



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FELIPE NAEL SEIXAS

**IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
TECNOLÓGICA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA
AUTÓCTONE DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO
CATARINENSE E SEU POTENCIAL ANTAGONISTA A
PATÓGENOS**

Londrina
2014

FELIPE NAEL SEIXAS

**IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
TECNOLÓGICA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA
AUTÓCTONE DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO
CATARINENSE E SEU POTENCIAL ANTAGONISTA A
PATÓGENOS**

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S462i	<p>Seixas, Felipe Nael. Identificação filogenética e caracterização tecnológica da microbiota ácido láctica autóctone do queijo artesanal serrano catarinense e seu potencial antagonista a patógenos / Felipe Nael Seixas. – Londrina, 2014. 137 f. : il.</p> <p>Orientador: Vanerli Beloti. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Laticínios – Microbiologia – Teses. 2. Queijo artesanal – Teses. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 4. Sequência de nucleotídeos – Teses. 5. Segurança alimentar – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 579:637.1</p>
-------	---

FELIPE NAEL SEIXAS

**IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO
TECNOLÓGICA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA
AUTÓCTONE DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO
CATARINENSE E SEU POTENCIAL ANTAGONISTA A
PATÓGENOS**

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária e Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Professor Dr^a. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Professor Dr. André Luiz M. Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Professora Dr^a. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Professora Dr^a. Tereza Cristina Rocha M. de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Professor Dr. Luís Augusto Nero
Universidade Federal de Viçosa – UFV

Londrina, 27 de março de 2014.

Dedico este trabalho a Deus, a minha família e a meus amigos, todos especiais em minha vida!!!

AGRADECIMENTOS

A minha família que sempre esteve ao meu lado apoiando e torcendo por mim, e são o meu porto seguro.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti, que um dia me recebeu em seu laboratório, confiou em mim e orientou. Obrigado por me deixar fazer parte da família LIPOA.

Ao Prof. Dr. André Luiz Martinez Oliveira, por me receber em seu laboratório e em seu grupo. Obrigado pela orientação e conselhos.

A Prof^a. Dr^a. Justa Maria Poveda Colado, que me recebeu e deu total atenção, por sua disponibilidade, seus conhecimentos e por sua família tão querida.

A três pessoas muito especiais durante minha vida em Londrina, que me fizeram e fazem rir, Rafael Fagnani, Juliana R. Pereira e Edson A. Rios pela companhia, amizade e pelo esforço dedicado ao meu projeto.

A família LIPOA, Ronaldo Tamanini, Ana Paula P. Bataglini, Alberto Yamada, Livia Cavaletti, José Carlos Ribeiro, Franciele Abreu, Nayara Antonio, João Paulo A. Araújo, Juliana Mareze, Natalia Gonzaga, Eric, Lorena, Nayara, Fábio e a todos os estagiários que passaram pelo laboratório.

Aos loucos que um dia escolheram trabalhar com biologia molecular Karita, Daniela, Odair e Karina, foi sofrido mais foi bom, rimos muito e ainda a Silvia da bioquímica que nos acalmava, cantava e absorvia nossos problemas.

Aos amigos de Londrina Michele, Eidi, Cristiane (lepto), Fernanda (zoonoses), Liza, Letizia e Daniel por fazerem meus momentos mais alegres nas aulas e na vida.

A turma da virologia Brigida (bucha), Ana Paula, Victor, Wagner, Elis, Edsel e as Julianas pelos momentos divertidos, bem como, agradecer ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina pelas análises de sequenciamento do DNA das bactérias estudadas neste trabalho.

A Maria del Mar, Lucia, Fernando, Gustavo, Sheila, Mônica, Edmund, Patricia por terem dividido momentos prazerosos em Ciudad Real comigo.

As pessoas especiais que sempre emprestaram os ouvidos para ouvir as minhas reclamações, Francine, Mirian, Eloá, Érika e Tânia.

Ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela atenção e apoio financeiro ao projeto.

Ao Prof. Dr. Luís Augusto Nero, do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal de Viçosa, pelas cepas de bactérias (ATCC) utilizadas neste trabalho e pelo auxílio nas provas de antagonismo.

Aos professores Dr. André Luiz Martinez Oliveira, Dr^a. Tereza Cristina Rocha M. de Oliveira, Dr^a. Alice Fernandez Alfieri, pelas sugestões e melhorias em minha Tese.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal pelos conhecimentos repassados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro do projeto, que permitiu a conclusão deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche que permitiu desenvolver parte deste trabalho na Universidade de Castilla-La Mancha.

A Londrina, cidade que me encantou e que me recebeu muito bem, te adoro.

A todos o meu muito obrigado!!!!

SEIXAS, Felipe Nael. **Identificação filogenética e caracterização tecnológica da microbiota ácido láctica autóctone do queijo artesanal serrano catarinense e seu potencial antagonista a patógenos**. 2014. 137 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Os queijos artesanais vêm sendo produzidos há séculos no Brasil. Cada região do país produz queijos com características sensoriais próprias e distintas entre si. A fabricação informal do queijo artesanal no município de Lages, no estado de Santa Catarina, é uma prática muito antiga e de grande aceitação em diferentes camadas da sociedade. O queijo artesanal serrano, assim como outros queijos artesanais, utiliza leite cru integral como matéria prima. O objetivo deste trabalho foi identificar no queijo artesanal serrano a microbiota patogênica e láctica, caracterizar a diversidade genética dessa microbiota láctica, avaliar o seu potencial antagonista frente a patógenos, assim como suas características tecnológicas para integrar um fermento láctico. Foram estudadas 20 amostras de queijos adquiridas em diferentes pontos comerciais da cidade de Lages/SC. Em relação à ocorrência de bactérias patogênicas nas amostras de queijo Serrano, *Listeria monocytogenes* foi identificada em três amostras de queijo, *Staphylococcus coagulase* positivos em sete amostras e 11 amostras apresentaram-se contagens acima do estabelecido pela legislação para *Escherichia coli*. *Salmonella* spp. não foi isolada em nenhuma das amostras analisadas. Foram obtidos 543 cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) a partir das 20 amostras de queijos artesanais Serrano. As cepas foram agrupadas de acordo com os perfis de polimorfismo de restrição do espaço intergênico 16S-23S (RFLP PCR-ITS). Exemplares destes grupos foram selecionadas para o sequenciamento do gene 16S RNAr, que identificou 268 (49,3%) cepas de *Lactobacillus* spp., 208 (38,3%) de *Lactococcus* spp., 34 (6,3%) de *Leuconostoc* spp. e 33 (6,1%) de *Enterococcus* spp. Das 543 cepas de BAL analisadas, *Lactobacillus* spp. mostrou o maior potencial antagonista a *Listeria monocytogenes*. O *Enterococcus* spp. apresentou antagonismo principalmente contra *Escherichia coli* e *Salmonella* Thyphimurium. O gênero *Leuconostoc* spp. mostrou maior antagonismo para *Staphylococcus aureus*. Em relação às características tecnológicas, 74 cepas de BAL foram selecionadas aleatoriamente, mas contemplando os três gêneros com potencial tecnológico, um total de 12 isolados *Leuconostoc*, 19 *Lactococcus* e 43 *Lactobacillus*. As cepas de *Lactococcus* foram avaliadas para atividade acidificante, proteolítica, autolítica, aminopeptidásica, produção de amins biogênicas, resistência ao NaCl e a temperatura. As cepas de *Leuconostoc* foram avaliadas para atividade acidificante, proteolítica, autolítica, aminopeptidásica, lipolítica, produção de amins biogênicas, produção de dextrano, resistência ao NaCl e acidez. As cepas de *Lactobacillus* foram avaliadas para atividade acidificante, proteolítica, autolítica, lipolítica, aminopeptidásica, produção de amins biogênicas. Das 19 cepas de *Lactococcus*, 4 *Lactococcus* se destacaram nas atividades acidificante (Δ pH 2,31 a 2,41U), proteolítica (0,6 a 0,79 mmol Gly), autolítica (11,69 a 16,64%) e aminopeptidásica. Cinco isolados de *Lactococcus*, no entanto, produziram amins biogênicas (histamina) não sendo indicadas para integrarem um fermento láctico. Das 12 cepas de *Leuconostoc* selecionados da coleção de BAL, seis apresentaram resultados importantes para as atividades acidificante (Δ pH 0,73 a 1,12 U),

proteolítica (0,28 a 0,32 mmol Gly), autolítica (8,95 a 11,81%), aminopeptidásica (Leu 0,02 a 0,12 U), produção de dextrano e nenhuma cepa produziu aminas biogênicas. Das 43 cepas de *Lactobacillus* avaliadas, duas apresentaram melhores resultados para as atividades acidificante (Δ pH 1,53 e 1,68 U) e aminopeptidásica (Leu 0,45 e 0,47 U). Seis amostras produziram aminas biogênicas e não poderiam ser empregadas na formulação de fermentos. Os resultados obtidos permitiram conhecer os principais representantes da microbiota ácido láctica associada ao queijo artesanal serrano, composta principalmente pelos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Dentre as cepas de BAL obtidas, as cepas *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* apresentaram maior potencial antagônico contra bactérias patogênicas. Doze cepas (quatro *Lactococcus*, seis *Leuconostoc* e dois *Lactobacillus*) apresentaram potencial para o desenvolvimento de um fermento láctico para a utilização na produção controlada de queijo Serrano, como inóculos puros ou mistos. Além disso, as amostras de queijo analisadas não atenderam as determinações sanitárias da legislação brasileira, indicando risco potencial de agravo à saúde pelo consumo deste produto pela população.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. *Lactococcus*. *Leuconostoc*. *Enterococcus*.
Diversidade bacteriana. Segurança alimentar. Sequenciamento genético. Potencial tecnológico.

SEIXAS, Felipe Nael. **Phylogenetic identification and technological characterization of the autochthonous lactic acid microbiota of the artisanal Serrano Catarinense cheese and its antagonistic potential to pathogens.** 2014. 137 p. Dissertation (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Artisanal cheeses have been produced for centuries in Brazil. Each region in the country produces cheeses with their own sensorial and distinct characteristics. The informal manufacturing of the artisanal cheese in the city of Lages, in the state of Santa Catarina, is a very old practice and has great acceptance among different layers of society. The artisanal Serrano cheese, just like other artisanal cheeses, makes use of raw whole milk as raw material. The aim of this work was to identify the pathogenic lactic microbiota in the artisanal Serrano cheese, to characterize genetically the diversity of the aforementioned lactic microbiota, to evaluate its antagonistic potential to pathogens, as well as its technological characteristics to integrate a lactic starter culture.. Regarding the occurrence of pathogenic bacteria in the samples of Serrano cheese, *Listeria monocytogenes* was identified in three samples of the cheese, *Staphylococcus* positive coagulase in seven samples and 11 samples presented counts above the established by the legislation for the *Escherichia coli*. *Salmonella* spp. was not isolated in any of the samples analyzed. 543 strains of lactic acid bacteria (LAB) were obtained from the study of 20 samples of artisanal Serrano cheeses acquired at different points of sale city of Lages / SC. The strains were gathered according to the profiles of restriction fragmente intergenic polymorfim 16S-23S (RFLP PCR-ITS). Samples of these groups were selected for the sequencing of the 16S RNAr gene, which identified 268 (49,3%) strains of *Lactobacillus*, 208 (38,3%) of *Lactococcus*, 34 (6,3%) of *Leuconostoc* and 33 (6,1%) of *Enterococcus*. From the 543 strains of LAB analyzed, *Lactobacillus* spp. presented the greatest antagonistic potential to the *Listeria monocytogenes*. The *Enterococcus* spp. presented antagonism mainly against *Escherichia coli* and *Salmonella* Thyphimurium. The *Leuconostoc* genus presented greater antagonism to *Staphylococcus aureus*. Regarding the technological characteristics, 74 strains of LAB were selected randomly, but contemplating the three genera with technological potential, a total of 12 isolate *Leuconostoc*, 19 *Lactococcus* and 43 *Lactobacillus*. The strains of *Lactococcus* were evaluated for the acidifying, proteolytic, autolytic and aminopeptidase activities, production of biogenic amines, resistance to the NaCl and the temperature. The strains of *Leuconostoc* were evaluated for the acidifying, proteolytic, autolytic, aminopeptidase and lipolytic activities, production of biogenic amines, production of dextran, resistance to the NaCl and acidity. The strains of *Lactobacillus* were evaluated for the acidifying, proteolytic, autolytic, aminopeptidase and lipolytic activities, production of biogenic amines. Form the 19 strains of *Lactococcus*, 4 *Lactococcus* outstood in the acidifying (Δ pH 2,31 to 2,41U), proteolytic (0,6 to 0,79 mmolGly), autolytic (11,69 to 16,64%) and aminopeptidase activities. Five isolates of *Lactococcus*, however, produced biogenic amines (histamine), therefore not being recommended to integrate a lactic starter culture. From the 12 selected strains of *Leuconostoc* from the LAB collection, six presented important results for the acidifying (Δ pH 0,73 to 1,12 U), proteolytic (0,28 to 0,32

