaram a microbiota dos queijos artesanais Agdas e Sheki, produzidos em regiões montanhosas do Azerbaijão. As espécies de BAL predominantes, identificadas por técnicas de biologia molecular, foram *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Enterococcus faecium*.

Ainda no continente asiático, Bulut *et al.* (2005) pesquisaram a microbiota do queijo turco Comlek peyrini. Este queijo é produzido artesanalmente na região da Anatólia Central, sendo maturado por até seis meses em potes de barro que são enterrados em cinzas vulcânicas de cavernas da região. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* foi a principal espécie de BAL encontrada. Outras espécies isoladas foram *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e *Lactobacillus casei*. As BAL isoladas foram identificadas por meio de técnicas de biologia molecular.

Na Venezuela, Rivas *et al.* (2007), investigando o queijo artesanal Andino defumado, isolaram e identificaram, por meio de provas bioquímicas e morfológicas, oito amostras de *Lactococcus* e duas amostras de *Lactobacillus*.

A maioria das pesquisas de BAL em queijos tem sido feita na Europa. Dolci *et al.* (2008) estudaram a população bacteriana natural do queijo italiano Raschera PDO (*Protected Denomination Origin* – Denominação de Origem Protegida). De acordo com a análise da região espaçadora 16S-23S e seqüenciamento do 16S do rDNA, foram identificados os seguintes microrganismos: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus casseliflavus*, *Vagococcus carniphilis*, *Leuconostoc paramesenteroides* e *Streptococcus infantarium* ssp. *infantarum*.

Nikolic *et al.* (2008) identificaram e caracterizaram, por meio de técnicas de biologia molecular, BAL isoladas de queijos artesanais Buklujac, elaborados a partir de leite de cabras, na Sérvia. *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc mesenteroides* foram isolados e identificados nesse queijo.

A presença de BAL no queijo artesanal português São Jorge foi pesquisada por Kongo *et al.* (2007). *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* foram os principais microrganismos isolados e identificados por testes bioquímicos durante a maturação desse queijo.

Ballesteros *et al.* (2006) avaliaram a microbiota de queijos Manchego artesanais (produzido com leite cru) e industriais (produzido com leite pasteurizado), na região de La Mancha, Espanha. No queijo artesanal foram encontrados *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus faecalis*. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* foi a única BAL isolada do queijo industrial. As BAL isoladas foram identificadas por meio de testes bioquímicos e fisiológicos.

Cogan *et al.* (1997) isolaram e caracterizaram 4.379 amostras de BAL em 35 produtos artesanais fabricados na Europa, incluindo 24 queijos. Dentre as BAL identificadas por testes morfológicos e bioquímicos, *Lactococcus* (38%), *Enterococcus* (17%), *Streptococcus thermophilus* (14%), *Lactobacillus* mesófilicos (12%), *Leuconostoc* (10%) e

Lactobacillus termofilicos (9%) foram as mais freqüentes.

No Brasil, a literatura apresenta alguns trabalhos realizados com o objetivo de isolar BAL a partir de queijos artesanais. Lima *et al.* (2009) avaliaram a microbiota do queijo Minas artesanal produzido em fazendas na região da Serra do Salitre (Minas Gerais). As espécies de BAL mais freqüentes, identificadas por testes morfológicos e bioquímicos, foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*.

Elevadas populações de BAL foram observadas por Borelli (2006) ao longo de todo o período de maturação do queijo Minas artesanal produzido em fazendas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais). As espécies de BAL identificadas pela análise do perfil de restrição da região espaçadora do 16S-23S do rDNA com endonucleases específicas foram: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici* e *Weissella paramesenteroides*.

Carvalho *et al.* (2005) isolaram 270 amostras de BAL de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza (Ceará). Testes fisiológicos e bioquímicos permitiram a identificação de *Enterococcus* (60,3%), *Streptococcus* (27,1%), *Lactobacillus* (10,4%), *Leuconostoc* (1,5%) e *Lactococcus* (0,4%).

A produção artesanal de queijo de coalho em fazendas no interior do estado de Pernambuco foi documentada por Guedes Neto (2004). A análise do perfil de restrição da região espaçadora do 16S-23S do rDNA com endonucleases específicas permitiu a identificação das seguintes espécies de BAL: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Weissella confusa*.

Leite (1993) isolou e identificou, por testes bioquímicos, amostras de BAL de soro-fermento de queijo Minas artesanal produzido na região do Serro (Minas Gerais). As espécies de BAL encontradas foram: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Streptococcus milleri* e *Enterococcus faecalis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aquisição do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e amostragem

Foram visitadas 18 queijarias localizadas em propriedades rurais nos municípios de São Roque de Minas, Medeiros e Tapiraí, na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, em meados do mês de janeiro de 2009. Foram obtidos queijos artesanais, com período de maturação entre sete e quinze dias, das queijarias visitadas, distribuídas da seguinte maneira: três níveis de altitude (600 a 900 metros, 900 a 1.000 metros e acima de 1.000 metros), determinados por aparelho de geoprocessamento remoto (GPS MAP76S, *Garmim Ltd.*, Olathe, Kansas, Estados Unidos), e dois estágios de cadastramento oficial da queijaria (não cadastrado e cadastrado). Em cada nível de altitude, foram visitadas três queijarias não cadastradas e três cadastradas. Além dos queijos, foram coletadas amostras de leite e do soro-fermento de cada propriedade rural visitada.

Os queijos foram coletados diretamente da prateleira de maturação das queijarias e embalados em papel alumínio estéril. As amostras de leite foram acondicionadas em três frascos estéreis: o primeiro contendo o conservante azidiol para realização de contagem bacteriana; o segundo contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol e natamicina) para determinação da composição e da contagem de células somáticas; e o terceiro contendo

apenas o leite cru para a pesquisa de bactérias ácido-láticas. As amostras de soro-fermento foram acondicionadas em frascos estéreis.

Em seguida, as amostras (queijo, leite e soro-fermento) foram acondicionadas em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração com gelo reciclável, sendo então transportadas para o Laboratório de Análise da Qualidade de Leite da UFMG (LabUFMG) e os laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG (DTIPOA/EV/UFMG), onde foram submetidas às análises descritas nos próximos itens.

3.2. Avaliação microbiológica e contagem de células somáticas de leite

As amostras de leite contendo o conservante azidiol foram encaminhadas ao LabUFMG para realização da contagem bacteriana total em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC (*Bentley Instruments Incorporated*[®], Chaska, Minnesota, Estados Unidos) (Bentley..., 2002) pelo método de citometria de fluxo (Suhren e Walte, 2000). As amostras de leite contendo o bronopol foram encaminhadas ao LabUFMG para contagem de células somáticas em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300[®] da *Bentley Instruments Incorporated*[®] (Bentley..., 1997) pelo método de citometria de fluxo (International..., 1995).

3.3. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal

Os queijos foram submetidos às seguintes análises microbiológicas, segundo Brasil (2003): pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa de *Staphylococcus* spp. e pesquisa de bolores e leveduras.

3.3.1. Pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C

As pesquisas de coliformes totais (30°C) e termotolerantes (45°C) foram feitas utilizando-se o método do Número Mais Provável (NMP). Aliquotas de 25 g de cada queijo foram pesadas, trituradas e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1%, correspondendo à diluição 10⁻¹. Para o teste presuntivo, as diluições 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foram inoculadas, em triplicata, em tubos contendo caldo lactosado bile verde brilhante 2% (*Acumedia*, Baltimore, Maryland, Estados Unidos) e tubos de Durhan invertidos. Estes tubos foram incubados em estufa a 36°C por 48 horas. A identificação da presença de gás nos tubos de Durhan indicou resultado positivo para bactérias Gram negativo e produtoras de gás a partir da lactose e a realização do teste confirmatório em ágar Levine (*Acumedia*) para coliformes totais (International..., 1974) e caldo EC (*Acumedia*) para coliformes termotolerantes, sendo o NMP determinado pela tabela de Mac Crady (Feng *et al.*, 2002).

3.3.2. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., 25 g de cada queijo foram transferidos, assepticamente, para frascos contendo 225 ml de salina peptonada tamponada 1%, para realização do pré-enriquecimento. Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C, após permanência em temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, foi realizada a fase de enriquecimento seletivo em caldo selenito cistina (*Acumedia*) e caldo Rappaport-Vassiliadis (*Acumedia*), para os quais foram transferidos 1,0 ml e 0,1 ml do pré-enriquecimento, respectivamente. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 41°C por 24 horas. Após o período de incubação, procedeu-se a técnica de isolamento em meios sólidos seletivos. Os meios utilizados foram o ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose (BPLS) (*Acumedia*), o ágar *Salmonella-Shigella* (SS) (*Acumedia*) e

o ágar Hecktoen entérico (He) (*Acumedia*). De cada tubo do enriquecimento seletivo, foram obtidas três placas para isolamento, uma para cada ágar utilizado. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Na etapa de seleção, foram selecionadas colônias típicas ou suspeitas de *Salmonella* spp. nos diferentes meios sólidos. Essas colônias foram utilizadas para triagem bioquímica, empregando-se o meio ágar Rugai modificado, em tubos, (Pessoa & Silva, 1972). Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e, em seguida, realizada a leitura. Tubos com leitura suspeita de *Salmonella* spp. foram submetidos ao teste de confirmação sorológica por meio de soro anti-*Samonella* polivalente “O”.

3.3.3. Pesquisa de *Staphylococcus* spp.

Para a enumeração de *Staphylococcus* spp., 25 g de cada queijo foram homogeneizados em 225ml de água peptonada 0,1%, para a obtenção da diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição, alíquotas de 0,1 ml de diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram inoculadas e espalhadas, com auxílio de alça de *Drigalski*, na superfície do ágar Baird-Parker (*Acumedia*) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C.

3.3.4. Pesquisa de bolores e leveduras

Para a pesquisa de bolores e leveduras, 25 g de cada queijo foram homogeneizados em 225 ml de água peptonada 0,1%, para obtenção da diluição 10^{-1} . Alíquotas de 0,1ml de diluições 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram inoculadas e espalhadas, com auxílio de alça de *Drigalski*, na superfície do ágar batata dextrose 2% (*Acumedia*), acidificado a pH 3,5 com ácido tartárico 10% estéril. As placas foram incubadas, sem inverter, a 25°C por sete dias.

3.4. Isolamento, enumeração, caracterização fisiológica e purificação de

bactérias ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal

O isolamento, a enumeração, a caracterização fisiológica e a purificação de bactérias ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal foram realizados segundo International... (1988) e Mac Faddin (1980).

Processamento das amostras

As amostras de leite cru, soro-fermento e queijo Minas artesanal foram encaminhadas aos laboratórios do DTIPOA/EV/UFMG para a pesquisa de bactérias ácido-lácticas.

Para as amostras de leite cru e soro-fermento, o volume de 25 ml de cada amostra foi transferido, asépticamente, para diluição em frascos contendo 225 ml de salina tamponada estéril (5,61 g de NaCl, 1,0 g de KH_2PO_4 , 2,0 g de Na_2PO_4 e 0,11 g de KCl em 1.000 ml de água destilada) para obtenção da diluição 10^{-1} . Em seguida, foram preparadas diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} , utilizando o mesmo diluente.

Com relação às amostras de queijo Minas artesanal, foram pesados 25 g de cada queijo para diluição em 225 ml de solução salina tamponada, correspondendo à diluição 10^{-1} . Em seguida, foram preparadas diluições 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-7} , utilizando o mesmo diluente.

A partir de cada uma das diluições realizadas para as amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal, uma alíquota de 0,1ml foi espalhada na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS, de *Man - Rogosa - Sharpe* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha), e ágar M17 (*Himedia*, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose, quando foi feito o isolamento.

Enumeração dos microrganismos

A enumeração foi realizada após a incubação, sendo consideradas placas contendo de 10 a 300 UFC. Em seguida, foi realizado o cálculo de UFC/ml, multiplicando-se o número de colônias formadas por 10 e pelo inverso da diluição.

Testes morfológicos e bioquímicos

A partir de colônias apresentando aspectos morfológicos diferentes de cada meio de cultura, foram feitos esfregaços em lâminas para coloração pelo método de Gram. Além disto, a partir dessas mesmas colônias foram feitos testes de catalase, em lâmina, utilizando-se H₂O₂ (30%).

Teste respiratório

As colônias que apresentaram tipos morfológicos diferentes foram repicadas em triplicata para placas de Petri contendo ágar MRS (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e ágar M17. As placas foram incubadas sob três condições de cultivo diferentes: aerobiose – estufa bacteriológica; microaerofilia – jarra de anaerobiose; e anaerobiose - câmara anaeróbia (*Forma Scientific Company*, Marietta, Geórgia, Estados Unidos), contendo uma atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂. O material foi incubado durante 48 horas a 37°C.

Purificação e manutenção dos microrganismos isolados

As colônias que apresentaram tipos morfológicos diferentes, oriundas do ágar MRS, foram inoculadas em 3,0 ml de caldo MRS (*Difco*) e incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose. As colônias oriundas do ágar M17 foram inoculadas em 3,0 ml de leite desnatado em pó da marca Molico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil), reconstituído a 10%, e incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose. Após o crescimento, uma alíquota de 800 µL de cada tubo foi transferida para tubo

eppendorf e adicionada de glicerol esterilizado (200 µL), sendo em seguida congeladas a -18°C para posterior utilização. O restante dos cultivos foi destinado à biologia molecular, com a finalidade de identificação das espécies isoladas, por intermédio de análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA) pela amplificação por PCR da região espaçadora 16S-23S do rDNA, conforme metodologia proposta por Moreira *et al.* (2005), Tannock *et al.* (1999) e Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997). A etapa de biologia molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LGMPP/ICB/UFMG).

3.5. Identificação dos isolados de bactéria ácido-lácticas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal de acordo com técnicas de Biologia Molecular

A identificação, ao nível de espécie, das bactérias ácido-lácticas isoladas seguiu metodologia proposta por Moreira *et al.* (2005), Tannock *et al.* (1999) e Tisala-Timisjarvi e Alatossava (1997).

A extração do DNA total dos microrganismos isolados nos meios de cultura ágar MRS e ágar M17 foi realizada a partir do cultivo recente em caldo MRS (*Difco*) e caldo M17 (*Difco*), suplementado com solução de lactose 10%, incubado sob aerobiose, a 37°C, durante 48 horas, como descrito anteriormente.

Obtenção das células sem parede e sem membrana

De cada cultivo dos microrganismos que cresceram em caldo MRS e caldo M17, 10 ml foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura de 4°C, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram ressuspensos em 1,0 ml de cloreto de lítio (1M) e incubados sob agitação a 37°C, por

uma hora, com finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, durante 10 minutos, descartando-se os sobrenadantes. Os *pellets* foram ressuspensos em 1,0 ml de tampão para obtenção de protoplastos (50 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 10 mg de lisozima ml⁻¹) e incubados por uma hora, sob agitação, a 37°C. Os pellets ressuspensos foram transferidos para tubos *ependorf* e centrifugados a 14.000 rpm, durante um minuto, e os sobrenadantes foram descartados.

Extração de DNA total

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante.

Eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Aliquotas de 5,0 µL de cada amostra de DNA total extraído foram misturadas a 1,0 µL de tampão glicerol adicionado de azul de bromofenol 6X. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 5,0 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 50 minutos. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1Kb. Ao término da corrida, os géis foram fotografados, utilizando equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Posteriormente, as amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar a região intergênica que codifica as subunidades ribossomais (16S – 23S) de BAL, de acordo com metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi & Alatossava (1997).

Reação de PCR 16S-23S:

DNA total diluído	5,0 µL
PCR Master Mix 2x*	30 µL
Iniciador senso (16S) **	0,6 µL
Iniciador reverso (23S) ***	0,6 µL
Água deionizada	23,8 µL

* *Promega Corporation*

***Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'*

****Primer 23-1b. 5' – GGGTCCCCCATTCGGA – 3'*

Em seguida, os tubos *ependorf*, contendo as amostras, foram colocados dentro da máquina termocicladora *Veriti™ 96 – Well*

Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos), sendo utilizado o seguinte programa:

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 minutos e 30 segundos
	94° C	30 segundos
<i>Anelamento</i>	55° C	1 minuto
<i>Extensão</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensão final</i>	72° C	10 minutos
	4° C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento e extensão: 35.

Posteriormente, 4,0 µL de cada produto de PCR foram misturados com 1,0 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol 6X, e, então, submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionado de 5,0 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 50 minutos. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas.

Restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA com endonucleases específicas (ARDRA)

Após a obtenção dos produtos de PCR, os mesmos foram submetidos à ação de endonucleases (ARDRA), de acordo com compilação de seqüências de nucleotídeos

disponíveis no *GenBank*, para a identificação das espécies de BAL. As enzimas utilizadas foram: *SphI*, *NcoI*, *NheI* (que clivam o DNA dentro do gene 16S); *SspI*, *SfuI*, *DraI*, *VspI*, *EcoRI* e *HincII* (que clivam o DNA na região espaçadora); *ArvII* e *HindIII* (que clivam o DNA dentro do gene 23S). Também foi utilizada a enzima *EcoRV*, que cliva o DNA de *Lactobacillus* do grupo casei na região intergênica 16S-23S e dentro do gene 23S no grupo acidófilo. Todas as enzimas utilizadas foram adquiridas da companhia *Promega Corporation*. Como algumas destas enzimas necessitam de BSA (albumina sérica bovina) para sua melhor atividade, foram preparadas duas misturas diferentes:

MIX 1 – com BSA:

DNA (Produto de PCR)	3,5 µL
Tampão 10 x	1,0 µL
BSA 10 x	1,0 µL
Água deionizada	3,9 µL
Enzima	0,1 µL

MIX 2 – sem BSA:

DNA (Produto de PCR)	3,5 µL
Tampão 10 x	1,0 µL
Água deionizada	4,9 µL
Enzima	0,1 µL

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos a 37°C, durante duas horas, para proceder à análise de restrição enzimática. Em seguida, 9,5 µL de cada produto de restrição foram misturados com 2,0 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol 6X e então submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%), adicionado de 5,0 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 50 minutos. Os resultados foram fotografados e o perfil de restrição de cada produto de PCR foi comparado com o perfil de restrição característico de cada espécie de bactéria ácido-láctica.

Identificação das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* por meio de técnica de PCR multiplex

As espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* são genotipicamente muito próximas entre si e podem demonstrar fenótipos semelhantes (Torriani *et al.*, 2001). Essas espécies apresentam perfil de restrição enzimática semelhante, inviabilizando a diferenciação pela ARDRA.

A técnica de PCR *multiplex* utiliza mais de um par de iniciadores na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de várias seqüências de DNA. Essa técnica auxilia a identificação de mais de uma espécie de microrganismo na mesma reação de PCR (Kwon *et al.*, 2004). Assim, a

distinção entre *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* foi feita a partir da técnica de PCR *multiplex*, utilizando iniciadores específicos para amplificação da região do gene *recA*, segundo metodologia descrita por Torriani *et al.* (2001).

Reação de PCR *multiplex*:

DNA total diluído	1,6 µL
PCR Master Mix 2x*	10 µL
Iniciador plantarum senso 2x**	1,2 µL
Iniciador paraplantarum senso 2x***	2,4 µL
Iniciador pentosus senso 2x****	2,4 µL
Iniciador reverso 2x*****	2,4 µL

* Promega Corporation

** 5'- CCGTTTATGCGGAACACC TA - 3'

*** 5'- GTCACAGGCATTACGAAAAC - 3'

**** 5'- CAGTGGCGCGGTTGATATC - 3'

***** 5'- TCGGGATTACCAAACATCAC - 3'

Em seguida, os tubos eppendorf, contendo as amostras, foram colocados dentro da máquina termocicladora Veriti™ 96 – Well

Thermal Cycler, sendo utilizado o seguinte programa:

Desnaturação	95° C	3 minutos
	95° C	30 segundos
Anelamento	56° C	20 segundos
Extensão	72° C	30 segundos
Extensão final	72° C	5 minutos
	4° C	Tempo indefinido

Número de ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento e extensão: 30.

Posteriormente, 20 µL de cada produto de PCR *multiplex* foram misturados com 4,0 µL do tampão glicerol com azul de bromofenol 6X, e submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), adicionado de 6,0 µL de brometo de etídeo (1%), utilizando 100 V, durante 50 minutos. Paralelamente, no mesmo gel, foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1Kb. Ao final da corrida, os géis foram fotografados, para visualização das regiões amplificadas

3.6. Avaliação físico-química

3.6.1. Leite

As amostras de leite contendo o bronopol foram encaminhadas ao LabUFMG para determinação dos teores percentuais de gordura, de proteína, de lactose e de extrato seco total, em equipamento eletrônico Bentley CombiSystem 2300® da Bentley Instruments Incorporated® (Bentley..., 1998). A composição do leite foi realizada segundo o método de absorção de comprimento de onda na região do infravermelho (International..., 2000). Após a retirada asséptica de alíquotas de leite cru para a pesquisa de bactérias ácido-láticas, o

leite ainda foi submetido à análise da acidez titulável (°Dornic), segundo Brasil (2006).

3.6.2. Queijo Minas artesanal

Após a retirada asséptica de alíquotas para a realização das análises microbiológicas, os queijos foram analisados quanto aos seguintes parâmetros físico-químicos, segundo Brasil (2006): pH, acidez titulável (% ácido lático), teor de gordura pelo método butirométrico para queijo (%), teor de gordura no extrato seco total (%), umidade (%), teor de sólidos totais (%) e teor de nitrogênio total (%).

3.7. Análise estatística

O experimento foi realizado utilizando o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2: três níveis de altitude (600 a 900 metros, 900 a 1.000 metros e acima de 1.000 metros) da propriedade rural e dois estágios de cadastramento oficial (não cadastrado e cadastrado) da queijaria. Os dados envolvendo as análises físico-químicas seguiram uma distribuição normal. Os dados envolvendo as análises microbiológicas e enumeração de bactérias ácido-láticas apresentaram elevada variabilidade, não seguindo uma distribuição normal. Assim, para uma comparação e análise mais eficiente dos parâmetros microbiológicos, procedeu-se a transformação dos dados, de forma a se obter uma distribuição normal, o que foi alcançado por meio da transformação logarítmica na base 10 (Log_{10}).

Os dados do experimento foram avaliados por análise de variância, seguido de comparação de médias dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e a enumeração de bactérias ácido-láticas pelo Teste t de Student, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002). A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS, versão 8.0 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas do leite

Não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias dos resultados da contagem bacteriana total (CBT) e da contagem de células somáticas (CCS) das amostras de leite coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, localizadas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais), considerando a interação entre os fatores altitude e cadastramento oficial.

As médias dos resultados e os coeficientes de variação de CBT e de CCS das amostras de leite coletadas em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra são apresentados na tabela 1. A tabela 2 apresenta as médias dos resultados e os coeficientes de variação da CBT e da CCS dessas amostras coletadas em queijarias não cadastradas e cadastradas.

Tabela 1: Resultados médios (\bar{x}) e coeficientes de variação (CV) da contagem bacteriana total e da contagem de células somáticas de leite coletado em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetro de qualidade	Altitude 1 (600-900 m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000 m) (n=6)		Altitude 3 (>1000 m) (n=6)	
	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)
	Contagem bacteriana total (UFC/ml)	$1,2 \times 10^5$	131	$1,5 \times 10^6$	171	$3,7 \times 10^5$
Contagem de células somáticas (células/ml)	$2,8 \times 10^5$	88	$4,7 \times 10^5$	94	$3,4 \times 10^5$	99

Tabela 2: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) da contagem bacteriana total e da contagem de células somáticas de leite coletado em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetro de qualidade	Não cadastrado (n=9)		Cadastrado (n=9)	
	x	CV(%)	x	CV(%)
Contagem bacteriana total (UFC/ml)	1,8x10 ⁵	132	1,2x10 ⁶	184
Contagem de células somáticas (células/ml)	2,5x10 ⁵	100	4,8x10 ⁵	82

Não foi encontrada diferença ($p>0,05$) entre as médias da CBT das amostras de leite nas três altitudes pesquisadas (tabela 1). Segundo a legislação vigente (Minas Gerais, 2008), a contagem bacteriana máxima permitida em leite cru destinado à produção do queijo Minas artesanal é $1,0 \times 10^5$ UFC/ml. As médias de CBT encontradas não atendem ao padrão exigido pela legislação.

As médias da CBT das amostras de queijarias não cadastradas e cadastradas foram semelhantes ($p>0,05$) (tabela 2). As médias da CBT encontradas estão acima do padrão estabelecido pela legislação (Minas Gerais, 2008). Considerando as amostras de leite provenientes de propriedades rurais cadastradas (n=9), o percentual de amostras dentro dos parâmetros legais exigidos para análise de CBT foi 56%. Para as propriedades não cadastradas (n=9), este percentual correspondeu a 44% das amostras. Isto preocupa, pois indica falhas nos procedimentos de higiene de obtenção do leite, interferindo na qualidade microbiológica do queijo.

Os coeficientes de variação observados entre as médias da CBT das amostras de leite coletadas em propriedades rurais não cadastradas foram menores que aqueles observados em amostras coletadas em propriedades cadastradas (tabela 2). Entretanto, os valores de CV foram elevados, independentemente do cadastramento da propriedade. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização nos procedimentos de obtenção do leite entre as

propriedades rurais produtoras de queijo Minas artesanal. A mesma discussão pode ser aplicada para os valores de CV desta mesma variável observados nas diferentes altitudes (tabela 1).

Uma vez que o leite utilizado pra a produção do queijo Minas artesanal não recebe tratamento para a eliminação de microrganismos contaminantes, práticas adequadas de higiene devem ser adotadas como forma de diminuir a contagem inicial de contaminantes, evitando a produção de queijos com baixa qualidade microbiológica.

A enumeração de microorganismos no leite cru é um instrumento de auxílio importante no controle de qualidade deste produto (Fonseca e Santos, 2000). A disponibilidade de nutrientes, a alta atividade de água e o pH próximo da neutralidade tornam o leite um meio extremamente favorável ao crescimento de microrganismos (Arcuri *et al.*, 2006). Dentre estes microrganismos, podem ser encontrados os deteriorantes, que interferem com o rendimento de produção dos queijos, alterando o sabor e reduzindo a durabilidade dos mesmos, e os patogênicos, que representam riscos à saúde pública (Fonseca e Santos, 2000; Furtado, 1991). Esses grupos de microrganismos também foram pesquisados e seus resultados serão apresentados e discutidos em itens seguintes.

A CBT do leite pode ser reduzida com a revisão e/ou adoção de boas práticas agropecuárias nas propriedades. As fontes de contaminação do leite incluem higienização inadequada dos manipuladores,

equipamentos e utensílios de ordenha mal higienizados e/ou sem manutenção periódica, o ambiente onde os animais são ordenhados, falhas na higienização e desinfecção de tetos e utilização de água contaminada (Fonseca e Santos, 2000).

As médias da CCS das amostras de leite não diferiram ($p>0,05$) nas três altitudes pesquisadas (tabela 1). A legislação estadual (Minas Gerais, 2008) preconiza contagem máxima de $4,0 \times 10^5$ células somáticas/ml em leite destinado a produção de queijo Minas artesanal. Apesar de a média da CCS registrada na altitude 2 ($4,7 \times 10^5$ células/ml) não atender à legislação, ela foi estatisticamente semelhante ($p>0,05$) às médias de CCS registradas nas altitudes 1 ($2,8 \times 10^5$ células/ml) e 3 ($3,4 \times 10^5$ células/ml), que atendem ao exigido pela legislação.

As médias da CCS das amostras de leite foram iguais ($p>0,05$) nos dois tipos de cadastramento das queijarias pesquisadas (tabela 2). Considerando as amostras de leite provenientes de propriedades rurais cadastradas ($n=9$), o percentual de amostras fora dos parâmetros legais exigidos para análise da CCS foi 44%. Para as propriedades não cadastradas ($n=9$), este percentual correspondeu a 11% das amostras.

A CCS estaria relacionada com a composição e segurança alimentar do leite, interferindo ainda no rendimento do queijo. Para os produtores, a importância da avaliação desse parâmetro estaria na indicação do estado sanitário das glândulas mamárias das vacas, sinalizando a ocorrência de mastite e alterações da qualidade do leite (Gigante, 2004; Fonseca e Santos, 2000).

Segundo Machado *et al.* (2000), mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorrem a partir de 1.000.000 células somáticas/ml para a gordura, e 500.000 células somáticas/ml

para proteína e lactose. As alterações da composição do leite envolveriam o aumento do teor percentual de gordura e a diminuição dos teores percentuais de proteína e lactose.

A CCS estaria relacionada com o aumento do risco de ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. A contaminação do leite por antimicrobianos deve-se, principalmente, ao tratamento de vacas em lactação, ou durante o período seco, para controlar a mastite (Gigante, 2004; Fonseca e Santos, 2000). A presença de resíduos de antimicrobianos em leite constitui um problema de saúde pública, pelos aspectos toxicológico, microbiológico (indução de resistência bacteriana) e de desenvolvimento de reações de hipersensibilidade em humanos, afetando ainda o comportamento e a atividade de culturas lácticas, causando perdas consideráveis para a qualidade dos produtos lácteos (Gigante, 2004).

O aumento da CCS em leite elevaria a perda de proteínas no soro e o tempo de formação do coágulo do queijo, interferindo negativamente no rendimento e nas características sensoriais do produto (Andreatta *et al.*, 2009). A utilização de leite com alta CCS para a produção de queijo estaria associada à diminuição dos teores de proteínas, principalmente caseínas, e de sólidos totais do queijo (Gigante, 2004).

Os coeficientes de variação observados entre as médias da CCS das amostras de leite coletadas em propriedades rurais cadastradas foram menores que aqueles observados nas amostras coletadas em propriedades não cadastradas (tabela 2). Entretanto, os valores de CV foram elevados, independentemente do cadastramento da propriedade. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização nos procedimentos de obtenção do leite e controle de mastite entre as propriedades rurais produtoras de queijo Minas artesanal. A mesma discussão pode ser aplicada para os valores de CV desta mesma variável observados nas diferentes altitudes (tabela 1)

O controle de mastite no rebanho, com conseqüente redução da CCS do leite, envolve a adoção de uma série de medidas que colaboram para a melhoria da qualidade do leite (Fonseca e Santos, 2000). Dentre estas medidas, podem ser citadas: a desinfecção de tetos pré e pós ordenha, a realização do teste da caneca telada para detecção de mastite clínica, o tratamento dos casos clínicos de mastite, a segregação e o descarte de vacas com mastite crônica e a higiene adequada do ambiente de ordenha.