mmolGly), autolytic (8,95 to 11,81%), aminopeptidase (Leu 0,02 to 0,12 U) activities, production of dextran and no strain produced biogenic amines. From the 43 strains of *Lactobacillus* evaluated, two presented better results for the acidifying (Δ pH 1,53 and 1,68 U) and aminopeptidase (Leu 0,45 and 0,47 U) activities. Six samples produced biogenic amines and could not be used in the production of starter culture. The results obtained allowed to get to know the main representatives of the lactic acid microbiota associated with the artisanal Serrano cheese, composed mainly by the *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Enterococcus* genera. Among the strains of LAB obtained, the *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Leuconostoc* strains presented greater antagonistic potential against pathogenic bacteria. Twelve strains (four *Lactococcus*, six *Leuconostoc* and two *Lactobacillus*) showed to have potential for the development of a lactic starter culture to be used in the controlled production of Serrano cheese, applied as pure or mixed inoculums. Furthermore, the samples of cheese analyzed did not heed to the sanitary determinations of the Brazilian legislature, indicating potential risk of damage to the population's health through the consumption of this product.

Keywords: *Lactobacillu*. *Lactococcus*. *Leuconostoc*. *Enterococcus*. Bacterial diversity. Food safety. Genetic sequencing. Technological potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização do município de Lages na região serrana do Estado de Santa Catarina, local de produção de queijo artesanal Serrano23
- Figura 2** – Distribuição das propriedades produtoras de leite da região serrana catarinense de acordo com a quantidade produzida por dia (litros) e utilizados na produção de queijo artesanal Serrano nas propriedades leiteiras da região serrana catarinense24

ARTIGO 1

- Figura 1a** – Contagem total (Log UFC/g) de Bactérias Ácido Láticas em amostras de queijos artesanal Serrano Catarinense, produzidas no município de Lages/SC60
- Figura 2a** – Perfis de RFLP PCR-ITS obtidos de bactérias ácido láticas isoladas de diferentes amostras de queijo Serrano. Após eletroforese em gel de agarose 2%: (a) *Enterococcus* spp., (b) *Lactococcus* spp, (c) *Lactobacillus* spp., (M) marcador molecular62
- Figura 3a** – Dendograma de similaridade genética das cepas de BAL isoladas do queijo artesanal Serrano, agrupadas por RFLP PCR-ITS63
- Figura 4a** – Distribuição por gênero dos 543 isolados de Bactérias Ácido Láticas isoladas de 20 amostras de queijo artesanal Serrano colhidas em pontos de comércio no município de Lages/SC e identificados por sequenciamento do gene 16S RNAr.....64
- Figura 5a** – Composição da microbiota de BAL em 20 amostras de queijo artesanal Serrano colhidas em pontos de comércio no município de Lages/SC identificadas por sequenciamento do gene 16S RNAr.....64

ARTIGO 2

- Figure 1b** – Lactic acid bacteria antagonismo intensity against pathogenic bacteria as determined by the relative inhibition on growth in spot-on-the-lawn assay78

ARTIGO 3

- Figura 1c** – Actividad aminopeptidásica de *Lactococcus* aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense 91
- Figura 2c** – Crecimiento de *Lactococcus* spp. aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense en diferentes concentraciones de NaCl observado por densidad optica92

ARTIGO 4

- Figura 1d** – Crecimiento de *Leuconostoc* spp. aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense en diferentes concentraciones de NaCl, observado por densidade optica105
- Figura 2d** – Crecimiento de *Leuconostoc* spp. aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense en diferentes valores de pH, observados por densidade optica106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas e que apresentam amplo espectro de atividade contra microorganismos contaminantes	34
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1a – Identificación de las 19 cepas de <i>Lactococcus</i> aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, evaluadas para las caracterizaciones tecnológicas	86
Tabela 2a – actividad acidificante, proteolítica y autolítica de las cepas de <i>Lactococcus</i> aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, observadas con pHmetro y densidad óptica	90

ARTIGO 4

Tabela 1c – Identificación de las 12 cepas de <i>Leuconostoc</i> aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, evaluadas para las caracterizaciones tecnológicas	86
Tabela 2c – Actividad acidificante, proteolítica, autolítica y aminopeptidásica de las cepas de <i>Leuconostoc</i> aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, observadas con pHmetro y densidad óptica	104

ARTIGO 5

Tabela 1d – Valores de médias e desvio padrão (sd) das atividades acidificante, proteolítica e autolítica das cepas de <i>Lactobacillus</i> isoladas de queijo Serrano Catarinense observado com pHmetro e densidade óptica, respectivamente	116
---	-----

Tabela 2c – Médias e Desvio Padrão (sd) da Atividade Aminopeptidásica (a-q) para Leucina e (a-o) para Lisina indicam que valores sem sobrescritos comuns são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e resultados para Aminas Biogênicas e Lipólise por cepas de *Lactobacillus* isoladas de queijo Colonial Serrano Catarinense.....119

ANEXO

Tabela 1d – Contagem total (UFC/g) de Bactérias Ácido Láticas em amostras de queijos artesanal Serrano Catarinense, produzidas no município de Lages/SC	127
Tabela 2d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 19 cepas de <i>Lactococcus</i> avaliadas para as caracterizações tecnológicas.....	127
Tabela 3d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 12 cepas de <i>Leuconostoc</i> avaliadas para as caracterizações tecnológicas.....	128
Tabela 4d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 43 cepas de <i>Lactobacillus</i> avaliadas para as caracterizações tecnológicas.....	128
Tabela 5d – Cepas de BAL (<i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>) com melhores resultados encontrados nas análises realizadas para verificação da capacidade tecnológica	129
Tabela 6d – Micro-organismos isolados do queijo artesanal Serrano, com resultados expresso em positivo ou negativo para <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> e em UFC/g para <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Escherichia coli</i> e BAL (<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> e <i>Enterococcus</i>).....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias ácido lácticas
CTAB	Brometo de hexadecil-trimetil-amônio
CFU/g	Colony-forming units per gram
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HIV	Human immunodeficiency virus
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS	Internal transcribed spacer
LAB	Lactic acid bacteria
Leu-pNA	L-leucina p-nitroanilida
Ley-pNA	L-lisina p-nitroanilida
M	Molar
(mil/L)	mil Litros
mmol Gly/L	milimole glicina/litro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
NSLAB	non-starter lactic acid bactéria (Bactérias ácido lácticas não integrantes do cultivo iniciador)
oPA	o-phthaldialdehído
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PR	Paraná
Q	Queijo
QAS	Queijo Artesanal Serrano
q.s.p	Quantidade suficiente para
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfism
TBE	Tris-EDTA ácido bórico
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
UFC/g	Unidade Formadora de Colônias por grama
v/v	volume/volume
v/p	volume/peso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	LEITE NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS.....	20
1.2	ORIGEM DA COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO	21
1.3	QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA CATARINA	22
1.3.1	Região Serrana Catarinense.....	22
1.3.2	Produção Leiteira Catarinense.....	23
1.3.3	O Queijo Artesanal Serrano (QAS).....	24
1.3.4	Fabricação de Queijo.....	27
1.4	MICROBIOTA PATOGENICA PRESENTE EM QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE CRU	27
1.4.1	<i>Escherichia coli</i>	27
1.4.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
1.4.3	<i>Salmonella sp</i>	29
1.4.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	30
1.5	MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA	31
1.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BAL	36
1.6.1	Sequenciamento de Genes de BAL	37
1.7	CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DAS BAL	38
1.7.1	Atividade Acidificante	38
1.7.2	Atividade Lipolítica	39
1.7.3	Atividade Proteolítica	39
1.7.4	Atividade Autolítica	40
1.7.5	Produção de dextrano.....	40
1.7.6	Resistência ao NaCl	41
1.7.7	Resistência a pH Baixo	41
1.7.8	Aminas Biogênicas	41
1.8	REFERÊNCIAS	42
2	OBJETIVOS	53
2.1	OBJETIVO GERAL	53
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	53

3	ARTIGO 1: PERFIL MOLECULAR DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA AUTÓCTONE ISOLADA DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE, BRASIL	54
3.1	RESUMO.....	54
3.2	INTRODUÇÃO.....	54
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.3.1	Preparação das Amostras.....	56
3.3.2	Extração de DNA.....	56
3.3.3	RFLP PCR-ITS.....	57
3.3.4	Análises de Agrupamento e Análises Filogenéticas.....	58
3.3.5	Amplificação e Sequenciamento do Gene 16S rRNA.....	59
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.5	CONCLUSÃO.....	64
3.6	AGRADECIMENTOS.....	65
3.7	REFERÊNCIAS.....	65
4	ARTIGO 2: ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST PATOGENS OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA OF SERRANO CHEESE	69
4.1	ABSTRACT.....	69
4.2	INTRODUCTION.....	69
4.3	MATERIAL AND METHODS.....	71
4.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	71
4.3.2	Coliforms and <i>Escherichia coli</i>	72
4.3.3	<i>Staphylococcus</i> spp.....	72
4.3.4	<i>Salmonella</i> spp.....	73
4.3.5	Latic Acid Bacteria.....	73
4.3.6	Evaluation of <i>in Vitro</i> Antagonism.....	73
4.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	74
4.5	CONCLUSION.....	78
4.6	REFERENCES.....	79

5	ARTIGO 3: CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS DE <i>LACTOCOCCUS</i> AISLADAS DE QUESO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE (BRASIL)	83
5.1	RESUMEN	83
5.2	INTRODUCCIÓN	83
5.3	MATERIAL Y MÉTODOS	85
5.3.1	Microorganismos	85
5.3.2	Actividad Acidificante	86
5.3.3	Actividad Proteolítica	86
5.3.4	Actividad Autolítica	87
5.3.5	Producción de Aminas Biógenas	87
5.3.6	Actividad Aminopeptidásica	87
5.3.7	Resistencia al NaCl	88
5.3.8	Resistencia a la Temperatura	88
5.3.9	Analices Estadísticas	88
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
5.5	CONCLUSIÓN	93
5.6	REFERENCIAS	93
6	ARTIGO 4: CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS DE <i>LEUCONOSTOC</i> AISLADAS DE QUESO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE, BRASIL	96
6.1	RESUMEN	96
6.2	INTRODUCCIÓN	96
6.3	MATERIAL Y MÉTODOS	98
6.3.1	Microorganismos	98
6.3.2	Actividad Acidificante	99
6.3.3	Actividad Proteolítica	99
6.3.4	Actividad Autolítica	100
6.3.5	Actividad Aminopeptidásica	100
6.3.6	Producción de Aminas Biógenas	100
6.3.7	Actividad Lipolítica	101
6.3.8	Producción de Dextrano	101
6.3.9	Resistencia al NaCl	101

6.3.10	Resistencia a Acidez.....	102
6.3.11	Analises Estatísticas	102
6.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
6.5	CONCLUSIÓN	106
6.6	REFERENCIAS	106
7	ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE LACTOBACILLUS spp. ISOLADOS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE PRODUZIDO COM LEITE CRU, BRASIL.....	110
7.1	RESUMO	110
7.2	INTRODUÇÃO.....	110
7.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	112
7.3.1	Micro-Organismos.....	112
7.3.2	Atividade Acidificante	112
7.3.3	Atividade Proteolítica	112
7.3.4	Atividade Autolítica	113
7.3.5	Atividade Lipolítica	113
7.3.6	Produção de Aminas Biogênicas	113
7.3.7	Atividade Aminopeptidásica	114
7.3.8	Análises Estatísticas	114
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
7.5	CONCLUSÃO	121
7.6	REFERÊNCIAS	121
	CONCLUSÃO GERAL.....	124
	ANEXOS	126
	ANEXO A – Propriedades Tecnológicas	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUÇÃO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE NO BRASIL

Leite é um alimento universalmente conhecido pelo seu alto valor nutricional, devido aos seus principais constituintes: proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água. O que o torna um dos alimentos mais importantes e consumidos, particularmente por crianças. Por outro lado, este elevado valor nutricional também é um alimento extremamente perecível, capaz de servir como meio de cultura para inúmeros micro-organismos (PONSANO et al., 2001).