Ornelas (2005), avaliando a qualidade do leite utilizado na produção de queijo Minas artesanal na região da Serra da Canastra, registrou CBT entre 10^3 e 10^4 UFC/ml e CCS de 10^5 células/ml. Para o autor, a contaminação do leite seria minimizada, provavelmente, pela adoção de cuidados na higiene e desinfecção dos equipamentos e utensílios de ordenha.

4.2. Qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal

Não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias dos resultados dos parâmetros microbiológicos avaliados - pesquisa de coliformes a 30°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa de *Staphylococcus* spp. e pesquisa de bolores e leveduras - das amostras de queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, localizadas na região da Serra da Canastra, considerando a interação entre os fatores altitude e cadastramento.

As médias dos resultados e os coeficientes de variação dos parâmetros microbiológicos das amostras de queijo Minas artesanal coletadas em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra são apresentados na tabela 3. A tabela 4 apresenta as médias dos resultados e os coeficientes de variação dos parâmetros microbiológicos dessas amostras de queijo coletadas em queijarias não cadastradas e cadastradas.

Tabela 3: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) de parâmetros microbiológicos de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetro microbiológico	Altitude 1 (600-900 m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000 m) (n=6)		Altitude 3 (>1000 m) (n=6)	
	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)
	Coliformes a 30°C (NMP/g)	1275	76	484	167	984
Coliformes a 45°C (NMP/g)	913	110	400	209	548	159
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/g)	$1,7 \times 10^8$	87	$1,7 \times 10^8$	88	$1,7 \times 10^8$	86
Bolores e leveduras (UFC/g)	$1,3 \times 10^8$	94	$9,5 \times 10^7$	127	$2,1 \times 10^8$	43

Tabela 4: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros microbiológicos de amostras de queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetro microbiológico	Não cadastrado (n=9)		Cadastrado (n=9)	
	x	CV(%)	x	CV(%)
Coliformes a 30°C (NMP/g)	1202 ^a	74	627 ^b	120
Coliformes a 45°C (NMP/g)	1104 ^c	90	136 ^d	265
<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC/g)	$2,1 \times 10^8$	63	$1,2 \times 10^8$	109
Bolores e leveduras (UFC/g)	$1,2 \times 10^8$	100	$1,7 \times 10^8$	67

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste t ($p<0,05$)

Não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C das amostras de queijo artesanal nas altitudes pesquisadas (tabela 3). Porém, houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias dos NMP desses microrganismos quando foi considerado o tipo de cadastramento da queijaria (tabela 4). As médias dos NMP de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C encontradas em queijos produzidos em queijarias não cadastradas foram maiores que as médias dos NMP desses microrganismos em queijarias cadastradas. A adoção de boas práticas agropecuárias e de produção exigidas ao longo do processo de cadastramento da queijaria teria contribuído positivamente na diminuição das contagens de coliformes a 30° e coliformes a 45°C no queijo. Destacase ainda que as médias das contagens desses microrganismos em queijarias cadastradas estão dentro dos limites máximos de 5.000 NMP/g (coliformes a 30°C) e 500 NMP/g (coliformes a 45°C) estipulados pela legislação (Minas Gerais, 2008).

Considerando as amostras de queijo provenientes de queijarias cadastradas ($n=9$), os percentuais de amostras dentro dos parâmetros legais (Minas Gerais, 2008) exigidos para análise de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C foram, respectivamente, 100% e 89%. Para as queijarias não cadastradas ($n=9$), estes percentuais corresponderam, respectivamente, a 100% e 44% das amostras. A presença de coliformes a 45°C foi menor em queijos de queijarias cadastradas (tabela 4). Esses resultados ressaltam a importância da fiscalização e inspeção higiênico-sanitária com a finalidade de garantir segurança à saúde do consumidor.

Os coeficientes de variação observados entre as médias dos NMP de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C de queijos coletados em queijarias não cadastradas foram menores que aqueles observados em queijos de queijarias cadastradas (tabela 4). Entretanto,

os valores de CV foram elevados, independentemente do cadastramento da queijaria. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização na elaboração do queijo Minas artesanal entre as propriedades rurais. A mesma discussão pode ser aplicada para os valores de CV destas mesmas variáveis observados nas diferentes altitudes (tabela 3).

A média dos NMP de coliformes a 30°C em queijarias não cadastradas atendeu ao exigido na legislação, o mesmo não ocorrendo com o NMP médio de coliformes a 45°C nestas queijarias (tabela 4). Pereira *et al.* (2008), Ornelas (2005), Araújo (2004), Brant (2003) e Borelli (2002) verificaram percentual significativo de amostras de queijo Minas artesanal que excederam aos limites legais para contagens de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C. Para os autores, falhas higiênico-sanitárias caracterizadas por obtenção não higiênica do leite, utilização de água de baixa qualidade microbiológica e de equipamentos e utensílios mal higienizados, além de falta de higiene durante a produção dos queijos artesanais poderiam explicar, em parte, estas contaminações. A adoção de boas práticas de produção é imprescindível para minimizar estas contaminações microbiológicas.

A presença de coliformes em queijos está ligada a ocorrência de estufamento precoce, defeito tecnológico perceptível ao final do processo de prensagem ou até dois dias após a produção do queijo. O estufamento é devido, principalmente, à produção de gás carbônico, resultante da fermentação da lactose por estes microrganismos. O queijo apresenta-se abaulado, com olhaduras pequenas e irregulares e sabor picante ou ligeiramente amargo, ocasionado pela produção de etanol e ácido acético a partir da fermentação da lactose (Furtado, 1991).

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de *Staphylococcus* spp. das amostras de queijo artesanal nas

altitudes pesquisadas (tabela 3). Também não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as contagens deste microrganismo em queijos produzidos em queijarias não cadastradas e cadastradas (tabela 4).

Destaca-se, porém, as elevadas contagens médias de *Staphylococcus* spp, que, como observado nas tabelas 3 e 4, variaram entre $1,2 \times 10^8$ e $2,1 \times 10^8$ UFC/g. Considerando as amostras de queijo provenientes de queijarias cadastradas ($n=9$), o percentual de amostras fora dos parâmetros legais (Minas Gerais, 2008), exigidos para análise deste microrganismo foi 89%. Para as queijarias não cadastradas ($n=9$), este percentual correspondeu a 100% das amostras. Devido às suas características, *Staphylococcus* spp. exibem elevada capacidade de contaminação e produção de toxinas nos alimentos, expondo a população consumidora ao risco de desenvolvimento de uma toxinfecção alimentar (Santos, 2008). A produção dessas toxinas representa um risco potencial à saúde pública, pois caso aconteça a sua ingestão juntamente com os alimentos, poderá ocorrer um quadro de gastroenterite aguda. Em queijos, a quantidade de toxina produzida a partir de contagens de *Staphylococcus* spp. acima de 10^5 UFC/g seriam suficientes para desencadear o quadro de intoxicação (Le Loir *et al.*, 2003). Já foi constatada por Carmo *et al.* (2002) a produção de toxinas em contagens de $2,4 \times 10^3$ UFC/ml em leite cru, o que aumenta os riscos de intoxicação estafilocócica, demonstrando a constante necessidade de implantação de boas práticas de produção.

Lamaita *et al.* (2005) enfatizam que os padrões legais para alimentos especificam apenas a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo e reforçam a necessidade de revisão da legislação brasileira, incluindo espécies coagulase negativo, dada sua importância do ponto de vista de segurança alimentar. A produção de toxinas por *Staphylococcus* coagulase negativo em leite e derivados já foi comprovada por Lamaita

et al. (2005), Guedes Neto (2004), Veras (2004), Carmo *et al.* (2002) e Sena (2000).

Os coeficientes de variação observados entre as contagens de *Staphylococcus* spp. de queijos coletados em queijarias não cadastradas foram menores que aqueles observados em queijos de queijarias cadastradas (tabela 4). Entretanto, os valores de CV foram elevados, independentemente do cadastramento da queijaria. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização na elaboração do queijo Minas artesanal entre as propriedades rurais. A mesma discussão pode ser aplicada para os valores de CV desta mesma variável observados nas diferentes altitudes (tabela 3).

Pesquisas envolvendo queijo Minas artesanal, como no presente estudo, também detectaram elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. (Menezes *et al.* 2009; Pereira *et al.*, 2008; Borelli, 2006; Ornelas, 2005; Araújo, 2004; Brant, 2003; Borelli, 2002). A contaminação da maioria das amostras de queijos artesanais por *Staphylococcus* spp. pode ser explicada pelo fato de as principais fontes de contaminação do queijo serem o leite cru, o soro-fermento e a manipulação por portadores assintomáticos deste microrganismo. O rebanho bovino brasileiro é altamente acometido por mastites subclínicas causadas por este microrganismo que contamina o leite durante a ordenha. Em algumas situações, principalmente quando há falhas de adoção de boas práticas de produção, o soro-fermento também pode ser contaminado por *Staphylococcus* spp.. Além disso, o risco de contaminação durante o processo produtivo é alto, pois o queijo Minas artesanal é um produto muito manipulado, normalmente em condições precárias (Brant, 2003).

Não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de bolores e leveduras das amostras de queijo artesanal nas altitudes pesquisadas (tabela 3). As

contagens destes microrganismos em queijos produzidos em queijarias não cadastradas e cadastradas também foram iguais ($p > 0,05$) (tabela 4). A legislação vigente (Minas Gerais, 2008) não referencia a pesquisa de bolores e leveduras.

Os coeficientes de variação observados entre as contagens de bolores e leveduras de queijos coletados em queijarias não cadastradas foram maiores que aqueles observados em queijos de queijarias cadastradas (tabela 4). Entretanto, os valores de CV foram elevados, independentemente do cadastramento da queijaria. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização na elaboração do queijo Minas artesanal entre as propriedades rurais. A mesma discussão pode ser aplicada para os valores de CV desta mesma variável observados nas diferentes altitudes (tabela 3).

Os valores médios das contagens de bolores e leveduras (tabelas 3 e 4) estão de acordo com os descritos por Borelli (2002) e Borelli (2006), que verificaram contagens destes microrganismos superiores a 10^7 UFC/g em amostras de queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra (Minas Gerais). Lima *et al.* (2009), avaliando amostras de queijo Minas artesanal produzido no município de Serra do Salitre (Minas Gerais), observaram contagens destes microrganismos variando entre 10^2 e 10^6 UFC/g. A presença de bolores e leveduras contaminantes em queijos pode levar a alterações desagradáveis de cor, sabor e aparência, além da produção de micotoxinas, comprometendo a qualidade higiênico-sanitária e o interesse do consumidor pelo produto (Beresford *et al.*, 2001). A contaminação do queijo por bolores e leveduras sugere falhas nos procedimentos de higiene do ambiente de produção e dos manipuladores.

Entretanto, bolores e leveduras podem contribuir positivamente nos processos de

fermentação e maturação de produtos lácteos. Fungos miceliais, como *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti*, são essenciais durante o processo de maturação de queijos Roquefort, Gorgonzola, Camembert e Brie (Beresford *et al.*, 2001). Algumas leveduras, devido à atividade proteolítica e lipolítica, atuam, indiretamente, na formação de precursores aromáticos, tais como aminoácidos, ácidos graxos e ésteres, que contribuem para o desenvolvimento do sabor e textura característicos de certos tipos de queijos (Beresford *et al.*, 2001). As leveduras também podem estimular o crescimento de bactéria ácido-lácticas pela produção de compostos como dióxido de carbono, piruvato, propionato, succinato, ácido pantotênico, niacina, riboflavina e biotina. Além disto, a redução de pH promovido pela síntese de ácido láctico por bactérias, juntamente com a síntese de dióxido de carbono e álcool pelas leveduras, inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis em derivados lácteos (Álvarez-Martín *et al.*, 2008).

Salmonella spp. não foi isolada nas amostras de queijo Minas artesanal no presente estudo, o que está de acordo a legislação (Minas Gerais, 2008). Este microrganismo deve estar ausente em alimentos, tendo em vista que se trata de um patógeno, potencial causador de toxinfecção para o homem, representando um perigo a saúde pública. Apesar da observação de colônias sugestivas de *Salmonella* spp. nos meios de cultura seletivos (meios ágar BPLS, SS e He) e na triagem bioquímica pelos tubos de Rugai modificado, não houve reação positiva à sorologia. Este resultado é semelhante ao encontrado em outras pesquisas envolvendo o queijo Minas artesanal (Borelli, 2006; Ornelas, 2005; Brant, 2003; Borelli, 2002; Pereira *et al.*, 1999). A ausência de *Salmonella* spp. supõe a presença de uma microbiota variada no queijo, em particular, bactérias ácido-lácticas que produzem substâncias, como peróxido de hidrogênio,

ácidos e bacteriocinas, e enzimas que promovem transformações bioquímicas nesse alimento, tornando-o um ambiente adverso à sobrevivência de microrganismos patogênicos (Borelli, 2006; Salminen e Von Wright, 1993). De acordo com a triagem bioquímica pelos tubos de Rugai modificado, suspeitou-se da presença de outras bactérias Gram negativo como *Shiguelia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Enterobacter* spp..

4.3. Isolamento, enumeração e caracterização fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal

4.3.1. Isolamento e enumeração

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias dos resultados das contagens de

bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas em ágar MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais localizadas na região da Serra da Canastra, considerando a interação entre os fatores altitude e cadastramento.

As médias dos resultados e os coeficientes de variação das contagens de BAL, isoladas em ágar MRS e M17, das amostras de leite, soro-fermento e queijo artesanal coletadas em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra são apresentados na tabela 5. A tabela 6 apresenta as médias dos resultados e os coeficientes de variação das contagens de BAL dessas mesmas amostras coletadas em queijarias não cadastradas e cadastradas.

Tabela 5: Resultados médios (\bar{x}) e coeficientes de variação (CV) das contagens de BAL, isoladas em ágar MRS e ágar M17, em amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais nas diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Amostra	Altitude 1 (600-900 m)		Altitude 2 (900-1000 m)		Altitude 3 (>1000 m)	
	\bar{x} (UFC/ml ou g)	CV(%)	\bar{x} (UFC/ml ou g)	CV(%)	\bar{x} (UFC/ml ou g)	CV(%)
Leite (n=18)						
MRS	$5,8 \times 10^5$	195	$1,4 \times 10^5$	136	$7,9 \times 10^6$	224
M17	$4,2 \times 10^5$	198	$9,1 \times 10^5$	167	$1,2 \times 10^6$	134
Soro-fermento (n=18)						
MRS	$2,6 \times 10^7$	120	$3,2 \times 10^7$	186	$2,4 \times 10^7$	157
M17	$9,8 \times 10^7$	157	$4,3 \times 10^7$	130	$2,4 \times 10^8$	161
Queijo (n=18)						
MRS	$8,8 \times 10^{7a}$	102	$1,2 \times 10^{7b}$	218	$1,3 \times 10^{7ab}$	150
M17	$3,5 \times 10^{8a}$	118	$6,5 \times 10^{7b}$	103	$9,7 \times 10^{7ab}$	102

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)

Tabela 6: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) das contagens de BAL em amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Amostra	Não cadastrado				Cadastrado			
	MRS (UFC/ml ou g)		M17 (UFC/ml ou g)		MRS (UFC/ml ou g)		M17 (UFC/ml ou g)	
	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)
Leite (n=18)	6,3x10 ⁵	148	2,1x10 ⁵	85	2,1x10 ⁶	285	1,4x10 ⁶	113
Soro-fermento (n=18)	3,8x10 ⁷	132	1,2x10 ⁸	100	1,6x10 ⁷	180	1,3x10 ⁸	251
Queijo (n=18)	4,5x10 ⁷	183	2,4x10 ⁸	156	3,0x10 ⁷	127	1,0x10 ⁸	69

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias das contagens de BAL nas amostras de leite nas três altitudes pesquisadas (tabelas 5). As médias das contagens destes microrganismos também foram semelhantes ($p > 0,05$) em amostras de leite provenientes de queijarias cadastradas e não cadastradas (tabela 6). A não existência de diferença estatística indica que as fontes de variação pesquisadas (altitude e cadastramento) não interferiram nas contagens de BAL nas amostras de leite. Entretanto, estas contagens foram mais altas nas amostras de leite coletadas na altitude 3, independentemente do isolamento em ágar MRS ou ágar M17 (tabela 5). Fatores extrínsecos, ligados às características do ambiente, como temperatura e umidade relativa, poderiam interferir na multiplicação de BAL em propriedades localizadas nas diferentes altitudes.

Como vislumbrado na tabela 6, as amostras de leite provenientes de propriedades cadastradas registraram as maiores contagens de BAL, tanto em ágar MRS quanto em ágar M17. Os coeficientes de variação observados entre as médias da contagem de BAL do leite proveniente de propriedades não cadastradas foram menores que aqueles observados em amostras coletadas em queijarias cadastradas, independentemente do isolamento em ágar MRS ou ágar M17. Isso indicaria uma maior variação de populações de microrganismos

produtores de ácido láctico no leite dos rebanhos dessas propriedades rurais.

Em relação à altitude, os valores de CV das contagens de BAL das amostras de leite também foram altos, seja em ágar MRS ou ágar M17 (tabela 5). A altitude 3 apresentou o maior CV para ágar MRS e o menor CV para ágar M17. O menor CV para ágar MRS ocorreu nas amostras da altitude 2, enquanto que o maior CV para ágar M17 ocorreu na altitude 1. Considerando o que foi discutido no parágrafo anterior, a variabilidade de BAL no leite seria ainda mais relevante para as propriedades situadas na altitude 3, pois quando essa variável também é levada em consideração, percebe-se maior variação para o ágar MRS, no qual crescem melhor microrganismos do gênero *Lactobacillus*, os quais estariam mais associados ao sabor do queijo (Beresford *et al.*, 2001). Menores influências de alterações do sabor ácido estariam associadas a essa altitude, pois ela apresentou menor CV para microrganismos isolados em ágar M17, ou seja, principalmente a microbiota acidificante dos queijos, como *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Beresford *et al.*, 2001).

Franciosi *et al.* (2009), avaliando o leite cru utilizado na produção do queijo artesanal italiano Alpino, verificaram contagens de BAL superiores a 10^6 UFC/ml, tanto em ágar MRS quanto em ágar M17. Borelli (2006) encontrou contagens de BAL de 10^4 UFC/ml em amostras de leite utilizado na

produção de queijo artesanal da Serra da Canastra. Assim, o leite poderia representar uma importante fonte de BAL para o processo de produção dos queijos.

As médias das contagens de BAL foram semelhantes ($p>0,05$) nas amostras de soro-fermento nas três altitudes pesquisadas (tabelas 5). Também não houve diferença ($p>0,05$) entre as médias das contagens destes microrganismos no soro-fermento de queijarias não cadastradas e cadastradas (tabela 6). No entanto, para o isolamento em ágar MRS, as maiores contagens das BAL do soro-fermento foram observadas na altitude 2 e em queijarias não cadastradas. As amostras de soro-fermento coletadas em queijarias cadastradas e na altitude 3 apresentaram maiores contagens de BAL quando o isolamento foi feito em ágar M17. Os aspectos considerados na discussão das contagens de BAL das amostras de leite podem ser aplicados na avaliação das amostras de soro-fermento.

Elevados valores de CV foram verificados para as contagens de BAL das amostras de soro-fermento, independentemente do isolamento em ágar MRS e ágar M17, do cadastramento da queijaria e da altitude (tabelas 5 e 6). Os maiores valores de CV para o isolamento em ágar MRS ocorreram em queijarias cadastradas e localizadas na altitude 2. Para o isolamento em ágar M17, queijarias cadastradas e localizadas na altitude 3 apresentaram os maiores coeficientes de variação. Os aspectos considerados na discussão dos coeficientes de variação das contagens de BAL das amostras de leite podem ser aplicados na avaliação destes coeficientes para as amostras de soro-fermento.

Os resultados do presente estudo concordam com os descritos por Nóbrega (2007) e Borelli (2006). Nóbrega (2007) encontrou contagens de BAL superiores a 10^5 e 10^7 UFC/ml em meios MRS e M17, respectivamente, em amostras de soro-

fermento utilizado na produção de queijo Minas Artesanal produzido em Medeiros (Minas Gerais).

As contagens de BAL no soro-fermento foram maiores que aquelas registradas para o leite coletado na propriedade rural correspondente (tabelas 5 e 6). Borelli (2006) também observou, comparativamente, menores contagens das BAL nas amostras de leite coletadas em propriedades rurais na região da Serra da Canastra. As amostras de soro-fermento analisadas por aquele autor apresentaram contagens de BAL superiores a 10^8 UFC/ml. Segundo o mesmo, estas contagens eram esperadas, uma vez que o soro-fermento representa o soro escorrido dos queijos durante a fase de salga, contribuindo para a contaminação do leite durante a etapa de coagulação para a produção do queijo Minas artesanal. Embora o soro-fermento seja fundamental na elaboração do queijo Canastra, cuidados como, por exemplo, a refrigeração deste soro até o momento do uso, devem ser tomados para controlar o nível de contaminação deste (Borelli, 2006).

A altitude foi relevante nas contagens médias de BAL nas amostras de queijo Minas artesanal. De acordo com a tabela 5, percebe-se que as contagens médias de BAL, isoladas em meios MRS e M17, registradas na altitude 1 foram maiores que as registradas na altitude 2, pois foi constatada diferença ($p<0,05$). As contagens registradas na altitude 3 equivalem-se às médias encontradas tanto na altitude 1 ($p>0,05$) como na altitude 2 ($p>0,05$), para ambos meios. Tavarina e Malcata (2000), avaliando a microbiota do queijo artesanal português Serra da Estrela, verificaram que a localização geográfica da queijaria desempenhou importante papel na variabilidade microbiológica das amostras de queijo pesquisadas, devido, provavelmente, a variedade de práticas de higiene e produção do queijo seguidas pelos produtores.

O cadastramento da queijaria não interferiu nas médias de contagens de BAL dos queijos, pois não houve diferença ($p > 0,05$) entre as contagens destes microrganismos registradas em queijarias não cadastradas e cadastradas (tabela 6). Contudo, as maiores contagens de BAL foram registradas em queijos coletados em queijarias não cadastradas, independentemente do ágar de isolamento. Os aspectos considerados na discussão das contagens de BAL das amostras de leite e soro-fermento podem ser aplicados na avaliação das amostras de queijo.

Elevados valores de CV foram verificados para as contagens de BAL das amostras de queijo artesanal, independentemente do isolamento em ágar MRS e ágar M17, do cadastramento da queijaria e da altitude (tabelas 5 e 6). Os maiores valores de CV para o isolamento em ágar MRS ocorreram em queijarias não cadastradas e localizadas na altitude 2. Para o isolamento em ágar M17, queijarias cadastradas e localizadas na altitude 1 apresentaram os maiores coeficientes de variação, o que poderia determinar maiores alterações na acidez dos queijos produzidos nestas queijarias. Os aspectos considerados na discussão dos coeficientes de variação das contagens de BAL das amostras de leite e soro-fermento podem ser aplicados na avaliação destes coeficientes para as amostras de queijo.

As amostras de queijo Minas artesanal analisadas apresentaram contagens de BAL superiores aquelas observadas nas amostras de leite e soro-fermento (tabelas 5 e 6). Este resultado pode ser explicado pela manipulação excessiva que a massa do queijo é submetida durante a prensagem nas fôrmas e ao longo da maturação do produto nas prateleiras (Borelli, 2006). Segundo Rodríguez *et al.* (1995), um aumento nas contagens de microrganismos na massa é um processo normal durante a produção dos queijos. Isso ocorre, em parte, devido à

retenção física dos microrganismos na massa do queijo e a multiplicação microbiana durante a coagulação do leite, a dessoragem da massa e a maturação do produto.

As contagens médias de BAL isoladas de queijo Minas artesanal em ágar MRS variaram entre $1,2 \times 10^7$ e $8,8 \times 10^7$ UFC/g e $1,3 \times 10^7$ a $3,5 \times 10^8$ UFC/g em ágar M17 (tabelas 5 e 6). Estes resultados concordam com outros trabalhos envolvendo queijos artesanais (Lima *et al.*, 2009; Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009; Dolci *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2008; Borelli, 2006; Guedes Neto, 2004).

Como observado nas tabelas 5 e 6, a contagem total de BAL nos meios MRS e M17 apresentou-se ligeiramente diferente. Foi verificada correlação fraca (0,2) e não significativa ($p > 0,05$) entre as contagens de BAL isoladas nos dois meios. Uma provável explicação para este fato seria a composição do ágar MRS, que é mais específico para o isolamento de *Lactobacillus* spp., apresentando pH inferior ao do ágar M17, o que dificulta o crescimento de microrganismos menos tolerantes à acidez (Guedes Neto, 2004). O ágar M17 é mais específico para o isolamento de *Lactococcus* spp. Potes e Marinho (2007), avaliando amostras de queijo em Portugal, verificaram o isolamento de *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp e bactérias Gram negativo em ágar MRS. Em ágar M17, estes autores verificaram a presença de *Lactococcus* spp. e uma considerável contagem de bactérias Gram negativo. O citrato de amônio e o acetato de sódio presentes no ágar MRS inibiriam o desenvolvimento de contaminantes. O M17 foi considerado, naquele estudo, moderadamente seletivo, permitindo o crescimento de bactérias Gram negativo pela riqueza de nutrientes e ausência de substâncias inibidoras.

4.3.2. Caracterização fisiológica

A caracterização fisiológica dos microrganismos isolados das amostras de leite, soro fermento e queijo Minas artesanal coletadas na região da Serra da Canastra foi

realizada por intermédio da verificação da morfologia, realização de coloração de Gram e teste de catalase (tabela 7), além do teste respiratório (anexo 1).

Tabela 7: Características fisiológicas (morfologia, coloração de Gram e teste de catalase) de microrganismos isolados em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite (n=18), soro-fermento (n=18) e queijo Minas artesanal (n=18) coletadas na região da Serra da Canastra (MG)

Amostra	Morfologia		Gram		Catalase	
	Bastonetes	Cocos	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Leite (n=18)	3	70	70	3	0	73
MRS	3 (100%)	20 (28,57%)	22 (31,43%)	1 (33,33%)	0 (0%)	22 (30,55%)
M17	0 (0%)	50 (71,43%)	48 (68,57%)	2 (66,67%)	0 (0%)	51 (69,45%)
Soro-fermento (n=18)	34	109	140	2	0	143
MRS	28 (82,35%)	32 (29,35%)	58 (41,42%)	1 (50%)	0 (0%)	60 (41,96%)
M17	6 (17,65%)	77 (70,65%)	82 (58,57%)	1 (50%)	0 (0%)	83 (58,04%)
Queijo (n=18)	70	89	158	1	0	159
MRS	59 (84,28%)	7 (7,86%)	66 (41,77%)	0 (0%)	0 (0%)	66 (41,50%)
M17	11 (15,72%)	82 (92,13%)	92 (58,22%)	1 (100%)	0 (0%)	93 (58,50%)

Ao todo, foram obtidos 375 microrganismos isolados: 73 amostras de microrganismos isolados de leite, 143 de soro-fermento e 159 de queijo Minas artesanal. Perfil semelhante de isolamento, como as menores quantidades de bastonetes Gram positivo catalase negativo observadas em leite e as maiores quantidades destes em queijo, por exemplo, foi verificado em outros estudos (Lima *et al.*, 2009; Borelli, 2006) envolvendo queijos artesanais mineiros. Segundo Borelli (2006), após a adição do soro-fermento ao leite, com menor contagem microbiana, o nível de contaminação na amostras de queijo Minas artesanal é elevado.

O teste respiratório (anexo 1) revelou que a maioria dos 375 microrganismos isolados, seja em ágar MRS ou em ágar M17, apresentou crescimento sob as três condições de incubação testadas, apesar de o isolamento inicial ter sido feito sob

aerobiose. Os microrganismos podem ser caracterizados, então, como anaeróbios facultativos ou microaerófilos. Tal fato representa uma vantagem evolutiva aos mesmos, demonstrando a capacidade de adaptação destes microrganismos a diferentes tipos de atmosferas. No caso dos queijos, a parte interior dos mesmos poderia favorecer o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, enquanto que seu exterior seria mais favorável ao crescimento de aeróbios. Entretanto, os queijos artesanais coletados foram amostrados uniformemente, incluindo partes internas e externas, o que pode parcialmente, explicar a diversidade do crescimento observado. Essa diversidade de comportamento biológico estaria relacionada à origem desses microrganismos, como solo, pastagem, altitude, temperatura e água da região da Serra da Canastra.

Considerando o isolamento nos dois meios de cultura, percebe-se que o ágar MRS foi mais seletivo para o isolamento de bastonetes Gram positivo e catalase negativo (tabela 7). O meio MRS é indicado para o isolamento de *Lactobacillus* spp., gênero de BAL caracterizado como bastonetes Gram positivo, catalase negativo e, preferencialmente, microaerófilos. A presença de cocos Gram positivo, anaeróbios facultativos ou microaerófilos (anexo 1) e catalase negativo, em ágar MRS, sugere a ocorrência de BAL dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*. O meio M17 é mais seletivo para o isolamento de BAL do gênero *Lactococcus* spp., caracterizado como cocos Gram positivo, aeróbios e catalase negativo. A observação de cocos Gram positivo, aeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos indica a possibilidade da existência de *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp..

Em relação às características morfotintórias (tabela 7), houve a predominância de cocos Gram positivo e catalase negativo dentre os 375 microrganismos isolados, sugerindo a presença de *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Este resultado está coerente com outros trabalhos envolvendo leite (Franciosi *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009), soro-fermento (Nóbrega, 2007; Leite, 1993) e queijos artesanais (Lima *et al.*, 2009; Dolci *et al.*, 2008; Ballesteros *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2005; Cogan *et al.*, 1997).

4.4. Identificação das bactérias ácido-lácticas isoladas de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal, de acordo com técnicas de Biologia Molecular

Foram submetidas à identificação no nível molecular 369 amostras de microrganismos, sendo 70 isolados de leite, 141 de soro-fermento e 158 de queijo Minas artesanal. Os microrganismos que apresentaram coloração de Gram negativo (seis amostras) não foram submetidos à identificação

molecular por não se tratarem de bactérias ácido-lácticas, que são caracterizadas por serem Gram positivo (vide tabela 7).

Os microrganismos caracterizados como bastonetes Gram positivo, catalase negativo, com crescimento anaeróbio facultativo ou microaerófilo, seja em ágar MRS ou ágar M17, apresentaram três ou mais cópias da região intergênica 16S-23S, de três tamanhos (pares de bases) semelhantes, em seu DNA (amplificação de três ou mais segmentos de DNA). Este fato é indicativo de espécies de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus* e *Weissella* (Tannock *et al.*, 1999). Em ágar MRS, a presença de cocos anaeróbios facultativos ou microaerófilos, Gram positivo, catalase negativo, possuindo, no mínimo, uma e duas cópias da região intergênica 16S-23S, de um e dois tamanhos (pares de bases) semelhantes, em seu DNA (amplificação de um ou mais e dois ou mais segmentos de DNA), sugere o isolamento de espécies pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, respectivamente (Tannock *et al.*, 1999). Entretanto, em ágar M17, a presença de cocos aeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, Gram positivo, catalase negativo, possuindo uma e duas cópias da região intergênica 16S-23S em seu DNA, sugere o isolamento de microrganismos pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*, respectivamente.