Boa parte dos micro-organismos presentes no leite cru é incluída no momento da ordenha, mas a contaminação pode ocorrer também durante sua estocagem na propriedade, seu transporte e seu processamento.

O Brasil é o quinto maior produtor de leite no mundo, com aproximadamente 31,6 bilhões de toneladas produzidos em 2012 (EMBRAPA, 2014) e o consumo de produtos lácteos vem crescendo anualmente no Brasil e no mundo.

A qualidade microbiológica do leite cru influencia significativamente a qualidade final do queijo. O tipo de produção que predomina na maioria das propriedades leiteiras do Brasil é familiar, com pouca tecnologia, controle sanitário dos animais e higienização deficientes, resultando num leite de baixa qualidade microbiológica. A qualidade microbiológica é uma das mais afetadas, uma vez que o leite produzido em condições inadequadas de higiene e sanidade recebe grande carga de micro-organismos, o que altera sua composição e várias características físico-químicas, comprometendo-o do ponto de vista tecnológico, durabilidade e de segurança alimentar (NERO, 2005).

Em diferentes estudos realizados no Brasil há relatos de isolamento de micro-organismos patogênicos em leite cru, e altas contagens de coliformes totais e *Escherichia coli* foram relatadas nos estados do Paraná (BELOTI et al., 1999) e (FAGAN et al., 2008), em Pernambuco (MATTOS et al., 2010), em Minas Gerais (PEREIRA et al., 2008); *Staphylococcus* sp. no Paraná por (SILVA et al., 2005) e Paraná e Rio Grande do Sul (SANTANA et al., 2006).

Os queijos artesanais no Brasil vêm sendo produzidos há séculos. Devido à grande extensão territorial, cada região do país passou a produzir queijos

com características sensoriais próprias e distintas entre si. Esses queijos são preferidos pelos consumidores por suas diferentes características sensoriais de cor, sabor, textura, aroma e cremosidade, quando comparados com os queijos processados pelos laticínios e que passam por tratamento térmico que assegura a inocuidade do produto, mas altera às características sensoriais conferidas pela presença de bactérias ácido lácticas da microbiota original.

Bulhões; Rossi Júnior (2002) mostram que parte do leite cru produzido no Brasil sem higiene adequada é utilizado na fabricação de queijos informal do tipo Minas Frescal, muito comum no sul e sudeste do país. Seu alto teor de água, a sua deficiente condição de higiene no processamento, manipulação, transporte e estocagem, tornam este queijo uma fonte de micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

De acordo com Ide; Benedet, (2001) os queijos artesanais geralmente são produzidos por pequenos agricultores, que têm nessa atividade uma fonte de renda. Esses queijos são feitos com leite cru e, muitas vezes, sem cuidado higiênico na sua elaboração, mas em função da sua composição, é considerado um alimento importante nutricionalmente. Apesar da produção e a comercialização de queijos artesanais serem consideradas clandestinas no Brasil, essa prática é frequente e não deve ser ignoradas indefinidamente. A sua proibição sumária pode acarretar, em determinadas regiões do País, um problema social, principalmente para produtores que sobrevivem dessa atividade.

1.2 ORIGEM DA COMERCIALIZAÇÃO DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO

A comercialização do queijo Serrano remonta ao tempo do tropeirismo. Os queijos serranos eram elaborados nas fazendas a partir da ordenha do gado xucro que deveria ser amansado, cujo volume excedia o que era consumido na propriedade. Assim, estes queijos maturados eram levados em buacas (sacos de couro que são colocados sobre o lombo de animais, onde os tropeiros carregam comida e mercadorias, muito utilizado no passado), no lombo das mulas e eram trocados pelas mercadorias que não eram produzidas pelas fazendas. Com o tempo este sistema foi ganhando importância e se tornando uma importante, ou principal fonte de renda para estes pecuaristas familiares (NUNES; JESUS, 2011).

O queijo artesanal Serrano (QAS) já foi utilizado no passado como moeda de troca, onde o queijo produzido era comercializado na região produtora e no litoral sul do estado de Santa Catarina, no período conhecido como ciclo do tropeirismo das mulas arreadas. Na atualidade, embora despercebido da economia formal, este produto continua tendo importância econômica e se constitui em atividade sustentável para um grande número de propriedades rurais do Planalto Sul de Santa Catarina (NUNES; JESUS, 2011).

Até a década de 1970, a produção do queijo Serrano se dava basicamente a partir do leite ordenhado de vacas das raças para corte, ou seja, leite obtido de raças especializadas na produção de carne. A partir desta década, alguns produtores começam a introduzir nos seus rebanhos algumas raças mistas, raças com aptidão para carne e leite que aliado ao cultivo de pastagens de inverno e o melhoramento do campo nativo através da introdução de espécies de maior valor nutritivo, principalmente leguminosas, alterou de forma significativa a época de produção e comercialização do queijo, reduzindo a sazonalidade. Atualmente a comercialização do queijo acontece durante o ano todo (NUNES; JESUS, 2011).

Os produtores de QAS utilizam diversas raças bem como seus cruzamentos, desde as mais especializadas para a produção de leite como a jersey e a holandês, como também as raças de corte e mistas, sendo forte a presença de animais com um alto grau de sangue zebuíno com uma tendência para “girolanda” e as raças de corte cruzadas com raças leiteiras. Nesses cruzamentos a raça mais utilizada foi a Jersey. Alguns produtores preferem utilizar o gado de corte selecionando dentre estes animais aquelas vacas mais produtivas (NETO et al., 2011).

1.3 QUEIJO ARTESANAL SERRANO DE SANTA CATARINA

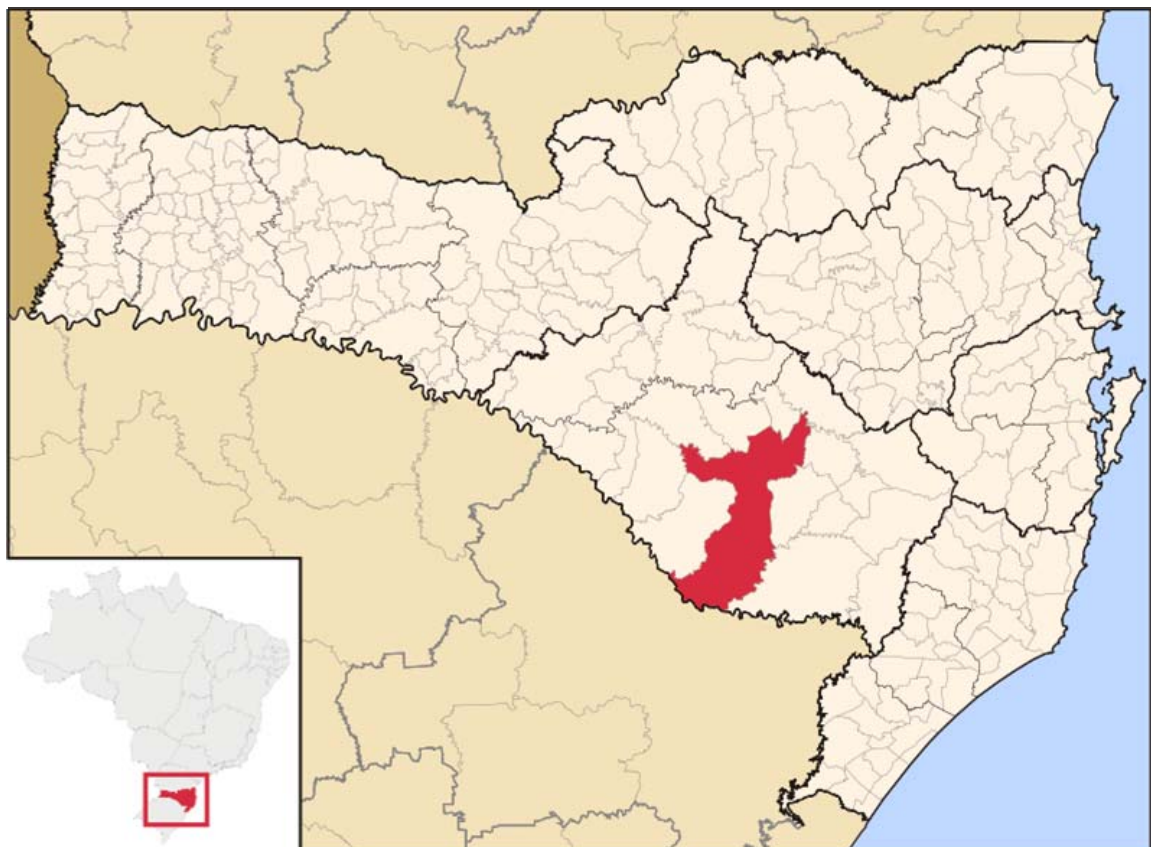
1.3.1 Região Serrana Catarinense

Situada entre o planalto norte, meio oeste, litoral sul de Santa Catarina e o vizinho estado do Rio Grande do Sul, a região dos Campos de Altitude de Santa Catarina, também conhecida como Serra Catarinense ou Planalto Sul de Santa Catarina, possui o maior rebanho bovino de corte do Estado, e tem na pecuária uma das principais atividades econômicas. Praticada principalmente de

forma pouco tecnicizada, com sistema de produção extensivo em pasto nativo, as propriedades envolvidas com esta atividade são na sua maioria de agricultores familiares que têm na produção do QAS uma importante ou principal fonte de renda (NUNES; JESUS, 2011).

A Serra Catarinense possui altitudes superiores a 1000 metros em relação ao nível do mar, sendo caracterizada por invernos rigorosos. Nela está localizado o município de Lages – SC, com características predominantemente agrícola, voltado para o reflorestamento e para a criação de gado. O município de Lages é considerado um dos maiores produtores de leite do Estado, mas possui somente uma indústria de processamento leiteiro, que recebe quase toda essa matéria prima (NUNES; JESUS, 2011).

Figura 1 – Localização do município de Lages na região serrana do Estado de Santa Catarina, local de produção de queijo artesanal Serrano.