O anexo 2 apresenta fotos de géis de agarose relativos à PCR-ARDRA 16S-23S rDNA. A região intergênica 16S-23S representada como três bandas de DNA, com pesos moleculares diferentes, sugere material genético de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* spp. e *Weissella* spp.. Isto ocorre porque uma banda pode representar uma ou mais regiões intergênicas com pesos moleculares semelhantes, amplificadas na reação de PCR. Como estes fragmentos de DNA apresentam velocidade de migração muito parecida durante a eletroforese, ao

final desta análise, os mesmos irão se localizar muito próximos, produzindo a imagem de uma só banda. A mesma discussão pode ser aplicada para os resultados que demonstraram a amplificação de uma e duas bandas no gel de agarose, sugerindo a presença de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., respectivamente, em ágar MRS, e *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp., respectivamente, em ágar M17.

Os genes 16S e 23S são copiados mais de uma vez no genoma destas bactérias por codificarem estruturas vitais para os microrganismos: subunidades ribossômicas utilizadas para a síntese protéica. Como esse fato é comum entre as bactérias e esta região genômica é extremamente variável entre os microrganismos de espécies diferentes, porém, bem conservada na mesma espécie, torna-se necessária a utilização de técnicas complementares para a identificação dos microrganismos isolados no nível molecular (Guedes Neto, 2004).

Um total de 353 BAL, o que corresponde a 96% dos isolados, foi identificado a partir das amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais na região da Serra da Canastra (Minas Gerais). Cinco diferentes perfis de restrição da restrição da região de amplificação do gene 16S-23S rDNA foram obtidos (anexo 3). O anexo 4 mostra fotos de géis de agarose após a restrição enzimática dos produtos de PCR 16S-23S rDNA. A distinção entre as espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paraplantarum*, que apresentam perfis de restrição enzimática semelhantes, foi feita a partir da técnica de PCR *multiplex* para amplificação da região do gene *recA* (Torriani *et al.*, 2001). O anexo 4 (figura 8) apresenta a foto do gel de agarose após a PCR *multiplex*.

Dezesseis microrganismos, sendo quatro isolados de leite, três isolados de soro-

fermento e nove isolados de queijos, não puderam ser identificados pela técnica de restrição enzimática. Apesar de os resultados da reação de PCR-ARDRA 16S-23S rDNA e das análises de coloração morfo-tintoriais indicarem que estas amostras podem pertencer ao gênero *Lactobacillus*, as mesmas foram consideradas bactérias ácido-láticas (BAL), pois o perfil de restrição enzimática de produto de PCR-ARDRA 16S-23S das mesmas não permitiu a identificação no nível de espécie.

A distribuição das espécies de BAL isoladas em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas nas propriedades rurais localizadas em diferentes altitudes é apresentada na tabela 8. A tabela 9 contempla a distribuição das espécies de BAL isoladas em meios MRS e M17 a partir dessas mesmas amostras coletadas em propriedades cadastradas e não cadastradas.

Destaca-se, inicialmente, que o total de isolados identificados nas amostras de leite, soro-fermento e queijo como *Enterococcus* spp., pode estar, aparentemente, superestimado, devido ao possível isolamento de microrganismos deste gênero nos dois meios de cultura utilizados no isolamento primário.

As tabelas 8 e 9 mostram que *Enterococcus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado de leite utilizado na produção de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra. Este resultado está de acordo com o encontrado por Franciosi *et al.* (2009) e Lima *et al.* (2009) em amostras de leite destinadas a produção de queijos artesanais. A presença de *Enterococcus* spp. em alimentos pode estar associada a condições de higiene precárias, pois este microrganismo compõe a microbiota intestinal de alguns mamíferos e aves (Jay *et al.*, 2005).

Tabela 8: Bactérias ácido-lácticas isoladas em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Microrganismos	Altitude 1 (600-900 m)		Altitude 2 (900-1000 m)		Altitude 3 (>1000 m)		Total
	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	
Leite (n=18)							
<i>L. casei</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>L. plantarum</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>Enterococcus</i> spp.	5	8	1	5	3	10	32
<i>Lactococcus</i> spp.	-	8	-	8	-	5	21
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	5	-	5	-	10
BAL	-	1	-	2	-	1	4
Total	7	17	7	15	8	16	70
		24		22		24	
Soro-fermento (n=18)							
<i>L. casei</i>	5	-	1	-	-	-	6
<i>L. rhamnosus</i>	6	-	-	-	-	-	6
<i>L. plantarum</i>	3	-	5	-	7	-	15
<i>Enterococcus</i> spp.	6	4	2	5	5	6	28
<i>Lactococcus</i> spp.	-	18	-	24	-	23	65
<i>Streptococcus</i> spp.	2	-	6	-	10	-	18
BAL	-	1	-	1	1	-	3
Total	22	23	14	30	23	29	141
		45		44		23	
Queijo (n=18)							
<i>L. casei</i>	6	-	3	-	8	1	18
<i>L. rhamnosus</i>	5	-	9	1	3	2	20
<i>L. plantarum</i>	7	-	7	-	3	-	17
<i>L. paraplantarum</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>L. hilgardii</i>	1	-	2	-	1	-	4
<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Enterococcus</i> spp.	2	11	1	9	4	7	34
<i>Lactococcus</i> spp.	-	19	-	16	-	19	54
BAL	2	2	-	3	-	2	9
Total	23	32	22	29	21	31	158
		55		51		52	

Tabela 9: Bactérias ácido-lácticas isoladas em meios MRS e M17 a partir de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Microrganismos	Não cadastrado		Cadastrado		Total
	MRS	M17	MRS	M17	
Leite (n=18)					
<i>L. casei</i>	-	-	1	-	1
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	1	-	1
<i>L. plantarum</i>	-	-	1	-	1
<i>Enterococcus</i> spp.	5	11	4	12	32
<i>Lactococcus</i> spp.	-	8	-	13	21
<i>Streptococcus</i> spp.	6	-	4	-	10
BAL	-	3	-	1	4
Total	11	22	11	26	70
		33		37	
Soro-fermento (n=18)					
<i>L. casei</i>	6	-	-	-	6
<i>L. rhamnosus</i>	3	-	3	-	6
<i>L. plantarum</i>	9	-	6	-	15
<i>Enterococcus</i> spp.	9	9	4	6	28
<i>Lactococcus</i> spp.	-	30	-	35	65
<i>Streptococcus</i> spp.	7	-	11	-	18
BAL	-	2	1	-	3
Total	34	41	25	41	141
		75		66	
Queijo (n=18)					
<i>L. casei</i>	8	-	9	1	18
<i>L. rhamnosus</i>	9	-	8	3	20
<i>L. plantarum</i>	8	-	9	-	17
<i>L. paraplantarum</i>	-	-	1	-	1
<i>L. hilgardii</i>	2	-	2	-	4
<i>W. paramesenteroides</i>	1	-	-	-	1
<i>Enterococcus</i> spp.	5	16	2	11	34
<i>Lactococcus</i> spp.	-	30	-	24	54
BAL	1	3	1	4	9
Total	34	49	32	43	158
		83		75	

A ocorrência de *Enterococcus* spp. em alimentos é questionada por este microrganismo ser capaz de desencadear problemas como endocardite e infecções do trato urinário em humanos e transmitir genes associados à resistência aos antimicrobianos e à presença de fatores de virulência, como gelatinase, substância de agregação e proteína de superfície (Dolci *et al.*, 2008; Jay *et al.*, 2005; Camargos, 2005). Entretanto, a presença desta bactéria em queijos está relacionada com intensa atividade lipolítica, produção de compostos aromáticos voláteis a partir do citrato, como

diacetil, acetaldeído e acetoína, e produção de bacteriocinas que controlariam o desenvolvimento de patógenos (Bulut *et al.*, 2005). Kongo *et al.* (2007) sugeriram que *Enterococcus* spp. seria importante na acidificação e na produção do aroma do queijo artesanal português São Jorge. A presença de *Enterococcus* spp. em queijos artesanais já foi descrita por diversos autores, no Brasil (Lima *et al.*, 2009; Borelli, 2006; Carvalho *et al.*, 2005; Guedes Neto, 2004) e em diferentes países do mundo (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009; Dolci *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2008; Ballesteros *et al.*,

2006; Bulut *et al.*, 2005; Ouadghiri *et al.*, 2005; Cogan *et al.*, 1997).

Maior número de *Enterococcus* spp. foi isolado em ágar M17, independentemente do cadastramento ou do nível de altitude da propriedade rural. O cadastramento não interferiu no isolamento de *Enterococcus* spp. em leite (tabela 9), entretanto, foi observado que queijarias localizadas na altitude 2 apresentaram menor número de isolados (tabela 8). Fatores ambientais como temperatura e umidade, além da microbiota do leite, poderiam estar relacionados com esta observação. A microbiota do leite cru estaria relacionada com os microrganismos presentes no úbere e pele das vacas e com aqueles encontrados no ambiente de ordenha (Jay *et al.*, 2005).

Franciosi *et al.* (2009) observaram que as contagens de BAL em amostras de leite, independentemente do isolamento em ágar MRS ou ágar M17, sempre demonstraram a predominância de cocos sobre bastonetes. Isto concorda com o observado no presente estudo, pois, como visualizado nas tabelas 8 e 9, bastonetes, representados por microrganismos do gênero *Lactobacillus*, apresentaram apenas três isolados. Cocos, representados por *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp., corresponderam a 63 isolados. Segundo Franciosi *et al.* (2009), quando o leite cru é deixado em temperatura ambiente por algum tempo, a microbiota na qual predominam cocos mesofílicos será estimulada.

O sabor particular e algumas características sensoriais típicas de queijos feitos com leite cru estão associados com atributos específicos do leite, relacionados com a raça e nutrição do rebanho, o processo de produção do queijo e a microbiota natural responsável pelos processos de fermentação e maturação do queijo (Beresford *et al.*, 2001).

As tabelas 8 e 9 mostram que *Lactococcus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado nas amostras de soro-fermento utilizado na produção do queijo Minas artesanal. Este resultado concorda com o encontrado por Nóbrega (2007) e Leite (1993) em amostras de soro-fermento. Durante a produção de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra não são utilizadas culturas iniciadoras industrializadas. A microbiota presente no queijo, responsável pela fermentação e maturação, é proveniente do ambiente, do leite e do soro-fermento (Borelli, 2006).

Maior número de *Lactococcus* spp. foi isolado em amostras de soro-fermento de queijarias cadastradas e localizadas na altitude 2 (tabelas 8 e 9). Fatores ambientais como temperatura e umidade, além da microbiota do soro-fermento, poderiam estar relacionados com esta observação.

Lactococcus spp. tem papel importante e desejável na produção de queijos, seja pela atividade proteolítica, ou pela produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, que podem colaborar no aparecimento do sabor e aroma característico do produto (Beresford *et al.*, 2001). Outros autores já descreveram a presença de *Lactococcus* spp. em queijos artesanais (Lima *et al.*, 2009; Dolci *et al.*, 2008; Nikolic *et al.*, 2008; Ballesteros *et al.*, 2006; Bulut *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2005; Ouadghiri *et al.*, 2005; Guedes Neto, 2004; Cogan *et al.*, 1997).

A quantidade de BAL isoladas no soro-fermento (tabelas 8 e 9) foram maiores que aquelas registradas para o leite coletado na propriedade rural correspondente, com exceção para *Enterococcus* spp., que apresentou maior número de isolados em leite. Como já discutido em itens anteriores deste estudo, esta observação era esperada, uma vez que o soro-fermento representa o soro escorrido dos queijos durante a fase de salga, contribuindo para a contaminação do

leite durante a etapa de coagulação para a produção do queijo Minas artesanal.

Em relação ao perfil de espécies de *Lactobacillus* isoladas nas amostras de soro-fermento (tabelas 8 e 9), percebe-se que não houve alteração deste perfil quando comparado às amostras de leite. Entretanto, maiores quantidades de microrganismos deste gênero foram observadas no soro-fermento. *Lactobacillus casei* foi isolada apenas em soro-fermento coletado em queijarias não cadastradas. Contrariamente, a mesma espécie, em leite, foi isolada em queijaria cadastrada.

Lactobacillus plantarum foi a espécie mais isolada em soro-fermento, resultado este semelhante ao encontrado por Borelli (2006) em amostras de soro-fermento. *Lactobacillus plantarum* é caracterizado como heterofermentador facultativo, ou seja, capaz de utilizar hexoses, para produção de ácido láctico, e pentoses, para produção de ácidos láctico e acético (Stiles e Holzapfel, 1997). A produção de bacteriocinas por esta espécie já foi relatada (Salminen e Von Wright, 1993). Segundo Ouadghiri *et al.* (2005), *Lactobacillus plantarum* contribuiria para o desenvolvimento do sabor e produção de agentes antimicrobianos protetores em queijos.

As tabelas 8 e 9 mostram que *Lactobacillus* foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado no queijo Minas artesanal da Serra da Canastra. *Lactobacillus rhamnosus* foi o predominante dentro deste gênero, seguido por *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus paraplantarum*. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* também foram isolados por Borelli (2006) em amostras de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades rurais da região da Serra da Canastra. Os anexos 5 e 6 apresentam as populações de BAL isoladas de cada amostra de queijo Minas artesanal da região

da Serra da Canastra em meios MRS e M17, respectivamente.

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* foram isolados das amostras de leite e soro-fermento, porém, em menores quantidades quando comparados ao queijo (tabelas 8 e 9). Sugere-se que estas espécies estariam bem adaptadas ao ambiente de produção dos queijos, contribuindo talvez para o desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto. Entretanto, como destacado por Borelli (2006), o papel destes microrganismos no queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra precisa ainda ser mais bem estudado.

O gênero *Lactobacillus* é descrito como predominante em certos tipos de queijos artesanais pelo fato deste microrganismo ser capaz de se desenvolver nas condições altamente seletivas do ambiente do queijo, como o baixo pH e a elevada concentração salina (Torres-Llanez *et al.*, 2005). *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* representam exemplos de microrganismos desejáveis à produção de queijos pelas características sensoriais e por serem microrganismos com importante papel probiótico (Holzapfel *et al.*, 2001). Estas espécies são caracterizadas como heterofermentadoras facultativas (Stiles e Holzapfel, 1997). Pelo menos uma destas espécies de BAL já foi isolada em outros trabalhos envolvendo queijos artesanais (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009; Dolci *et al.*, 2008; Kongo *et al.*, 2007; Ballesteros *et al.*, 2006; Bulut *et al.*, 2005; Ouadghiri *et al.*, 2005; Guedes Neto, 2004) em diferentes países do mundo.