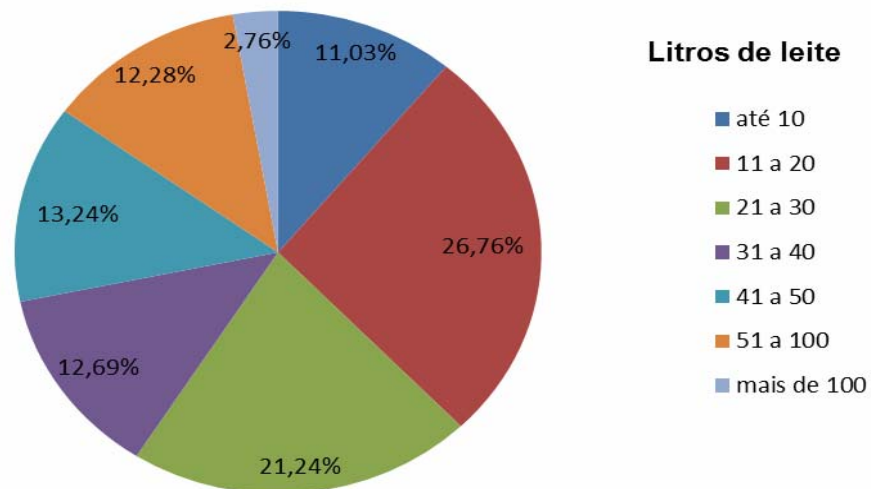
1.3.2 Produção Leiteira Catarinense

O estado de Santa Catarina tem sua bacia leiteira formada por minifúndios e pequenos produtores. Segundo o IBGE (2012), o Estado produziu 2,7

bilhões de litros de leite e destes foram entregues a indústria dois bilhões de litros, parte deste leite que não chega à indústria laticinista acaba sendo utilizada na elaboração de produtos artesanais. Grande parte é usada para a produção informal de manteiga, requeijões, e principalmente queijo para consumo próprio e para comercialização. Segundo Ide; Benedet (2001) a produção de leite tem um importante papel sócio-econômico na região, gerando empregos e mantendo o homem no campo.

Na maioria das propriedades a produção diária de leite é pequena, uma vez que as propriedades também são pequenas. A produção média diária de leite utilizado para a produção do queijo artesanal Serrano pode ser observada na Figura. 1 (NETO et al., 2011).

Figura 2 – Distribuição das propriedades produtoras de leite da região serrana catarinense de acordo com a quantidade produzida por dia (litros) e utilizados na produção de queijo artesanal Serrano nas propriedades leiteiras da região serrana catarinense.



Fonte: Neto et al., 2011.

1.3.3 O Queijo Artesanal Serrano (QAS)

O queijo artesanal Serrano representa a cultura e a gastronomia legadas pelos tropeiros, cuja produção é rudimentar, mas com sabor característico. Trata-se de uma receita sem muita tecnologia, repassada de geração a geração sem sofrer grandes transformações (SANTOS et al., 2011).

A fabricação informal do queijo artesanal no município de Lages é uma prática muito antiga, permitindo que este faça parte da dieta da população, por

ser um produto de grande aceitação em diferentes camadas da sociedade. Sua produção representa uma fonte de renda para muitas famílias da região, apresenta baixo custo de produção, é de fácil manufatura, que consiste apenas na adição de um coalho e sal ao leite cru e é de alto rendimento. O QAS, como outros queijos artesanais produzidos em muitas outras localidades, utiliza leite cru integral, que ao chegar ao local de fabricação é filtrado em pedaços de tecido e adicionado de coalho bovino. É um produto curado, que apresenta o interior macio de sabor láctico e levemente picante, com casca amarela e firme, classificado como de média umidade. Este produto tem sua composição e fabricação muito semelhante aos queijos Minas Frescal, Minas Curado e ao queijo de Coalho. É encontrado durante todo o ano, sendo em maior quantidade nos períodos de primavera e verão, quando devido ao aumento na produção leiteira, um volume maior do leite pode ser direcionado a fabricação do produto. Pode ser encontrado a venda nas prateleiras de mercearias, padarias, armazéns de bairro, mercados públicos, barracas de feiras e diretamente com o produtor (IDE; BENEDET, 2001).

Nunes; Jesus (2011) realizaram um levantamento com a aplicação de questionários nos pontos de comercialização, e encontraram que 75% do queijo artesanal Serrano é vendido para consumidores locais, 10% a consumidores da região produtora e 15% a consumidores de outras regiões de passagem pelos pontos de vendas também observaram que o tempo de cura destes queijos comercializados é em média de 10 a 15 dias e que 60% dos pontos de venda avaliados mantém os queijos em temperatura ambiente e o restante refrigerado. Sua comercialização é considerada irregular perante a legislação brasileira que estabelece que o queijo deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 1996) e também não atende as normas da Instrução Normativa nº 30 (BRASIL, 2013) para queijos elaborados com leite cru, pois muitas não são certificadas como livres de tuberculose e brucelose e também não têm implementado o programa de controle de mastite e de boas praticas de ordenha e de fabricação.

O queijo artesanal Serrano pode apresentar deficiências em sua qualidade microbiológica, devido a falhas na ordenha, higiene do ordenhador, nas instalações, e na sua maneira de fabricação, geralmente realizada em galpões. Também é frequente a utilização de utensílios mal higienizados, e em alguns casos para que ocorra a maturação mais rápida o queijo é colocado ao ar livre, sem proteção. A redução da qualidade microbiológica do queijo também pode ser

atribuída à presença de micro-organismos provenientes de mastite. De acordo com Jay et al. (2005) a utilização do leite com mastite e as deficiências higiênicas durante a ordenha são as principais causas dos elevados níveis de contaminação por *Staphylococcus aureus* nos queijos frescos. O leite cru é utilizado para a produção deste queijo no meio rural, e quando apresenta pouca higiene na sua obtenção e elaboração, pode servir de veículo a vários patógenos, muitos deles causadores de toxinfecções alimentares.

A presença de micro-organismos desejáveis contribui para as características sensoriais, conservação e condições higiênicas sanitárias do produto. A presença de micro-organismos indesejáveis pode ser resultante de contaminações relacionadas à higiene inadequada (GUEDES NETO et al., 2004). Dentre os patógenos comumente encontrados nestes produtos estão: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (RIEDEL, 1992; CARVALHO et al., 1996).

A utilização de leite pasteurizado resulta em um produto fora dos padrões sensoriais característicos dos queijos artesanais. Pasteurizar o leite destrói os micro-organismos patogênicos, mas também reduz as contagens de bactérias ácido lácticas (BAL) que fazem parte dessa microbiota natural do leite e são responsáveis pelo desenvolvimento das características sensoriais do produto (MARINO et al., 2003).

Os queijos artesanais apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado devido à presença das BAL endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009). Isto ocorre em consequência da substituição da complexa microbiota nativa presente no leite cru por fermentos lácticos comerciais uniformes, que conduzem a uma padronização do produto (MACEDO et al., 2004). De acordo com Peláez e Requena (2005) as variações entre as características sensoriais de um queijo produzido com leite cru para um queijo produzido com leite pasteurizado dependem, principalmente, da diversidade e complexidade da microbiota existente no leite cru. Trabalhos têm sido desenvolvidos no país na tentativa de manter a identidade dos diferentes queijos de fabricação artesanal e possibilitar que estes sejam seguros ao consumo humano. O objetivo maior é identificar e caracterizar a microbiota láctica responsável pelas características de cada queijo artesanal (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

1.3.4 Fabricação de Queijo

De acordo com Beresford et al. (2001) a fabricação da maioria das variedades de queijos envolve a combinação de quatro ingredientes principais: leite, coalho, micro-organismos e sal, que são processados através de uma série de passos comuns, tais como formação de gel, expulsão do soro, produção de ácido e adição de sal, seguido por um período de maturação. Variações nas misturas de ingredientes e o processamento subsequente conduziram à evolução de uma variedade de queijos. Diferenciações nas transformações dos parâmetros de produção como a temperatura de cozimento e manuseio da coalhada desempenham um papel importante na determinação das características de cada tipo de queijo, bem como, a microbiota que é responsável pelo desenvolvimento das características únicas de cada variedade de queijo.

1.4 MICROBIOTA PATOGENICA PRESENTE EM QUEIJOS PRODUZIDOS COM LEITE CRU

Pesquisas realizadas nos Estados de Minas Gerais, Sergipe, Santa Catarina, São Paulo, Bahia e Rio Grande do Norte na última década, em queijos artesanais produzidos com leite cru, demonstraram a ocorrência de produtos impróprios para o consumo humano, por apresentarem como principais patógenos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (NASSU et al., 2006; ROSSI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; SANTANA et al., 2008; MENEZES et al., 2009).

1.4.1 *Escherichia Coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete, e anaeróbia facultativa. Seu habitat primário é o trato gastrintestinal de humanos e outros animais endotérmicos (“de sangue quente”). É considerada o melhor indicador de contaminação para água e alimentos por exposição recente a rejeitos de origem fecal (SILVA et al. 2007).

O principal reservatório de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) é o trato intestinal dos ruminantes, nos quais não costumam produzir sinais clínicos. O leite pode ser contaminado com fezes, geralmente na sua obtenção, podendo ser

um veículo para *E. coli* e portanto considerado como uma via de transmissão importante. Tem sido observado que os utensílios utilizados para obtenção do leite durante a ordenha se contaminam, e por sua vez, contaminam novos lotes de leite. Por sua tolerância a valores baixos de pH, o processo de fabricação do queijo não inativa *E. coli*, e vários surtos são associados ao consumo de queijo e outros produtos lácteos elaborados com leite tanto pasteurizado como não pasteurizado. Diversos estudos realizados com queijo Minas Frescal têm permitido o isolamento de vários sorogrupos de *E. coli* (REID, 2001). De acordo com Almeida Filho et al., (2002) algumas cepas de *E. coli* têm sido envolvidas em graves surtos de toxinfecção alimentar em vários países.

Ide; Benedet (2001) realizaram análise microbiológica em 20 amostras de QAS, e encontraram as 20 amostras apresentando contagem entre $1,5 \times 10^3$ a $4,6 \times 10^7$ UFC/g para coliformes de origem fecal.

Melo et al., (2013) encontraram em 108 amostras de queijo artesanal Serrano 63 (58,33%) amostras positivas para coliformes totais e 64 (59,26%) positivas para *Escherichia coli*.

1.4.2 *Staphylococcus Aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* (GARRITY; HOLT, 2001). É composto por cocos Gram positivos, usualmente catalase positivos que, geralmente, metabolizam a glicose de forma oxidativa e fermentativa. Neste gênero se incluem até 49 espécies e 26 subespécies (EUZÉBY, 2007). As espécies do gênero *Staphylococcus* são classificados em grupos de acordo com a capacidade de sinterizar a enzima coagulase. O grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva é composta por 8 espécies (*S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. hyicus* e *S. agnetis*). As demais espécies não coagulam o plasma e são denominadas de *Staphylococcus* coagulase negativa.

No homem, *S. aureus* pode ocasionar intoxicação alimentar e infecções extra intestinais como lesões cutâneas, abscessos e síndrome da pele escaldada, bacteremia, impetigo, síndrome de choque tóxico, endocardites, osteomielites, mastites, etc. Em animais domésticos ocasionam mastites, abscessos

e outros processos supurados, dermatites, conjuntivites, etc (JABLONSKI; BOHACH, 2001).

Do ponto de vista de segurança de alimentos e saúde humana, o queijo é um alimento no qual *S. aureus* é propenso a desencadear importantes problemas de saúde pública. Presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos é um fator preocupante, principalmente quando atingem contagens iguais ou superiores a 10^6 UFC/g, pois considera-se que a partir deste valor, e sendo toxigênicos, a quantidade de toxina produzida será suficiente para causar sintomas de gastroenterite aumentando o risco de ocorrência de intoxicação estafilocócica (CARMO et al. 2002; SANTANA, 2006; FREITAS, 2013)

1.4.3 *Salmonella* sp.

Salmonella sp. é considerada um patógeno para muitos animais e também aos seres humanos, causando infecções graves e em alguns casos até a morte, também gerando prejuízos econômicos importantes a muitos países.

As toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* sp. são frequentemente associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite e derivados sem tratamento térmico. As enfermidades veiculadas por alimentos causadas por *Salmonella*, são consideradas um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos (JAKABI et al., 1999). A taxonomia atual do gênero *Salmonella* é baseada em características bioquímicas, antigênicas (antígenos somáticos, flagelares e de cápsula) e em técnicas moleculares de análise genética, que divide o gênero em duas espécies nominadas *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (LIBBY et al., 2004; CAMPOS, 1999). A *Salmonella enterica* divide-se em seis subespécies chamadas: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hountenae* e *indica* (CLARKE; GYLES, 1993; LIBBY et al., 2004). Atualmente, existem aproximadamente 2.600 sorovares identificados de *Salmonella* sp. Feitosa et al., (2003), Zaffari et al., (2007), Melo et al., (2013) isolaram *Salmonella* sp. em amostras de queijos artesanais no Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina respectivamente.

1.4.4 *Listeria Monocytogenes*

Listeria spp. é um bacilo Gram positivo, não esporulado, não produtor de ácidos, anaeróbio facultativo e de ampla distribuição ambiental, isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuais de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, de insetos, de adubo orgânico e em fezes de animais e inclusive de humanos (KONEMAN et al., 1997; MIMS et al., 1995; NOJIMOTO et al., 1997).

L. monocytogenes é patogênica para o homem e diversos animais, e sua ampla distribuição ambiental, como as outras espécies do gênero *Listeria*, é favorecida pela sua capacidade de multiplicação entre 0°C e 44°C e, embora sua faixa ótima seja entre 30°C e 37°C, pode sobreviver em alimentos congelados. Toleram pH extremos de 5 a 9, baixa atividade da água e concentrações de NaCl de 10% e até superiores. Este conjunto de características faz com que *L. monocytogenes*, seja um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes micro-organismos vêm ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos. Caracteriza-se por ser patogênica para indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico, tais como idosos, neonatos, pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), que podem apresentar infecção do sistema nervoso central, bacteremia e endocardite. No caso de mulheres grávidas pode também induzir aborto, parto pré-maturo e septicemia neonatal (MARCOS et al., 2000; MARTIN et al., 2004). Possui ainda capacidade de formar biofilme (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

L. monocytogenes também pode ser encontrada no leite cru utilizado como matéria prima de queijos. Leite e derivados têm sido os veículos de transmissão comumente associados a surtos de listeriose (PITT et al., 2000). Jay et al. (2005) afirma que a listeriose é uma doença particularmente grave, por apresentar taxa de mortalidade de 20 a 30%. Silva et al., (2003), analisando 218 amostras de queijo Minas frescal, encontraram em 14 amostras a presença de *Listeria monocytogenes*. Salamano et al., (2005) no Uruguai estudaram seis casos clínicos de neurolisteriose em adulto, e três pacientes relataram consumir queijos artesanais com frequência.

Em 2012 um surto de listeriose vitimou uma pessoa nos Estados Unidos da América, e outras 14 foram infectadas pela bactéria *Listeria* após ingerirem queijos do tipo ricota *salata* importados da Itália (OTICS, 2012).

Apesar de várias descrições da presença dos patógenos no leite cru e em derivados feitos com este leite, não há muitos relatos de surtos de grande repercussão envolvendo estes alimentos. Por outro lado, vários pesquisadores relatam a ausência destes patógenos em leite cru, com altas contagens de aeróbios mesófilos, sugerindo que fatores inerentes a estes leites, como a própria competição microbiana inibem ou dificultam o desenvolvimento de patógenos (NERO et al., 2008; MATTOS et al., 2010).

1.5 MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA

Bactérias Lácticas ou Bactérias Ácido Lácticas (BAL) engloba um grupo heterogêneo de micro-organismos, cuja característica principal é a produção de ácido láctico a partir da fermentação de açúcares.

BAL estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite, e podem ser encontradas em diferentes tipos de alimentos consumidos diariamente pelo ser humano como carnes, vegetais e derivados de leite como iogurtes e queijos. Elas se tornaram o foco de diversos estudos por apresentarem benefício à saúde humana e também como conservantes naturais de alimentos.

Devido ao aumento na produção de alimentos, o desenvolvimento de novas tecnologias para atender os desejos do consumidor por produtos seguros e saudáveis tem sido uma tendência. Há muito tempo se reconhece a importância das BAL como micro-organismos benéficos nos alimentos e na saúde, atuando sobre o trato gastrointestinal dos seres humanos, evitando o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos capazes de produzir enfermidades, como também pela estimulação da produção de anticorpos (CAMPO et al., 2008). BAL podem interferir na multiplicação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos por meio de competição por oxigênio e/ou produção de substâncias antagonistas (DE MARTINIS et al., 2003).

BAL foram caracterizadas por Kandler e Weiss (1986) como Gram positivas, usualmente catalase negativa, imóveis, de morfologia celular cocóide ou bacilar. Este grupo de bactérias possui a característica de ser estritamente

fermentativas apresentando duas principais vias a heterofermentativa e a homofermentativa com produção final de ácido láctico, são anaeróbias ou microaerófilas facultativas.

São capazes de suportar diferentes valores de pH (ácidos a alcalinos) como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* capazes de crescer a pH 3,9 e outros que crescem em pH compreendidos entre 9,2 e 9,6 como as espécies *Streptococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, ou do gênero *Carnobacterium* (AXELSSON, 1998). Sendo que a maioria desenvolve e até preferem valores de pH baixos entre 4,0 e 4,5.

Em relação à temperatura indicada para incubação podem ser classificadas em mesófilas, cuja temperatura está compreendida no intervalo de 22 a 34° C, este valor incluem a maioria das espécies dos gêneros conhecidos, e termófilas com uma temperatura entre 37 a 45° C incluindo neste intervalo o gênero *Lactobacillus* como o *Lactobacillus bulgaricus* usado na produção de alimentos fermentados.

As bactérias ácidos lácticas compreendem 13 gêneros de bactérias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella* (MOGENSEN et al., 2003).

A microbiota autóctone de alimentos inclui micro-organismos endógenos e contaminantes, decorrentes da falta de procedimentos higiênicos durante a produção dos mesmos. Essa microbiota pode incluir linhagens capazes de produzir grande variedade de compostos com ação antimicrobiana, que podem impedir a sobrevivência ou inibir o crescimento de patógenos (BAGGE-RAVN et al., 2003; MACHADO et al., 2011).

As bacteriocinas e outros produtos das BAL estão implicados na inibição de micro-organismos patogênicos como observado nas pesquisas realizadas em leites crus realizadas por Nero et al. (2006), Tamanini et al. (2007), Nero et al. (2008), Pires et al. (2008), Nero et al. (2009) e em queijos por Alexandre et al. (2002), Caridi et al. (2003), Guedes Neto et al. (2004), Chioda et al. (2006), Chioda et al. (2007).

O leite é a matéria prima da fabricação de queijos, e possui naturalmente bactérias que apresentam ação antagonista em relação às bactérias

patogênicas. A redução do pH pelo aumento da produção de ácidos orgânicos é considerado como o principal agente inibidor da multiplicação de micro-organismos contaminantes em alimentos fermentados. A tolerância ao pH ácido como consequência obrigatória de seu metabolismo, oferece uma grande vantagem seletiva para desenvolver-se nos alimentos onde se encontram. BAL promovem a acidificação a um pH próximo a 4,0 impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis. Para GALVEZ et al., (2007) esse grupo heterogêneo de bactérias tem como característica a capacidade de fermentação de açúcares. A produção de ácido láctico e outros ácidos, como acético e propiônico, contribuem também para controle de micro-organismos, pois gera uma acidez no alimento que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram positivas e negativas, além de fungos e leveduras (ROSS et al., 2002).

Também são produtoras de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas (ALVARADO; DIAZ 2009; FERNANDEZ et al., 2002; NAIDU et al., 1999; LEWUS; MONTVILLE, 1991; GIRAFFA et al., 1997; CHIODA et al., 2007; LIMA et al., 2009). O acúmulo destas substâncias nos alimentos resulta na atividade antimicrobiana das BAL.

Estudos realizados por Marugg (1991) com várias bacteriocinas indicam que elas não são tóxicas nem provocam reações imunológicas em seres humanos e, por isso, possuem grande potencial como conservadores naturais em alimentos.

Para Ross et al., (1999) o potencial de aplicação de uma determinada bacteriocina pode ser medido por suas propriedades. Características como estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação, estão entre as mais importantes para tal previsão.

De acordo com Jack et al. (1995) a maioria, senão todas as bactérias, são capazes de produzir várias substâncias no curso de seu desenvolvimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si quando para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático.

O uso destas cepas biocontroladoras, seus extratos e metabólitos produzidos, impedem o desenvolvimento de outros micro-organismos que afetam de forma negativa os alimentos e indiretamente aos consumidores (VÁSQUEZ et al., 2009). A capacidade antimicrobiana das BAL frente a patógenos de origem

alimentar, como também frente aos de origem clínico, se atribui à produção de bacteriocinas (MARAGKOUidakis et al., 2009), as quais atuam formando poros para permeabilizar a membrana celular e interferir nas funções metabólicas da cepa patogêna (SUSKOVIC et al., 2010). Esta biotecnologia pode ser implementada relativamente a baixo custo para a conservação de uma ampla variedade de alimentos (HOOVER; STENSON, 1993).

Existem dois tipos de bacteriocinas: um tipo clássico, que exibe um espectro de atividade apenas contra as espécies homólogas e um segundo tipo, menos comum, que apresenta um amplo espectro de ação contra uma variedade de microrganismos Gram positivos (Tabela 1). Como exemplo deste segundo tipo pode-se citar a nisina, produzida por determinadas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e a pediocina A produzida por *Pediococcus pentosaceus*. Até o momento, somente a nisina foi suficientemente avaliada e purificada (MORENO et al., 2008)

Tabela 1 – Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas e que apresentam amplo espectro de atividade contra micro-organismos contaminantes.

Espécie produtora	Bacteriocina	Espectro de Atividade
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina	Bactérias Gram-positivas
	Lacticina 481	<i>Clostridium</i>
	Bacteriocina V e VII	<i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina F	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. curvatus</i>	Curvacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>L. carnis</i>	Bacteriocina S	<i>Enterococcus</i>
		<i>Listeria</i>
<i>L. sake</i>	Sakacina A	<i>Enterococcus</i> sp.
	Sakacina P	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	Bacteriocina	<i>Clostridium ramosum</i> H1
<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A-UAL 187	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	Mesenterocina 5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	Mesenterocina Y105	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	Bactérias Gram-positivas
<i>Pediococcus</i>	Pediocina PA1	<i>Listeria monocytogenes</i>

Fonte: adaptado de Moreno (2008).

Outra função importante das BAL é desenvolver as propriedades sensoriais dos alimentos fermentados. O acúmulo de ácido láctico facilita a

coagulação do leite e a retração da coalhada. Elas também produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas, lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados. Elas permitem preservar o valor nutritivo e a salubridade da matéria prima, proporcionando um produto agradável (COGAN et al., 1997).

Do queijo são isolados micro-organismos denominados fermentos ou cultivos lácticos iniciadores. Os micro-organismos implicados são bactérias dos gêneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (ÉLIAS, 2010).

De acordo com Carrasco et al., (2002) o uso de BAL nos cultivos iniciadores possuem uma ampla aplicação na produção de alimentos fermentados. O cultivo iniciador estará constituído pelas espécies microbianas mais características da variedade de queijo estudado, e que ademais possuam características concretas de interesse tecnológico. Na maioria dos queijos as BAL constituem os micro-organismos principais (ÉLIAS, 2010).

Um cultivo iniciador é um cultivo preparado com uma ou várias cepas pertencentes a uma ou varias espécies de bactérias, leveduras ou fungos, que são inoculadas no leite cru ou pasteurizado destinado a fabricação de queijo ou ao queijo. Os fermentos lácticos desenvolvem um papel principal no início da fermentação, desenvolvendo acidez, favorecendo a coagulação e promovendo a maturação dos queijos (ROSS et al. 2000). O gênero mais empregado na formulação de um cultivo iniciador é o *Lactococcus* spp. por sua grande capacidade de acidificação.

Tem havido um interesse cada vez maior por estudos genotípicos e fenotípicos de isolados de bactérias autóctones a partir de queijos artesanais produzidos sem a adição de fermentos iniciadores industriais (starters). Identificar corretamente os tipos de BAL isoladas em diferentes regiões do país contribuirá para melhorar a qualidade sanitária e ainda caracterizar cada um dos produtos em que podem ser usadas, fornecendo-lhes uma identidade. Desta forma permitirá a fabricação de derivados lácteos artesanais, gerando renda econômica a produtores rurais.