Lactobacillus hilgardii é caracterizado como heterofermentador obrigatório, ou seja, é capaz de utilizar hexoses para produção de ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono (Stiles e Holzapfel, 1997). Esta espécie já foi descrita como

componente da microbiota de queijos artesanais italianos (Di Cagno *et al.*, 2006; Baruzzi *et al.*, 2000), turcos (Şengül, 2006) e gregos (Vafopoulou-Mastrojiannaki *et al.*, 1996). Concentrações mais baixas de ácidos graxos livres foram encontradas em queijos que continham *Lactobacillus hilgardii* (Di Cagno *et al.*, 2006). A espécie também já foi encontrada em kefir (Farnworth, 2005), vinhos (Mazzoli *et al.*, 2009; Alberto *et al.*, 2004), na bebida fermentada mexicana Pulque (Escalante *et al.*, 2004) e na bebida destilada japonesa Shochu (Endo e Okada, 2007). No Brasil, *Lactobacillus hilgardii* foi encontrado como contaminante no processo fermentativo da produção artesanal de cachaça (Netto *et al.*, 2008). Não foi encontrado relato na literatura pesquisada a respeito da presença de *Lactobacillus hilgardii* em queijos artesanais ou industriais brasileiros.

A literatura consultada também não relatou trabalhos sobre a ocorrência de *Lactobacillus paraplantarum* em queijos brasileiros. Esta espécie é caracterizada como heterofermentadora facultativa (Stiles e Holzapfel, 1997). Este microrganismo já foi isolado em queijos artesanais italianos (Baruzzi *et al.*, 2000; Mannu *et al.*, 2000), gregos (Manolopoulou *et al.*, 2003; Psoni *et al.*, 2003) e azerbaijanos (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009). Settanni *et al.* (2005) relataram a ocorrência de *Lactobacillus paraplantarum* em fermento utilizado em panificação.

Como no presente trabalho, *Weissella paramesenteroides* também foi isolada por Borelli (2006) em queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra. Como observado nas tabelas 8 e 9, este microrganismo foi isolado em queijaria cadastrada e localizada na altitude 3. Geralmente, temperaturas mais amenas são encontradas em elevadas altitudes. *Weissella paramesenteroides* cresce bem a 30°C, mas algumas amostras preferem temperaturas mais baixas, entre 18 e 24°C (Garvie, 1986).

Ela é uma espécie mais tolerante ao NaCl e a pH mais baixo (Garvie, 1986). As espécies do gênero *Weissella* são heterofermentadoras obrigatórias (Stiles e Holzapfel, 1997).

Trabalhos conduzidos na Itália (Coppola *et al.*, 2006), Grécia (Gerasi *et al.*, 2003) e Espanha (Mas *et al.*, 2002) isolaram *Weissella paramesenteroides* em queijos artesanais. A ocorrência do gênero *Weissella* em queijos estaria envolvida em reações de proteólise, importantes para o desenvolvimento de sabor característico em queijos maturados (Guedes Neto, 2004).

Streptococcus spp. foi isolado das amostras de leite e soro-fermento utilizados na produção do queijo Minas artesanal (tabelas 8 e 9). Resultados semelhantes foram observados por Franciosi *et al.* (2009) e Lima *et al.* (2009), em amostras de leite, e por Lima *et al.* (2009), Nóbrega (2007) e Leite (1993). O gênero *Streptococcus* não foi encontrado nas amostras de queijo Minas artesanal avaliadas. Segundo Stiles e Holzapfel (1997), *Streptococcus* spp. possui requerimentos nutricionais complexos, prosperando em ambientes com bom suprimento de carboidratos e proteínas.

4.5. Qualidade físico-química do leite

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos parâmetros físico-químicos das amostras de leite coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, localizadas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais), considerando a interação entre os fatores altitude e cadastramento.

As médias dos resultados e os coeficientes de variação dos parâmetros físico-químicos das amostras de leite coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, localizadas em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra são apresentados na tabela 10. A tabela 11

apresenta as médias dos resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de

leite coletadas em queijarias não cadastradas e cadastradas na região da Serra da Canastra.

Tabela 10: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de leite coletadas em propriedades rurais, produtoras de queijo Minas artesanal, em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetros físico-químicos	Altitude 1 (600-900 m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000 m) (n=6)		Altitude 3 (>1000 m) (n=6)	
	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)
	Acidez titulável (°D)	16,98	5,80	17,67	11,21	16,68
Gordura (%)	4,21	36,38	4,28	29,39	3,32	29,45
Nitrogênio total (%)	3,16	8,37	3,29	8,73	3,14	6,00
Lactose (%)	4,55	2,97	4,56	3,32	4,48	2,17
Extrato seco total (EST) (%)	12,8	14,48	13,1	11,27	11,78	9,54
Extrato seco desengordurado (ESD) (%)	8,6	4,26	8,78	4,60	8,45	2,48

Tabela 11: Resultados médios (x) e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de leite coletadas em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetros físico-químicos	Não cadastrado (n=9)		Cadastrado (n=9)	
	x	CV(%)	x	CV(%)
Acidez titulável (°D)	17,7	5,60	17,21	9,86
Gordura (%)	3,19 ^a	23,76	4,69 ^b	27,27
Nitrogênio total (%)	3,12	8,81	3,27	5,84
Lactose (%)	4,59	2,55	4,47	2,55
Extrato seco total (EST) (%)	11,69 ^a	9,03	13,4 ^b	11,11
Extrato seco desengordurado (ESD) (%)	8,5	4,03	8,71	3,81

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ($p < 0,05$)

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias dos parâmetros físico-químicos – acidez titulável e teores percentuais de gordura, nitrogênio total, lactose, EST e ESD – avaliados em amostras de leite coletadas nas três altitudes pesquisadas (tabela 10). Entretanto, os maiores teores percentuais para a composição físico-química das amostras de leite foram percebidos na altitude 2. Os menores teores percentuais, para todos estes parâmetros, foram observados nas amostras de leite coletadas na altitude 3. A altitude 3 registrou, ainda, os menores valores de CV para todos os parâmetros avaliados, com exceção para o teor percentual de gordura, cujo menor CV foi registrado na altitude 2. As características das condições ambientais e do rebanho na altitude 3 poderiam ser mais

homogêneas, interferindo, assim, nos valores de CV observados.

O cadastramento não interferiu ($p > 0,05$) na comparação entre as médias de acidez titulável e teores percentuais de nitrogênio total, lactose e ESD avaliados nas amostras de leite coletadas (tabela 11). No entanto, propriedades não cadastradas apresentaram amostras de leite com menores teores nitrogênio total e ESD, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Houve diferença ($p < 0,05$) entre as médias dos teores percentuais de gordura e EST das amostras de leite quando foi considerando o cadastramento da queijaria (tabela 11). A gordura é o componente mais variável do leite, influenciado por fatores genéticos,

ambientais e de manejo, especialmente pela nutrição (Fonseca e Santos, 2000). As amostras de leite provenientes de queijarias cadastradas apresentaram teores percentuais de gordura e EST mais elevados, com maiores valores de CV, que as queijarias não cadastradas, o que interfere positivamente no rendimento do queijo. Sugere-se que o queijo Minas artesanal produzido em queijarias cadastradas, na região da Serra da Canastra, apresentaria melhor rendimento que aquele produzido em queijarias não cadastradas.

As médias de todos os parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras de leite (tabelas 10 e 11) estão de acordo com o estabelecido na legislação (Minas Gerais, 2008). As médias referentes aos teores percentuais de nitrogênio total, lactose, EST e ESD em amostras de leite coletadas em propriedades rurais na região da Serra da Canastra foram semelhantes às aquelas encontradas por Ornelas (2005). Este autor, entretanto, encontrou valores de CV bem

abaixo dos valores encontrados no presente trabalho para todos os parâmetros avaliados.

4.6. Qualidade físico-química do queijo Minas artesanal

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre as médias dos parâmetros físico-químicos das amostras de queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais localizadas na região da Serra da Canastra (Minas Gerais), considerando a interação entre os fatores altitude e cadastramento.

As médias dos resultados e os coeficientes de variação dos parâmetros físico-químicos das amostras de queijo artesanal coletadas em propriedades rurais localizadas em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra são apresentados na tabela 12. A tabela 13 apresenta as médias dos resultados e os coeficientes de variação dos parâmetros físico-químicos das amostras de queijo Minas artesanal coletadas em queijarias não cadastradas e cadastradas na região da Serra da Canastra.

Tabela 12: Resultados médios e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetros físico-químicos	Altitude 1 (600-900 m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000 m) (n=6)		Altitude 3 (>1000 m) (n=6)	
	x	CV(%)	x	CV(%)	x	CV(%)
	Acidez titulável (% ácido láctico)	0,67	17,81	0,7	18,67	0,68
pH	5,52	5,45	5,2	5,48	5,35	4,25
Gordura (%)	29	10,05	27	8,09	29,5	18,01
Extrato seco total (EST) (%)	59,18	3,89	56,21	6,66	57,43	8,56
Gordura no extrato seco (GES) (%)	48,95	7,98	48,13	8,58	51,11	10,28
Umidade (%)	40,82	5,64	43,79	8,55	42,56	11,55
Nitrogênio total (%)	23,89	12,62	24,42	17,44	23,5	10,73

Tabela 13: Resultados médios e coeficiente de variação (CV) dos parâmetros físico-químicos de 18 amostras de queijo Minas artesanal coletado em propriedades rurais não cadastradas e cadastradas pelo IMA na região da Serra da Canastra (MG)

Parâmetros físico-químicos	Não cadastrado (n=9)		Cadastrado (n=9)	
	x	CV(%)	x	CV(%)
Acidez titulável (% ácido láctico)	0,65	9,11	0,72	17,70
pH	5,34	6,57	5,38	4,32
Gordura (%)	27,58	9,51	29,42	15,12
Extrato seco total (EST) (%)	56,51	5,63	58,71	7,15
Gordura no extrato seco (GES) (%)	48,78	6,81	50,01	10,80
Umidade (%)	43,49	7,32	41,29	10,17
Nitrogênio total (%)	23,18	10,81	24,7	15,00

As médias dos parâmetros físico-químicos das amostras de queijo Minas artesanal foram semelhantes ($p > 0,05$) nas três altitudes pesquisadas (tabela 12). Entretanto, menores valores de pH e teores percentuais de gordura, EST e GES foram observados em queijos coletados na altitude 2. Acidez titulável e umidade apresentaram os menores teores percentuais em queijos coletados na altitude 1. Os teores percentuais de nitrogênio total foram menores em queijos coletados na altitude 3. Assim como os teores percentuais, os valores de CV para todos os parâmetros avaliados não seguiram um padrão. Fatores ambientais, como temperatura e umidade relativa, e as heterogeneidades do rebanho e das técnicas empregadas na produção do queijo Minas artesanal em cada propriedade rural poderiam, em parte, explicar as variações observadas neste produto (Machado, 2000).

Da mesma forma, as médias dos parâmetros físico-químicos foram iguais ($p > 0,05$) em amostras de queijos provenientes de queijarias não cadastradas e cadastradas (tabela 13). Entretanto, observa-se que os parâmetros avaliados, com exceção para a umidade, apresentaram maiores teores em queijos coletados em propriedades cadastradas. Estas propriedades registraram também os maiores valores de CV, com exceção para o pH. Segundo Silva (2007), maiores valores de CV em parâmetros físico-químicos de queijo Minas artesanal

produzido na região da Serra da Canastra podem ser explicados pela falta de padronização no processo de produção do queijo, por variação na quantidade de soro-fermento adicionada ao leite, por espécies e concentrações variadas da microbiota endógena do soro-fermento e por variações no tempo e quantidade de sal utilizada no processo de salga dos queijos.

Os teores percentuais de acidez titulável (tabelas 12 e 13) estão próximos aos encontrados por Pereira *et al.* (2007) e Vargas *et al.*, (1998) em estudos a respeito do queijo Minas artesanal produzido na Serra da Canastra e Serro, respectivamente. Entretanto, os teores de acidez titulável no presente trabalho foram diferentes daqueles descritos por Silva (2007), Araújo (2004) e Machado (2002), que também avaliaram queijos artesanais mineiros. Por ser prensado manualmente, o queijo Minas artesanal apresenta retenção de soro desuniforme, o que interfere na quantidade de lactose eliminada no soro. Assim, diferentes teores de lactose podem ser convertidos em ácido láctico nos queijos por BAL provenientes do leite, soro-fermento e ambiente.

A prensagem também influencia o pH final do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, pois neste ponto da produção a massa ainda contém um considerável teor de lactose. Os valores médios de pH observados nas tabelas 12 e 13 são

semelhantes aos valores encontrados por Silva (2007) e Vargas *et al.* (1998).

Os teores percentuais médios de gordura e gordura no extrato seco total (GES) encontrados para as amostras de queijo (tabelas 12 e 13) permitem classificar os queijos artesanais da Serra da Canastra avaliados como gordos (Brasil, 1996). Estes resultados apresentam-se próximos aos encontrados por Pereira *et al.* (2007), Silva (2007) e Ornelas (2005)

A variação nos percentuais de gordura em queijo Minas artesanal seria justificada pela ausência de padronização do leite e por diferentes manejos nutricionais dos rebanhos, além da presença de microbiota lipolítica em leite (Ornelas, 2005).

Segundo Machado (2002), os teores de gordura, proteínas e umidade estão diretamente relacionados com a prensagem e com a maneira de se trabalhar a massa do queijo Minas artesanal. Uma agitação brusca na massa pode romper a sua estrutura, liberando lipídios, proteínas e outras substâncias que serão perdidas com a dessoragem. A força aplicada durante a prensagem influenciará a maior ou menor compactação da massa, resultando em queijos com diferentes teores de umidade e gordura.

Os teores percentuais médios de umidade (tabelas 12 e 13) das amostras de queijo Minas artesanal coletadas em propriedades rurais na região da Serra da Canastra permitem classificar estes queijos como sendo de média umidade (Brasil, 1996). Os teores médios de umidade encontrados atendem a legislação estadual (Minas Gerais, 2008). Em seus trabalhos, Silva (2007) e Ornelas (2005) também classificaram o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra como sendo de média umidade. Segundo Ornelas (2005), a variação dos teores de umidade estaria associada àquela encontrada para o EST dos

mesmos queijos e ambas podem ser justificadas pela adoção de diferentes técnicas de corte e dessoragem da massa, além da ausência de padronização do tempo de maturação dos queijos Minas artesanais produzidos na região da Serra da Canastra,

Os teores médios de nitrogênio total (tabelas 12 e 13) foram semelhantes aos encontrados por Silva (2007) e Araújo (2004). O processo de elaboração do queijo artesanal pode influenciar o teor de proteína total. O corte adiantado e a mexedura irregular da massa do queijo podem levar a perda de proteínas para o soro, diminuindo o rendimento do queijo.

5. CONCLUSÕES

Não foi verificada interação entre os fatores altitude e cadastramento oficial das queijarias na avaliação dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos das amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal coletadas na região da Serra da Canastra.

Queijos Minas artesanais da Serra da Canastra produzidos em queijarias cadastradas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária apresentaram melhor controle higiênico sanitário que aqueles oriundos de queijarias não cadastradas, resultando em alimentos mais seguros ao consumidor, o que ressalta a importância da fiscalização e inspeção.

O principal contaminante indesejável dos queijos analisados foi *Staphylococcus spp.*, indicando a necessidade de melhor controle desse microrganismo, independentemente do cadastramento das queijarias.

Existe grande variação dos resultados dos parâmetros microbiológicos avaliados para as amostras de leite e queijo, independentemente da altitude e cadastramento da queijaria. Isto pode ser indicativo da ausência de padronização nos

procedimentos de obtenção do leite e elaboração do queijo Minas artesanal entre as propriedades rurais.

Existiu grande variação dos resultados dos parâmetros microbiológicos avaliados para as amostras de leite e queijo analisadas, independentemente do isolamento em ágar MRS ou ágar M17. O ágar MRS demonstrou maior seletividade quanto ao isolamento de BAL.

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* foram os principais microrganismos isolados das amostras de leite, soro-fermento e queijo, além de *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e outras espécies de *Lactobacillus*. Sugere-se que estas espécies estejam bem adaptadas ao ambiente de produção do queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra, contribuindo, talvez, para o desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto.

Lactobacillus hilgardii e *Lactobacillus paraplantarum* foram isolados de amostras de queijo, o que constitui a primeira descrição desses microrganismos em queijos no Brasil.

As amostras de leite provenientes de queijarias cadastradas apresentaram teores percentuais de gordura e EST mais elevados que as queijarias não cadastradas, o que interfere positivamente no rendimento do queijo. Sugere-se que o queijo Minas artesanal produzido em queijarias cadastradas, na região da Serra da Canastra, apresente melhor rendimento que aquele produzido em queijarias não cadastradas.

O queijo Minas artesanal da Serra da Canastra apresenta grande variação nos resultados de parâmetros físico-químicos, o que pode ser explicado, em parte, pela falta de padronização do processo de produção do queijo nas diferentes queijarias.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a importância de novas pesquisas para que se possam definir as características do queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra, identificando os diversos processos de sua produção e como estes influenciam a qualidade e as características físico-químicas e microbiológicas do produto final. Estas pesquisas poderão gerar informações que possibilitarão ações visando à manutenção dos produtores em sua atividade secular sem, no entanto, descaracterizar o produto. Além disso, pode ser considerado um primeiro passo para se estabelecer as ações que levem a uma denominação de origem protegida para esses produtos e o conhecimento dos agentes responsáveis pelas características diferenciais desses queijos.

Estudos futuros são necessários para se estabelecer uma caracterização genotípica dos microrganismos isolados dos queijos artesanais produzidos na região da Serra da Canastra a fim de possibilitar rastreamento genético dos mesmos para se obter, seguramente, a denominação de origem, levando-se em consideração a altitude e o nível de cadastramento das queijarias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTO, M.R.; GÓMEZ-COROVÉS, C., NADRA, M.C.M. Metabolism of gallic acid and catechin by *Lactobacillus hilgardii* from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 21, p. 6465-6469, 2004.

ALMEIDA, E.F.L.; SOARES, M.O.O. Queijo artesanal: alternativa de Minas Gerais para a pecuária familiar. In: ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO LEITEIRO F1: AVANÇOS TECNOLÓGICOS. 6., 2008, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: PUC MINAS, 2008. p.215-225.

- ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; FLÓREZ, A.B.; HERNÁNDEZ-BARRANCO, A. *et al.* Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, v. 19, n. 1, p. 62-70, 2008.
- ANDREATTA, E.; FERNANDES, M.F.; SANTOS, M.V. *et al.* Quality of Minas frescal cheese prepared from milk with different somatic cell counts. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 3, p. 320-326, 2009.
- ARAÚJO, R.A.B.M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá*. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. *et al.* Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p. 440-446, 2006.
- ASCOM. Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural. 2008. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>> Acessado em 25 de janeiro de 2010.
- BALLESTEROS, C., POVEDA, J.M.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A. *et al.* Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, v. 17, n. 4, p. 249-255, 2006.
- BARUZZI, F.; MOREA, M.; MATARANTE, A. *et al.* Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, n. 5, p. 807-814, 2000.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 2002. 49p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bentley 2000 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 1998. 79p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Somacount 300 Operator's Manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc.; 1997. 116p.
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, v.11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- 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*. 2006. 120f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BORELLI, B.M. *Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra - MG*. 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRANT, L.M.F. *Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas artesanal do Serro – MG*. 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos*. Brasília: Agência Nacional de

Vigilância Sanitária, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rdc.html>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamento técnico geral para fixação de requisitos microbiológicos de queijos*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000. Critérios de funcionamento e 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/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

BROWN, C. *Fabricação de queijos:*

indústria da caseína. [s.l.: s.n.], [193-].

BULUT, C.; GUNES, H.; OKUKLU, B. *et al.* Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n. 1, p. 19-24, 2005.

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M. *et al.* Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, v. 18, n. 1, p. 11-17, 2007.

CAMARGO, I.L.B.C. *Estudo dos fatores de virulência em Enterococcus sp. isolados no Brasil*. 2005. 153f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, J.D.G.; BRUNO, L.M.; NASSU, R.T. *et al.* Bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 22., 2005, Juiz de Fora, MG. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2005. CD ROM.

COGAN, T.M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E. *et al.* Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, v. 64, n. 4, p. 409-421, 1997.

COPPOLA, S.; FUSCO, V.; ANDOLFI, R. *et al.* Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata

- cheese of the Naples area. *Journal of Dairy Research*, v. 73, n. 3, p. 264-272, 2006.
- DI CAGNO, R.; QUINTO, M.; CORSETTIC, A. *et al.* Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 2, p. 119-130, 2006.
- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G. *et al.* Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, v. 25, n. 2, p. 392-399, 2008.
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER-MG). *Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal*. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2004. 19p.
- ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 4, p. 708-712, 2007.
- ESCALANTE, A.; RODRÍGUEZ, M.E.; MARTÍNEZ, A. *et al.* Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 235, n. 2, p. 273-279, 2004.
- ESTATÍSTICAS DO LEITE. 2008. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.
- FARNWORTH, E.R. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, v. 2, n.1, p. 1-17, 2005.
- FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23 (Supl), p. 162-165, 2003.
- FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 2. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1993. 601p.
- FURTADO, M.M. *A arte e a ciência do queijo*. 2ª Ed. São Paulo: Editora Globo, 1991. 297p.
- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.
- GARABAL, J.I. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2007.
- GARVIE, E.I. Genus *Leuconostoc*. In: SENAETH, P.H.A; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986. 1234 p.

GERASI, E.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *International Journal of Dairy Technology*, v. 56, n. 2, p. 117-122, 2003.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V.(Eds.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 235-254.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GUEDES NETO, L.G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp. e de bactérias ácido-lácticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, n. 73 (Supl), p. 365S-373S, 2001.

IDE, L.P.A.; BENEDET, H.D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciência Agrotécnica*, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Região do Campo das Vertentes é reconhecida como produtora de Queijo Minas Artesanal. 2009. Disponível

em:<<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acessado em: 25 de janeiro de 2010.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products: Enumeration of coliforms – colony count technique and most probable number technique at 30°C. *IDF Standard 73A*. Brussels: IDF, 1974. 8p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Brussels: IDF, 1995. 8p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation mid-infrared instruments. *IDF Standard 141C*. Brussels: IDF, 2000. 8p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. *IDF Standard 117A*. Brussels: IDF, 1988. 4p.

JAY, J.M.; LOESSNER M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 790p.

KONGO, J.M.; HO, A.J.; MALCATA, F.X. *et al.* Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 5, p. 1838-1844, 2007.

KOSIKOWSKY, F. *Cheese and fermented milk foods*. New York: Cornell University, 1970. 429p.

KUPIEC, B.; REVELL, B. Speciality and artisanal cheeses today: the product and the consumer. *British Food Journal*, v. 100, n. 5, p. 236-243, 1998.

KWON, H.; YANG, E.; YEON, S. *et al.*

- Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n. 2, p. 267-275, 2004.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; L.S. CARMO, L.S. *et al.* Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LEITE, M.O. *Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado*. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P *et al.* 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.
- MAC FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: Willians & Wilkins, 2nd Ed., 1980. 527p.
- MACHADO, E.C. *Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais*. 2002. 49f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p. 1883-1886, 2000.
- MANNU, L.; COMUNIAN, R.; SCINTU, M.F. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 10, n. 5-6, p.383-389, 2000.
- MANOLOPOULOU, E; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E. *et al.* Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.
- MAS, M.; TABLA, R.; MORICHE, J. *et al.* Ibores goat's milk cheese: microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait*, v. 82, n. 5, p. 579-587, 2002.
- MAZZOLI, R.; LAMBERTI, C.; COISSON, J.C. *et al.* Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine. *Amino Acids*, v. 36, n. 1, p. 81-89, 2009.
- MENESES, J.N.C. Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. Dossiê interpretativo. Volume I. 2006. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br>> Acessado em 25 de janeiro de 2010.
- MENEZES, L.D.M.; PENA, E.C.; SOUZA, V.F. *et al.* Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. CD ROM.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. *Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o regulamento da Lei nº 14.185, de 31/01/2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal.* Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002a. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

MINAS GERAIS. Assembléia 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: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

MINAS GERAIS. Assembléia 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: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria 1.022 de 03 de novembro de 2009. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes.* Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2009. Disponível em: <<http://www.ima.mg.gov.br/>>. Acessado em: 25 de janeiro de 2010.

MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F. *et al.* Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology*, v. 5, n. 15, 2005. Disponível em:

<<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/15>>. Acessado em 25 de janeiro de 2010.

NASSU, R.T.; ANDRADE, A.A.; SILVA, A.C. *et al.* Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. 23., 2006, Juiz de Fora, MG. *Anais...* Juiz de Fora: CT/ILCT – EPAMIG, 2006. CD ROM.

NETTO, O.V.C.; ROSA, D.D.; CAMARGO, L.E.A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Scientia Agricola*, v. 65, n. 5, p. 508-515, 2008.

NIKOLIC, M.; TERZIC-VIDOJEVIC, A.; JOVCIC, B. *et al.* Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 122, n. 1-2, p. 162-170, 2008.

NÓBREGA, J.E. *Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras.* 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OLIVEIRA, J.P.; HOLENWERGER, J.C.; SILVA, M.H. *et al.* Determinação de coliformes a 30°C, fungos filamentosos e leveduras em queijo coalho comercializado nas praias da cidade de Salvador – Bahia. *Higiene Alimentar*, v. 21, n. 150, p. 129-130, 2007.

ORNELAS, E. A. *Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra.* 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, v. 251, n. 2, p. 267-271, 2005.
- PEREIRA, D.B.C.; MACHADO, G.M.; PORTO, M.A.C. *et al.* Queijo Minas artesanal: acompanhamento de características físico-químicas do queijo produzido na região do Serro. *Informe Agropecuário*, v. 28, n. 238, p. 64-66, 2007.
- PEREIRA, M.L. GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F. *et al.* Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999.
- PEREIRA, K.C.; SÁ, O.R.; PEREIRA, K.C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do queijo Canastra e de sua matéria-prima produzidos na região de São Roque de Minas (MG). *Scientiae et Praxis*, v. 1, n. 2, p. 21-26, 2008.
- PESSOA, G.V.A.; SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e Lisina – motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 32, p. 97-100, 1972.
- POTES, M.E.; MARINHO, A.A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 102, n. 561-562, p. 145-151, 2007.
- PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 575-582, 2003.
- RANDAZZO, C.L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2009.
- RIBEIRO, J.A. Queijos do Brasil. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 14, n. 86, p. 33-34, 1959.
- RIBEIRO, P.L.B.; MELO, L.V.; SISDELLI, A.F.F. *et al.* Avaliação físico-química de queijos Minas artesanais comercializados no município de Uberaba, MG. In: XVI ENCONTRO NACIONAL E II CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. CD ROM.
- RIVAS, C.A.; RUEDA, Z.C.; ROJAS, J.O. *et al.* Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica, FCV-LUZ*, v. 12, n. 3, p. 301-308, 2007.
- RODRÍGUEZ, M.M.L.; TORNADIJO, M.E.; CABALLO, J. *et al.* Microbiological study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 9, p. 998-1006, 1995.
- ROSSI, E.M.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B. *et al.* Contagem de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais comercializados em feiras livres de São Miguel do Oeste – SC. *Higiene Alimentar*, v. 21, n. 150, p. 126-127, 2007.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.

- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ A.C.C. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 6, p.1517-1522, 2008.
- SANTOS, A.K.R. *Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de Staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas*. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SENA, M.J. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE*. 2000. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ŞENGÜL, M. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, n. 6, p. 613-618, 2006.
- SETTANNI, L.; VAN SINDEREN, D.; ROSSI, J. *et al.* Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough *Lactobacillus* species by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3049-3059, 2005.
- SILVA, J.G. *Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra*. 2007. 198f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.
- SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 358, p. 36-48, 2000.
- TANNOCK, G.W.; TISSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. *et al.* Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.
- TAVARIA, F.K.; MALCATA, F.X. On the microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 293-304, 2000.
- TERZIC-VIDOJEVIC, A.; TOLINACKI, M.; NIKOLIC, M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n.11, p. 2576-2588, 2009.
- TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rDNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of*

Food Microbiology, v. 35, n. 1, p. 49-56, 1997.

TORRES-LLANEZ, M.J.; VALLEJO-CORDOBA, B.; DÍAZ-CINCO, M.E. *et al.* Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, v. 17, n. 9, p. 683-690, 2006.

TORRIANI, S.; FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 8, p. 3450-3454, 2001.

VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Esterase activities of cell-free extracts from 'wild' strains of leuconostocs and heterofermentative lactobacilli isolated from traditional Greek cheese. *Letters in Applied Microbiology*, v. 23, n. 6, p. 367-370, 1996.

VARGAS, O.L.; PORTO, M.A.; BRITO, A.L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: municípios do Serro e São Roque de Minas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 53, n. 301-302-303, p. 19-49, 1998.

VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados*. 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

Anexo 1: Percentual de microrganismos isolados de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (MG) que apresentaram crescimento nas condições de cultivo do teste respiratório

Amostra	Teste respiratório													
	Aerobiose						Microaerofilia						Anaerobiose	
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+	++	+++
Leite (n=18)	11	9	13	29	10	13	6	33	16	18	5	23		
MRS	7 (63,63%)	3 (33,33%)	2 (15,38%)	7 (24,13%)	6 (60%)	3 (23,07%)	1 (16,67%)	9 (27,27%)	6 (37,50%)	4 (22,22%)	0 (0%)	9 (39,13%)		
M17	4 (36,37%)	6 (66,67%)	11 (84,62%)	21 (75,87%)	4 (40%)	10 (76,83%)	5 (83,33%)	24 (72,73%)	10 (62,50%)	14 (77,78%)	5 (100%)	14 (60,87%)		
Soro-fermento (n=18)	43	22	20	76	11	26	29	98	10	18	28	111		
MRS	15 (34,88%)	8 (36,36%)	5 (25%)	31 (40,79%)	5 (45,45%)	9 (34,61%)	9 (31,03%)	36 (36,73%)	4 (40%)	5 (27,77%)	7 (25%)	44 (39,63%)		
M17	28 (65,12%)	14 (63,63%)	15 (75%)	45 (59,21%)	6 (54,55%)	17 (65,39%)	20 (68,97%)	62 (63,27%)	6 (60%)	13 (72,23%)	21 (75%)	67 (60,37%)		
Queijo (n=18)	2	11	37	110	1	0	21	136	0	3	26	129		
MRS	0 (0%)	3 (27,27%)	10 (27,03%)	53 (48,18%)	1 (100%)	0 (0%)	9 (42,86%)	56 (41,17%)	0 (0%)	1 (33,33%)	5 (19,23%)	60 (46,51%)		
M17	2 (100%)	8 (72,73%)	27 (72,97%)	57 (51,82%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (57,14%)	80 (58,83%)	0 (0%)	2 (66,67%)	21 (80,77%)	69 (53,49%)		

Anexo 2: Amplificação da região intergênica 16S-23S por PCR

Os resultados destas PCR's são apresentados nas figuras 1 e 2. Pela observação das fotos dos géis de agarose 1,4%, submetidos a 100V por 50 minutos, pode-se verificar a presença de diferentes espécies de microrganismos, evidenciado por diferentes perfis de amplificação (número de bandas amplificadas e pesos moleculares distintos).