BAL não integrantes do cultivo iniciador, são chamadas de NSLAB (*non-starter lactic acid* bactéria). NSLAB constituem uma microbiota secundária que se desenvolve espontaneamente em todos os queijos produzidos com leite cru,

formada quase exclusivamente por cocos e bacilos lácticos heterofermentadores, entre eles os *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Microcococcus*. (HA-LA BIOTEC, 2011).

NSLAB não contribuem para a produção de ácido durante a fabricação, mas geralmente desempenham um papel significativo durante a maturação. Também determinam uma influencia no desenvolvimento do sabor, aroma e textura dos queijos e, portanto, em sua qualidade (SHEEHAN et al. 2008). Essa microbiota secundária composta de bactérias não integrantes do cultivo iniciador que se desenvolvem na maioria das variedades de queijos, além de outras bactérias, leveduras e/ou fungos, que crescem no interior ou externamente ao produto são geralmente específicas para determinada variedade de queijo, ou tipos de queijo intimamente relacionados (BERESFORD et al. 2001).

1.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BAL

Tradicionalmente, a maior parte do conhecimento da biodiversidade em um determinado ecossistema, se obtinha mediante estudos baseados no crescimento dos micro-organismos em meios de cultivos seletivos e sua identificação posterior em nível de gênero/espécie usando técnicas de caracterização fenotípica, como se explicou anteriormente. Mesmo que, estes métodos possam ser razoavelmente sensíveis, nem sempre permitem a discriminação de espécies ou de cepas, nem a detecção de relações filogenéticas entre certos grupos de bactérias (NIETO-ARRIBAS, 2010). Em resposta a este problema, surgem os métodos moleculares, em particular, técnicas baseadas na PCR mediante digitalização de bandas (JUSTÉ et al., 2008). Segundo Savelkoul et al., (1999) vários métodos foram desenvolvidos para a identificação de organismos procariotas e eucariotas, ao nível de DNA. Esses métodos diferem na sua capacidade de identificar em nível taxonômico, diferenciação, reprodutibilidade, facilidade de interpretação e padronização.

O desenvolvimento de técnicas moleculares de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), para identificação de espécies bacterianas, oferece novas perspectivas nos estudos relacionados à filogenia e à taxonomia microbiana (TERZIC-VIDEJEVIC et al., 2007).

Entre os métodos moleculares existentes, os mais utilizados são baseados na determinação de marcadores genéticos de DNA. Estas técnicas são aplicadas em estudos ecológicos microbianos, sendo baseadas na detecção de diferenças que ocorrem no DNA/RNA, já que estas diferenças não estão influenciadas pelo estado fisiológico das células e permanecem constantes durante o desenvolvimento das mesmas. Estas técnicas têm sido utilizadas para investigar bactérias específicas e estudar a diversidade de populações em diferentes nichos bacterianos, incluindo o leite e produtos lácteos (GIRAFFA; NEVIANI, 2000).

Vários autores têm usado técnicas moleculares com bastante sucesso, rapidez e facilidade para identificar, em nível de subespécies e biovariantes, BAL isoladas de produtos lácteos (MANCINI et al., 2012; BULUT et al., 2005; GIRAFFA et al., 2003; MARINO et al., 2003; BERESFORD et al., 2001). Métodos baseados em PCR, como o polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados e tratados com enzimas de restrição (*RFLP-fragment length polymorphism*) é considerado importante para a caracterização de cepas específicas de BAL (MOHANIA et al., 2008).

Para Lueders; Friedrich (2003) RFLP é uma ferramenta importante na diferenciação ecologia microbiana. Ele pode ser usado para monitorar a diversidade, estrutura e dinâmica de populações microbianas de maneira adequada. RFLP baseia-se na amplificação por PCR de uma mistura de genes que representam diferentes micro-organismos em extratos de ácidos nucleicos ambientais. O resultado da amplificação são digeridos com enzimas de restrição, sendo apenas os fragmentos de restrição visualizados após eletroforese e corados, permitindo observar as diferenças entre diferentes micro-organismos estudados.

1.6.1 Sequenciamento de Genes de BAL

Segundo Nieto-Arribas (2010) a amplificação do gene 16S rRNA identificar micro-organismos com maior segurança. Os ácidos ribonucleicos ribossômicos (rRNA) são uma ferramenta quase ideal para o estudo da evolução e do parentesco microbiano, já que sua sequência, devido a seu papel constante no ribossomo, se mantém bem conservada durante a evolução. Os rRNA possuem sequências variáveis e sequências constantes, que podem ser utilizadas para comparar tanto micro-organismos muito próximos como muito afastados

filogeneticamente. As bactérias possuem três tipos de rRNA, designados por seu coeficiente de sedimentação como fração 23S, 16S e 5S, cujos genes se encontram normalmente organizados e separados entre si por sequências intergênicas chamadas ITS (Internal Transcribed Spacer). A fração 16S do rRNA permite um sequenciamento rápido e com muita informação. Atualmente se dispõe de um número grande de informação desta fração em base de dados mundial, o que facilita a identificação. Os micro-organismos desconhecidos podem ser identificados em função do alinhamento da sequência de seu 16S rRNA com as sequências disponíveis nestas bases de dados.

1.7 CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE BAL

1.7.1 Atividade Acidificante

BAL possuem duas vias principais de fermentação, a homofermentativa e a heterofermentativa. A via homofermentativa possui as enzimas frutose 1,6-difosfatoaldolase e hexoisomerase, que não atuam na via heterofermentativa que possui como enzima a fosfoacetolase. A via homofermentativa produz o ácido láctico ou lactato (sabor e aroma) enquanto que a via heterofermentativa resulta em etanol, acetato (sabor e aroma) e dióxido de carbono (CO₂) (olhadura) (NIETO-ARRIBAS, 2010).

De acordo com Élias (2010) a fermentação láctica é o acúmulo de ácidos orgânicos e durante este processo, o pH do queijo pode diminuir até valores de 4,5 ou inferiores. Valores tão baixos de pH não permitem o desenvolvimento das espécies ácido-sensíveis.

O metabolismo da lactose é essencial na produção de todas as variedades de queijos. Os ácidos orgânicos promovem a redução do pH ajudando a formação e contração da coalhada, com a expulsão do soro. A capacidade fermentativa e a diminuição do pH também é importante para a produção do queijo, já que essa redução vai influenciar de forma bacteriostática sobre a microbiota alterante e patogênica (NIETO-ARRIBAS, 2010). A fermentação da massa é importante para a produção de queijos de massa filada como o Mussarela e Provolone, e ainda, durante a formação da coalhada na preparação do queijo Cheddar entre outros (PARENTE; COGAN, 2004).

1.7.2 Atividade Lipolítica

O metabolismo dos lipídios, conhecido como lipólise, é de acordo com McSweeney; Sousa (2000) um fenômeno bioquímico que consiste na liberação de ácidos graxos e glicerídeos a partir da gordura do queijo, que são importantes na caracterização do sabor, aroma e textura deste alimento. Essa lipólise pode ocorrer pela presença de lipases nativas do leite, do coalho, do cultivo iniciador, da microbiota natural do leite e de lipases exógenas.

A lipólise em queijo contribui com o aroma como fonte de ácidos graxos, especialmente de cadeia curta, que podem ser degradados a metilcetonas e lactonas. Devido a oxidação de ácidos graxos, podem ser formados vários aldeídos insaturados que aportam um *flavour* forte causando o efeito conhecido como rancidez oxidativa, atuando como solvente para compostos aromáticos e sápidos. São produzidos a partir dos lipídios, mas também a partir das proteínas, da lactose ou da degradação do citrato (NIETO-ARRIBAS et al., 2010a).

Alguns gêneros de BAL são mais lipolíticos que outros, e neste grupo o gênero *Enterococcus* apresenta uma maior atividade lipolítica e esterásica do que, por exemplo, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (KATZ et al., 2002). A lipólise é importante na caracterização do sabor em queijos como o Provolone.

1.7.3 Atividade Proteolítica

BAL são micro-organismo com grandes requerimentos de aminoácidos e seu desenvolvimento depende de sistemas eficientes para a degradação de proteínas e do transporte de peptídeos pequenos. O sistema proteolítico de BAL é eficiente para reduzir proteínas a oligopeptídeos ou pequenas cadeias de aminoácidos e prover as células com os aminoácidos necessários para sua multiplicação no leite (NIETO-ARRIBAS et al., 2010).

A proteólise é um fenômeno bioquímico mais complexo e mais importante que tem lugar durante a maturação da maioria das variedades de queijo. Poderia ser resumida como uma hidrólise inicial das caseínas, catalisada em primeiro lugar pelo coalho residual e em menor grau pela plasmina, dando lugar a formação de peptídeos de alto ou médio peso molecular, os quais são sucessivamente degradados pelo coalho e as enzimas do cultivo iniciador e da

microbiota NSLAB presentes no queijo. A produção de pequenos peptídeos e aminoácidos livres é devido a ação de proteinases e peptidases bacterianas (NIETO-ARRIBAS et al., 2010a).

Segundo Nieto-Arribas (2010a) as modificações que ocorrem nas proteínas são as mais importantes durante a maturação do queijo. Praticamente todos os elementos nitrogenados do queijo se encontram em forma de proteínas solúveis em água, e que com a maturação do queijo se hidrolisam mediante enzimas, dando lugar a compostos mais simples. O produto final são os aminoácidos responsáveis pelas qualidades nutritivas e sensoriais do alimento. Isto pode ser observado durante a maturação de queijos Parmesão e Gruyère.

BAL componentes do fermento participam nas proteólises que ocorrem durante a maturação do queijo através de enzimas unidas à parede celular que podem ser liberadas ao meio (enzimas extracelulares), enzimas unidas à membrana celular e enzimas intracelulares (CASTILLO et al. 2007; DELGADO et al. 2010).

1.7.4 Atividade Autolítica

Entre as diferentes peptidases bacterianas produzidas por BAL encontram-se as aminopeptidases, endopeptidases, as dipeptidases e as tripeptidases, enzimas intracelulares de grande importância ao caráter autolítico das cepas. As cepas que se lisam mais rapidamente degradam em maior velocidade as caseínas e peptídeos de maior tamanho, liberando maiores quantidades de peptídeos pequenos e aminoácidos livres (AYAD et al., 2004). O processo de autólise também é importante para assegurar o desenvolvimento das características desejáveis durante a maturação dos queijos, e a lise celular contribui para a liberação de enzimas responsáveis pelo aparecimento do aroma próprio do queijo na maturação (NIETO-ARRIBAS, 2010a).

1.7.5 Produção de Dextrano

Na indústria láctea, a produção de dextrano ou de outros exopolissacarídeos é considerada como uma característica importante das BAL utilizadas com fermentos (PARENTE; COGAN, 2004). Todas as cepas de

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* costumam apresentar esta propriedade. Os expolissacarídeos contribuem para melhorar a textura e viscosidade do produto fermentado (RUAS-MADIEDO, 2002).

1.7.6 Resistência ao NaCl

A presença de NaCl pode exercer um efeito inibidor sobre o crescimento das bactérias ao produzir mudanças na osmolaridade que podem afetar as funções essenciais. As cepas de *Lactococcus* toleram concentrações de 4-6% de NaCl, já as cepas de *Leuconostoc* tendem a serem menos resistentes a valores de NaCl acima de 4,5% (NIETO-ARRIBAS, 2010a).

1.7.7 Resistência a pH Baixo

Como consequência do próprio metabolismo das BAL, as condições nas que estas se encontram durante o processo de elaboração de um produto lácteo fermentado são de uma elevada acidez, devido a produção de ácidos, principalmente ácido láctico. Durante o processo de coagulação do leite o pH baixa até 4,8-5,2 (NIETO-ARRIBAS, 2010a). Isto vai afetar a sobrevivência das BAL, a menos que estas disponham dos mecanismos que lhes permitam tolerar estas condições (VAN de GUCHTE et al., 2002).