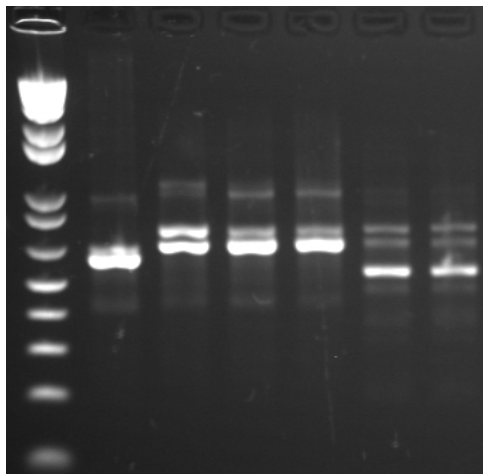


Figura 1: PCR 16S-23S de DNA de algumas amostras de microrganismos fermentadores de lactose, isolados de queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra, em ágar MRS (canaletas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - amplificação de 1 banda; 3 - amplificação de 2 bandas; 4 - amplificação de 2 bandas; 5 - amplificação de 2 bandas; 6 - amplificação de 3 bandas; 7 - amplificação de 3 bandas)

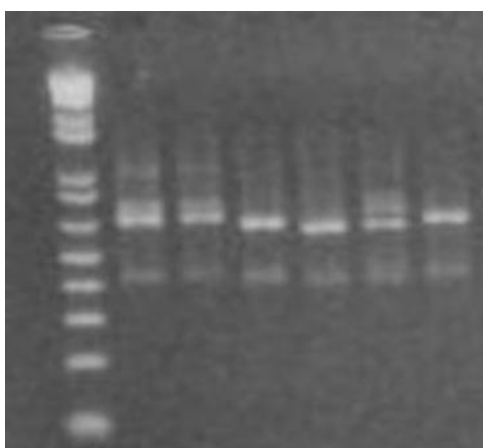


Figura 2: PCR 16S-23S de DNA de algumas amostras de microrganismos fermentadores de lactose, isolados de queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra, em ágar M17 (canaletas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - amplificação de 2 bandas; 3 - amplificação de 2 bandas; 4 - amplificação de 1 banda; 5 - amplificação de 1 banda; 6 - amplificação de 2 bandas; 7 - amplificação de 1 banda)

Anexo 3: Perfil de restrição enzimática dos fragmentos amplificados por PCR do espaçador 16S-23S rDNA de diferentes espécies de BAL isoladas de amostras de leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal da Serra da Canastra (MG)

Espécies	Enzimas											
	<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>
<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>L. rhamnosus</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>L. plantarum/L. paraplantarum</i> *	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>L. hilgardii</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>W. paramesenteroides</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

* espécies diferenciadas por PCR *multiplex* (Torriani *et al.*, 2001)

Anexo 4: Restrição enzimática dos produtos de PCR

As figuras 3, 4, 5, 6 e 7 ilustram alguns dos resultados das digestões enzimáticas. A partir da observação das mesmas, podem-se identificar alguns microrganismos isolados ao nível de espécie, quando os perfis de digestão são comparados aos padrões.

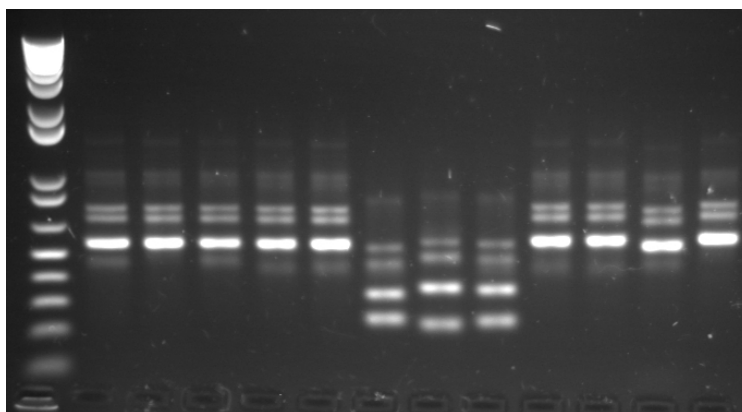


Figura 3: Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como *Lactobacillus casei* (canaletas/enzimas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - *SphI*; 3 - *NcoI*; 4 - *NheI*; 5 - *SspI*; 6 - *SfuI*; 7 - *EcoRV*; 8 - *DraI*; 9 - *VspI*; 10 - *EcoRI*; 11 - *HindIII*; 12 - *AvrII*)

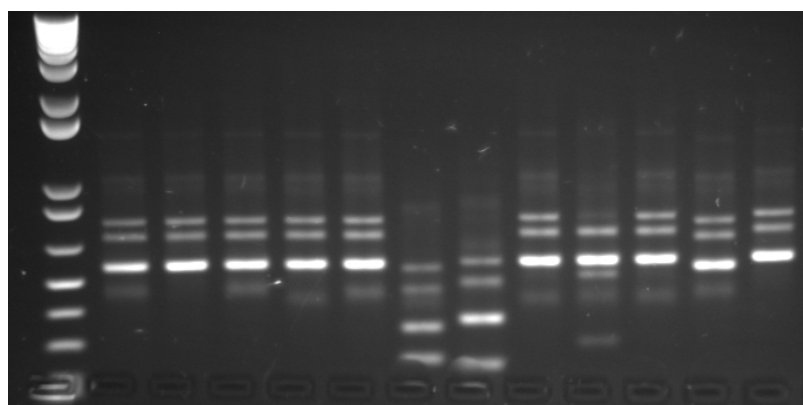


Figura 4: Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como *Lactobacillus rhamnosus* (canaletas/enzimas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - *SphI*; 3 - *NcoI*; 4 - *NheI*; 5 - *SspI*; 6 - *SfuI*; 7 - *EcoRV*; 8 - *DraI*; 9 - *VspI*; 10 - *EcoRI*; 11 - *HindIII*; 12 - *AvrII*)

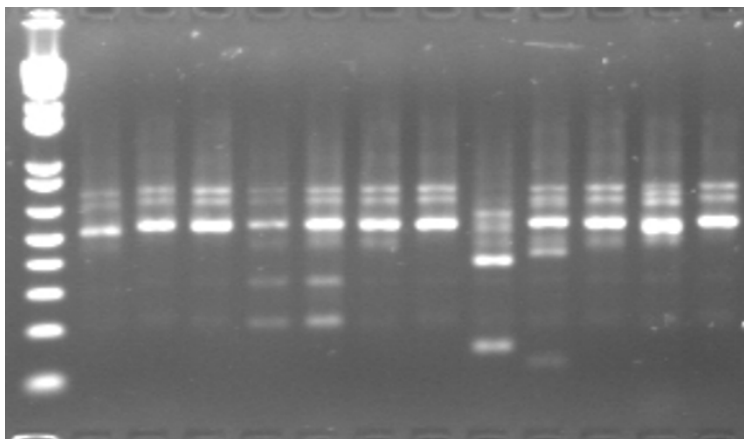


Figura 5: Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como *Lactobacillus hilgardii* (canaletas/enzimas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - *SphI*; 3 - *NcoI*; 4 - *NheI*; 5 - *SspI*; 6 - *SfuI*; 7 - *EcoRV*; 8 - *DraI*; 9 - *VspI*; 10 - *EcoRI*; 11 - *HindIII*; 12 - *AvrII*)

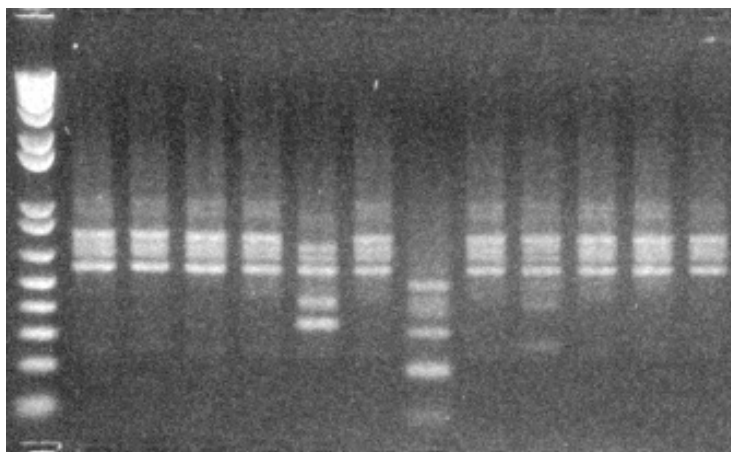


Figura 6: Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como *Weissella paramesenteroides* (canaletas/enzimas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - *SphI*; 3 - *NcoI*; 4 - *NheI*; 5 - *SspI*; 6 - *SfuI*; 7 - *EcoRV*; 8 - *DraI*; 9 - *VspI*; 10 - *EcoRI*; 11 - *HindIII*; 12 - *AvrII*)

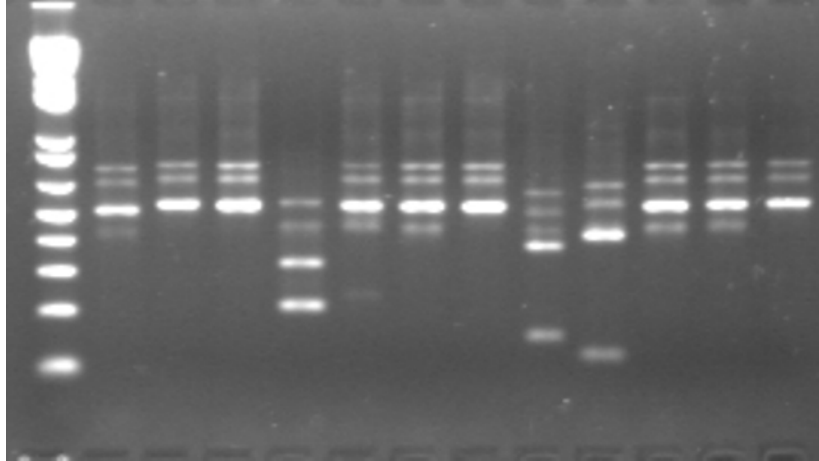


Figura 7: Restrição enzimática de produtos de PCR 16S-23S de cultura identificada como *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum* (canaletas/enzimas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2 - *Sph*I; 3 - *Nco*I; 4 - *Nhe*I; 5 - *Ssp*I; 6 - *Sfu*I; 7 - *EcoRV*; 8 - *Dra*I; 9 - *Vsp*I; 10 - *EcoRI*; 11 - *HindIII*; 12 - *AvrII*)

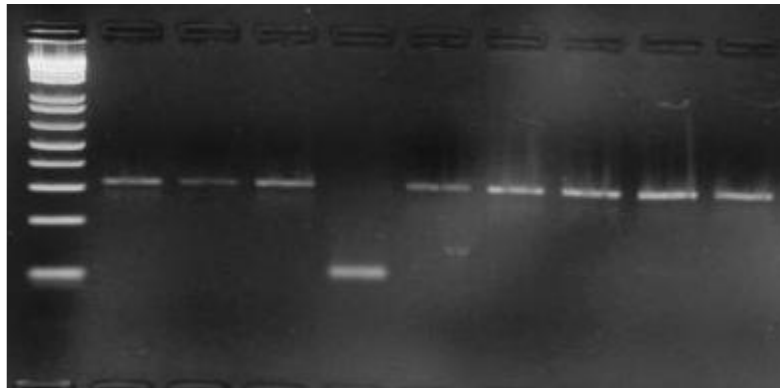


Figura 8: Produtos da amplificação da região do gene *recA* a partir da técnica de PCR *multiplex* de algumas amostras de culturas identificadas como *Lactobacillus plantarum*/*Lactobacillus paraplantarum* (canaletas da esquerda para a direita: 1 - marcador de peso molecular; 2, 3 e 4 - *Lactobacillus plantarum*; 5 - *Lactobacillus paraplantarum*; 6, 7, 8, 9 e 10 - *Lactobacillus plantarum*)

Anexo 5: Contagem das populações de bactérias ácido-láticas (UFC/g) isoladas de 18 amostras de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra (MG) em ágar MRS

Amostra	<i>L. casei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	BAL
1	2,3x10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-
2	-	5,1x10 ⁷	6,4x10 ⁷	-	1,5x10 ⁷	-	-	1,0x10 ⁸
3	4,7x10 ⁵	-	3,2x10 ⁷	-	-	-	-	-
4	>3,0x10 ⁶	-	1,1x10 ⁷	-	-	-	2,4x10 ⁸	-
5	1,0x10 ⁶	>3,0x10 ⁶	-	-	-	-	-	-
6	-	1,1x10 ⁷	-	-	-	-	2,7x10 ⁷	4,6x10 ⁷
7	4,6x10 ⁵	1,0x10 ⁵	9,0x10 ⁴	-	-	-	-	-
8	-	1,6x10 ⁵	-	-	-	-	-	-
9	-	3,1x10 ⁶	-	-	-	-	1,0x10 ⁶	-
10	2,8x10 ⁵	1,0x10 ⁵	8,0x10 ⁴	-	-	-	-	-
11	1,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴	-	-	6,1x10 ⁵	-	-	-
12	-	3,0x10 ⁶	4,0x10 ⁷	-	-	-	-	-
13	2,0x10 ⁶	-	9,0x10 ⁶	5,0x10 ⁶	-	-	-	-
14	-	1,7x10 ⁷	-	-	-	-	4,5x10 ⁵	-
15	3,0x10 ⁶	-	-	-	1,9x10 ⁶	-	-	-
16	5,8x10 ⁶	-	-	-	-	-	2,0x10 ⁴	-
17	1,0x10 ⁵	-	4,0x10 ⁴	-	-	-	1,1x10 ⁶	-
18	2,1x10 ⁵	5,3x10 ⁵	-	-	-	1,0x10 ⁴	4,5x10 ⁵	-

Anexo 6: Contagem das populações de bactérias ácido-láticas (UFC/g) isoladas de 18 amostras de queijo Minas artesanal da região da Serra da Canastra (MG) em ágar M17

Amostra	<i>L. casei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	BAL
1	-	-	2,0x10 ⁷	1,3x10 ⁸	2,0x10 ⁴
2	-	-	1,1x10 ⁸	2,7x10 ⁷	-
3	-	-	9,0x10 ⁶	1,4x10 ⁸	2,0x10 ⁶
4	-	-	>3,0x10 ⁸	1,2x10 ⁹	-
5	-	-	1,5x10 ⁷	1,5x10 ⁸	-
6	-	-	8,1x10 ⁷	1,4x10 ⁸	-
7	-	-	1,5x10 ⁵	1,0x10 ⁶	-
8	-	-	3,0x10 ⁴	>3,0x10 ⁶	-
9	-	-	>3,0x10 ⁶	4,0x10 ⁶	1,2x10 ⁸
10	-	-	7,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶	-
11	-	-	4,0x10 ⁶	2,6x10 ⁷	-
12	-	-	4,0x10 ⁶	3,0x10 ⁸	1,2x10 ⁷
13	1,0x10 ⁸	1,5x10 ⁶	5,0x10 ⁶	6,2x10 ⁷	-
14	-	-	2,6x10 ⁵	2,1x10 ⁷	4,0x10 ⁶
15	-	-	-	4,0x10 ⁷	-
16	-	-	-	2,2x10 ⁶	-
17	-	-	-	7,4x10 ⁶	-
18	-	-	>3,0x10 ⁶	-	-