1.7.8 Aminas Biogênicas

Os metabólitos finais da proteólise são os aminoácidos livres, que podem ser descarboxilados por BAL em CO₂ e em aminas biogênicas. Para Gardini et al., 2001 alguns fatores podem contribuir para a presença e acumulação de aminas biogênicas nos queijos, como a disponibilidade de aminoácidos precursores, o pH, a atividade de água, a concentração de sal e também a temperatura, bem como a quantidade de bactérias e os efeitos sinérgicos entre os diferentes micro-organismo presentes no queijo.

O problema da formação de aminas biogênicas é que algumas podem ser tóxicas, mesmo quando ingeridas em pequenas quantidades. Trabalhos recentes identificaram que alguns gêneros de BAL isoladas de queijos foram

capazes de produzir tiramina e histamina como os citados por Komprda et al., (2008); Nieto-Arribas et al., (2009); Bunková et al., (2010); Ladero et al., (2010) em *Lactobacillus* e *Enterococcus*, e Nieto-Arribas et al., (2009a) mencionam a produção de histamina, tiramina e cadaverina por *Lactococcus* isolados de queijo Manchego na Espanha. A tiramina possui propriedades vasoativas e causam sintomas como hipertensão, a histamina causa hipertensão, dor de cabeça, vômitos e diarreia. A cadaverina resulta no aparecimento de odores desagradáveis no produto.

A determinação da capacidade aminobiogênica em cepas que podem ser utilizadas como cultivo iniciadores no queijo é necessária para saber os riscos toxicológicos que podem ocorrer devido a presença de aminas biogênicas (MARTÍN-PLATERO et al., 2009; FERNÁNDEZ et al., 2010).

A indústria láctea mundial tem mostrado interesse em preservar cepas autóctones com boas propriedades tecnológicas para emprego como cultivos iniciadores da fermentação, buscando manter as características organolépticas dos produtos artesanais.

São desejáveis sistemas de produção que possam unir qualidade microbiológica, física e química do queijo, atendendo às exigências do consumidor por produtos lácteos seguros e nutritivos. Para isso é necessário realizar estudos que permitam identificar formas naturais de controle dos principais patógenos em alimentos, como a utilização de BAL. Conhecer a microbiota dos queijos artesanais como o queijo artesanal Serrano produzido em Santa Catarina, possibilitaria identificar BAL autóctones com potencial tecnológico e antagonista a patógenos, criando uma coleção de cepas utilizáveis em fermentos que colaborassem com a qualidade sanitária e tecnológica (textura, sabor e aroma) deste queijo. Estudos como este proporcionariam a elaboração de fermentos lácticos que reproduzissem as características do queijo permitindo a pasteurização do leite para confecção do produto e posterior restauração da microbiota láctica através da adição do fermento.

1.8 REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo – de – minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, n. 4, 2002.

- ALMEIDA FILHO, E. S.; LINDNER, A. L.; ALMEIDA, D. S. et al. Perfil microbiológico de queijo tipo minas frescal, de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 16, n. 92/93, p. 51-55, jan./fev. 2002.
- ALVARADO, C.C. R.; DÍAZ, C.G. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. **Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes**. v. 51, n.1, p. 8-14, 2009.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* ed. Salminen, S. and von Wright, A. pp. 1–72. New York: Marcel Dekker, 1998.
- AYAD, E.H.E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N. et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**. v. 21, p. 715–725. 2004.
- BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.; HJELM, M. et al. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries- analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International Journal of Food Microbiology**. v. 87, n.03 p. 239-250, 2003.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A. et al. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**. v.20, n.1, p.12-15, 1999.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. p. 3977 - 3978. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07/08/2013. **Diário Oficial da União**. Seção 1, Brasília. 2013.
- BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JUNIOR, O. D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 54, n. 03, p. 320 - 324, jun. 2002.
- 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, p. 19-24, 2005.
- BUNKOVÁ, L.; BUNKA, F.; MANTLOVÁ, G. et al. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. **Food Microbiology**. v. 27, p. 880-888, 2010.
- CARIDI, A., MICARI, P.; CAPARRA, P. et al. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 191-200, 2003.

- CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R., **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu. p. 229 – 238, 1999.
- CAMPO, C. I. M. del; GÓMEZ, H. E.; ALANIZ, R. de la O. Bacteria ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. **E-Gnosis**. v. 6, art. 5, 2008.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**. v. 19, p. 9-14, 2002.
- CARRASCO, M.S., SCARINCINI, H.E. AND SIMONETTA, A.C. Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v. 57. n. 1, 15-19, 2002.
- CARVALHO, E. P.; MOCHEL, A. C.; LEAL, D. D. M. et al. Qualidade de queijo “minas frescal” comercializado em feiras livres. In: Congresso Nacional de Laticínios, 14., Encuentro Lácteo del Cono Sur, 1., 1996, Juiz de Fora. **Anais... Juiz de Fora : Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. 1996. p. 111 - 118. 1996.
- CASTILLO, I., CALVO, M.V., ALONSO, L. et al. Changes in lipolysis and volatile fraction of a goat cheese manufactured employing a hygienized rennet paste and defined strain starter. **Food Chemistry**. v. 100, p. 590-598. 2007.
- CERQUEIRA, A. M.; GUTH, B. E.; JOAQUIM, R. M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 70, p. 111-121, 1999.
- CHIODA, T. M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R. et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 101, p.121-124, 2006.
- CHIODA, T. M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* em Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**. v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.
- CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2 ed. Ames: Iowa State University, 1993, p. 133-153.
- COGAN, T.M., BARBOSA, M., BEUVIER, E. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal Dairy Research**, v. 64, 409–421, 1997.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.29, p.114-119, 2003.
- DELGADO, F. J., GONZÁLEZ-CRESPO, J., CAVA, R., et al. Characterisation by SPME-GC-MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. **Food Chemistry**. v. 118, p. 182-189, 2010.

ÉLIAS, A. H. **Selección de bacterias lácticas, aisladas de un queso de cabra artesanal, en función de su aptitud tecnológica y elaboración de un cultivo iniciador destinado a la industrialización de quesos artesanales.** 2010. 110. Tese (Doutorado em Higiene e Tecnologia dos Alimentos) – Universidad de León, León. 2010.

EMBRAPA. Principais países produtores de leite no mundo – 2012. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus *Staphylococcus*. 2007. Disponível em: <<http://www.bacteria.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 de abr. 2014.

FAGAN, E. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 29, n. 3, p. 651-660, 2008.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp., e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. supl. 23, p. 162-165, 2003.

FERNANDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal Applied Microbiology**. v. 94, p. 449-455, 2002.

FERNÁNDEZ, E.; ALEGRÍA, A.; DELGADO, S. et al. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**. v. 20, p. 142-148, 2010.

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

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 15, n. 1, p. 35-42, 2013.

GALVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 01/02, p. 51-70, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M.C. et al. Effects of pH, temperature and CLNa concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal Food Microbiology**, v. 64, p. 105-117, 2001.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **The road map to the Manual**. 2 ed New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2001. p.119-154.

GIRAFFA, G.; CARMINATTI, D.; NEVANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potencial technological use. **Journal Food Protection**. v. 60, p. 732-738, 1997.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. **Italian Journal Food Science**. v. 4, p. 403-423, 2000.

GUEDES NETO, L. G., VELOSO, F. P., PAIVA, R. M. B., et al. Qualidade físico-química e microbiológica de queijos produzidos no Brasil – Revisão. In: Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. **Anais**. v. 59, n. 339, p.233-236, 2004.

HÁ-LA BIOTEC. Informativo trimestral para a indústria lactea:Laticínios. São Paulo:Chr-Hansen, v. 117, p. 1-4, 2011.

HOOVER, D.G.; STENSON, L.R. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Academic Press Inc**. USA, 1993.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lacticacid bacteria. **FEMS Microbiology Review**. v. 12, p. 165-178, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=43>. Acesso em: 20 dez, 2013.

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

JABLONSKI, L. M; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers**. 2 ed. ASM Press-Washington.. p.411-434. 2001.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Review**. v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A. et al Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 58, n.1, p. 47-51, 1999.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. Y.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. Springer, NY, USA. 2005, 790pp.

JUSTÉ, A., THOMMA, B.P.H.J., LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**. v. 25, p.839-848, 2008.

KANDLER O.; WEISS N., Genus *Lactobacillus*. Beijerinck 1901, 212AL, in: Sneath P.A., Mair N.S.; Sharpe M.E.; Holt J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology, vol. 2., **The Williams and Wilkins Co.** Baltimore, USA, 1986, p. 1209–1234.

KATZ, M.; MEDINA, R.; GONZÁLEZ, S. Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. **Journal Food Protect.** v. 65, p. 1997-2001, 2002.

KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, V. et al. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. **Food Microbiology.** v. 25, p. 219-227, 2008.

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** 5 ed. Lippincott, NY, 1395 p., 1997.

LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., CUESTA, I. et al. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. **Food Microbiology.** v. 27, p. 933-939, 2010.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods,** Amsterdam. v.13, n.2, p.145-150, 1991.

LIBBY, S. J.; HALSEY, T. A.; ALTIER, C. et al. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. et al. **Pathogeneses of Bacterial Infections in Animals,** 3 ed., Blackwell Publishing: Ames, Iowa, 2004.

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.

LUEDERS, T.; FRIEDRICH, M. W. Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. **Applied Environmental Microbiology.** v. 69, n. 1, p. 320-326. 2003.

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

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; PORTO, B. C. et al. Interferência da microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus* coagulase positiva. **Revista Ciência Agronômica,** v. 42, n. 2, p. 337-341, 2011.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases,** v. 9, p. 190-198, 2008.

MANCINI, A.; LAZZI, C.; BERNINI, V. et al. Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. **Journal of Microbiological methods,** v. 91, n. 3, p. 380-390, 2012.

- MARAGKOUDAKIS, P.; MOUNTZOURIS, K.; PSYRRAS, D. et al. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 130, n.3, p. 219–26. 2009.
- MARCOS, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J. et al. In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains in Barcelona – Spain. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. 38, 259-261, 2000.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M; RONDONINI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 229, p. 133-140, dec. 2003.
- MARTIN, B.; JOFRE, A.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Journal in Applied Microbiology**, n. 39, v. 3, p. 290-295, 2004.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M. RONDONINI; G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1 p. 133-140, 2003.
- MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. et al. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Food Microbiology**. v. 132, p. 24-32, 2009.
- MARUGG, J. D. Bacteriocins, their role in developing natural products. **Food Biotechnology**. v. 5, n. 3, p. 305-312, 1991.
- MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. et al. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 173-182, 2010.
- McSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. **A review Lait**, v. 80, p. 293–324, 2000.
- MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, 2013.
- 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 LATINOAMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS. 16., 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. CD ROM.
- MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M. et al. *Microbiologia Médica*. 1 ed. Manole. São Paulo, 1995.

MINAS GERAIS. Decreto 42.645, de 05 de junho de 2002. Aprova o Regulamento da Lei nº14.185, de 31 janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal. 2002.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms – health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bull. International Dairy Federal*. n. 377, p. 4-9, 2003.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/Index.htm>. Acesso em: 13/4/2014

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews Food Science Nutrition*. v. 38, p. 13-126, 1999.

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.

NERO, L. A. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. 2005. 141 f. **Tese** (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo. 2005.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. et al. Comparison of Petrifilm Aerobic Count Plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, v. 14, p. 249-257, 2006.

NERO, L. A.; De MATTOS, M.; BARROS, M. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses and Public Health*, 55, 299-305. 2008.

NERO, L.A.; De MATTOS, M.; BARROS, M. A.; BELOTI, V. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. *Microbiological Research*, 164, 529-535, 2009.

NETO, S. P.; SOUZA, L. T.; CORDOVA, U. A. Sistema de produção utilizado pelos produtores. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 63-92.

NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J.M.; SESEÑA, S. et al. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, v. 20, p. 1092–1098, 2009a.

- NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, p. 1505-1517, 2009.
- NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. **Food Microbiology**, v. 27, p. 85-93, 2010.
- NIETO-ARRIBAS, P. Diversidad genética y caracterización tecnológica de cepas autóctonas aisladas de queso de D. O. "Manchego", para su selección como cultivo iniciador. 2010. 251. Tese (Doutorado em Química Analítica e Tecnologia de Alimentos) – Universidad de Castilla-LaMancha. 2010a.
- NOJIMOTO, I. T. I.; SOUZA, S. R.; VALADÃO, L. M. ocorrência de *Listeria* spp. em crianças da cidade de Goiânia-Goiás. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 29, n. 2, p. 73-74, 1997.
- NUNES, I. R.; JESUS, N. N. Área geográfica de produção, importância econômica e comercialização. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 53-63.
- 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.
- OTICS. Observatório das Tecnologias da Informação e Comunicação em Sistemas e Serviço de Saúde da Cidade do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.otics.org/estacoes-de-observacao/rio-saude-presente/subpav/vigilancia-em-saude/CIEVS/clipping/13-09-2012-2013-queijo-contaminado-causa-surto-de-listeriose-incluindo-uma-morte-nos-estados-unidos> acesso em: 10/01/2014.
- PARENTE, E.; COGAN, T.M. Starter cultures: general aspects. In: FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M. et al. **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology**. Londres: 3 ed., v. 1. Elsevier Academic Press, 2004, p. 123–147.
- PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 831-844, 2005.
- 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.
- PIANTA, C.; PINHEIRO, P.; ZANOTELLI, G. et al. Características físico-químicas e microbiológicas do queijo "colonial" no Rio Grande no Sul. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 29., Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 15., Congresso de Medicina Veterinária do Conesul, 4., Congresso Estadual da ANCLIVEPA/RS, 1, 2002, Gramado. **Anais...** Porto Alegre : SOVERGS, 2002. CD - ROM.

- PIRES, E.; M. F. ; TAMANINI, R. ; ANGELA, H L et al. Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus Aureus* isoladas de leite cru produzido na região agreste de Pernambuco. In: III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008, Recife- PE. **Anais**, III Congresso Brasileiro de Qualidade do leite, 2008.
- PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, R. R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v.63, n.7, p.916-920, 2000.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A. C. B.; et al. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 86, p. 31-38, 2001.
- REID, T. M. S. A. Case study of cheese associated *E. coli* O157 outbreaks. **Food and Nutrition**. p. 201-212, 2001.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário de Alimentos**. 2º ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
- ROSS, R. P.; GALVIN, M.; McAULIFFE, O. et al. Developing applications for lactococcal bacteriocins. **Antonie Leeuwenhoek, Dordrecht**. v. 76, n. 1, p. 337-346, 1999.
- ROSS, R.P., STANTEON, C., HILL, C. et al. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 96-104, 2000.
- ROSS, R.P., MORGAN, S., HILL, C., 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal Food Microbiology**, v.79, p. 3-16, 2002.
- 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.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 163-171, 2002.
- SALAMANO, R.; BRASELLI, A.; HOPPE, A. et al. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**. v. 63, n. 4, p. 1063-1069, 2005.
- SANTOS, A. P.; PUCCI, A. A.; MOTA, D. M. L. et al. Descrição do processo de fabricação artesanal do queijo serrano. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 93-113.
- SANTANA, E. H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Estafilococos: morfologias das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

- 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.
- SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; de HAAS, J. et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the State of an Art. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.
- SHEEHAN, J.J., WILKINSON, M.G., MCSWEENEY P.L.H. Influence of processing and ripening parameters on starter, non starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. **International Dairy Journal**, v. 18, 905-917, 2008.
- SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.
- SILVA, L. H. G.; MONTEIRO, A. A.; BELOTI, V. Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em Estafilococos isolados de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 26, n. 3, p. 381-386, 2005.
- SILVA, J. F.Q.; FILIZOLA, L. R. S.; MAIA, M. M. D. et al. Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico-sanitários de queijo Prato comercializados em supermercados e feiras livres de Recife-PE, Brasil. **Medicina Veterinária**. v. 1, n. 2, p. 21-25, 2007.
- SILVA, R.A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012.
- SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; et al. Antimicrobial Activity The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. **Food Technology. Biotechnology**. v. 48, n. 3, p. 296–307, 2010.
- TAMANINI, R. ; BATTAGLINI, A. P. P. ; SILVA, L. C. C. Bactérias ácido lácticas com ação antagonista a *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru colhidas na região agreste de Pernambuco. In: IV Encontro de Pesquisadores em Mastites, 2007, Botucatu. **Anais**, IV Encontro de Pesquisadores em Mastites, 2007. p. 107-107. 2007.
- VAN DE GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C. et al. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 82, p. 187-216, 2002.
- VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de substancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**. v. 36, n. 1, 2009.
- 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.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a microbiota do queijo artesanal Serrano catarinense quanto ao seu potencial antagonista e tecnológico para o desenvolvimento de fermentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se as condições higiênico sanitárias de processamento estão de acordo com os padrões determinados pela legislação para queijos de média umidade;
- Pesquisar a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. e quantificar *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e *Escherichia coli* no queijo artesanal Serrano;
- Isolar e quantificar as bactérias ácido lácticas presentes no queijo artesanal Serrano produzido no município de Lages – SC;
- Estudar a diversidade molecular e o posicionamento taxonômico de bactérias ácido lácticas autóctones isoladas do queijo artesanal Serrano;
- Verificar a atividade antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas do queijo artesanal Serrano em relação a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Thyphimurium., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Identificar as características tecnológicas de cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* isolados das amostras de queijo artesanal Serrano analisadas.

3 ARTIGO 1: PERFIL MOLECULAR DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA AUTÓCTONE ISOLADA DE QUEIJOS ARTESANAIS SERRANO CATARINENSE, BRASIL

3.1 RESUMO: O queijo artesanal Serrano é um produto elaborado com leite cru integral de vacas na região serrana de Santa Catarina. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar geneticamente a microbiota láctica presente neste queijo. Para estudar o perfil molecular das 543 bactérias da microbiota láctica isoladas de 20 amostras de queijos artesanais Serrano, usou-se a técnica de RFLP-PCR-ITS. Identificou-se uma microbiota heterogênea, formada pelos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*. A distribuição destes quatro gêneros foi variável entre as amostras de queijos estudadas.

Palavras-chaves: Diversidade microbiana. *Lactococcus*. *Lactobacillus*. *Leuconostoc*. *Enterococcus*. RFLP PCR-ITS.

3.2 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal Serrano Catarinense representa a cultura e a gastronomia legadas pelos primeiros colonizadores da região serrana do estado de Santa Catarina, cuja produção é rudimentar, mas com sabor característico. Trata-se de uma receita sem muita tecnologia, constituindo uma prática repassada de geração a geração sem sofrer grandes transformações (SANTOS et al., 2011).

O queijo artesanal Serrano Catarinense, como outros queijos artesanais produzidos em outras localidades, utiliza leite cru integral de vacas na sua elaboração, adicionado apenas de coalho e sal. É um produto curado, que apresenta o interior macio de sabor láctico e levemente picante, com uma casca amarela e firme, classificado como de média umidade (IDE; BENEDET, 2001). Esses queijos apresentam aroma e sabor peculiares devido à biodiversidade das bactérias ácido lácticas autóctones presentes na matéria prima (FRANCIOSI et al., 2009).

Bactérias ácido lácticas (BAL) são micro-organismos envolvidos na formação de sabor e aromas de uma grande variedade de queijos elaborados com leite cru, e sua atividade durante a fabricação e a maturação do queijo já está bem definida (BERESFORD et al., 2001).

A identificação da microbiota própria do leite utilizado na elaboração de queijos, ou dos próprios queijos artesanais produzidos em cada região do Brasil,

possibilitará manter as características sensoriais típicas que os diferenciam, e ainda fornecer uma identidade a este produto, que futuramente poderá ter sua denominação de origem reconhecida, como o queijo Serra da Canastra (IMA, 2013).

O estudo da diversidade microbiana dos produtos artesanais tem sido realizado com o auxílio de técnicas moleculares independentemente do cultivo do micro-organismo como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (SILVA et al., 2012). A amplificação de regiões específicas do genoma por meio de iniciadores permite a identificação de gêneros e espécies, garantindo maior rapidez nos resultados de estudos sobre diversidade de micro-organismos (GIANNINO et al., 2009).

Entre os métodos moleculares existentes, os mais utilizados são baseados na determinação de marcadores genéticos de DNA. Estas técnicas são aplicadas em estudos ecológicos microbianos, sendo baseadas na detecção de diferenças que ocorrem no DNA/RNA, já que estas diferenças não estão influenciadas pelo estado fisiológico das células e permanecem constantes durante o desenvolvimento das mesmas. Estas técnicas têm sido utilizadas para investigar bactérias específicas e estudar a diversidade de populações em diferentes nichos bacterianos, incluindo o leite e produtos lácteos (GIRAFFA; NEVIANI, 2000).

Vários autores têm usado técnicas moleculares com bastante sucesso, rapidez e facilidade para identificar, em nível de subespécies e biovariantes, BAL isoladas de produtos lácteos (MANCINI et al., 2012; BULUT et al., 2005; GIRAFFA et al., 2003; MARINO et al., 2003; BERESFORD et al., 2001). Métodos baseados em PCR, como o polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados e tratados com enzimas de restrição (*RFLP-fragment length polymorphism*) é considerado importante para a caracterização de cepas específicas de BAL (MOHANIA et al., 2008).

A sequência do gene 16S DNAr pelo conceito atual de taxonomia permite definir o posicionamento taxonômico de bactérias em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie (GARRITY; HOLT, 2001).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar a microbiota láctica em queijo artesanal Serrano, isolando e identificando as espécies componentes da microbiota autóctone de amostras de queijo artesanal Serrano, buscando definir os principais grupos taxonômicos utilizando a técnica de RFLP PCR- ITS.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados neste estudo 20 queijos Artesanais Serranos, adquiridos aleatoriamente em diferentes pontos de comercialização (mercados públicos, frutarias, armazéns) no município de Lages – SC, entre dezembro e fevereiro de 2012. As amostras foram identificadas (hora/dia/local), acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina, onde foram realizadas as análises.

3.3.1 Preparação das Amostras

Foram pesadas 25 g de cada amostra de queijo assepticamente em sacos plásticos esterilizados, e posteriormente homogeneizados com 225 mL de caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS Broth - Inmedia) durante 2 min em Stomacher® (ITR-model 1204), Diluições decimais foram preparadas em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para identificação da microbiota láctica.

Para estimar a população de bactérias ácido lácticas (BAL) em cada uma das amostras foram realizadas as diluições (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) em caldo MRS, que foram semeadas em placas Petrifilm™ AC (3M Company, St. Paul, MN, EUA), acondicionadas em jarras de anaerobiose com o gerador de microaerofilia e incubadas a 30°C por 72 horas, como descrito por Nero et al., (2006). As colônias de coloração vermelha foram enumeradas, e a contagem obtida multiplicando-se os resultados pelo inverso da diluição considerada. Os resultados foram expressos em UFC de BAL/g, com essas colônias também foram realizadas coloração de gram e catalase.

As colônias de bactérias ácido lácticas isoladas das placas com a maior diluição (10^{-5}) foram mantidas congeladas em caldo MRS glicerinado a -20° C até o momento dos testes de caracterização molecular.

3.3.2 Extração do DNA

Para a obtenção do DNA total das BAL, as estirpes bacterianas foram cultivadas em caldo MRS por 24 horas a 30° C em rotação orbital a 180 rpm.

Alíquotas de 1 mL de cultura foram transferidas para microtubos esterilizados, centrifugados por 5 min. a 5.000 g./4° C. O precipitado de células obtido foi submetido a uma lavagem com um volume de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), por centrifugação por 10 min. a 10.000 g./4° C. As células foram resuspendidas em 0,5 mL de tampão CTAB (10g CTAB, 5g PVPP, 50 ml Tris-HCL, 25 ml EDTA, 146,1 g NaCl 5M, para preparar 500mL), e homogeneizadas no vórtex, aquecidas por 20 min. a 80°C e resfriadas em banho de gelo. Acrescentou-se 1 µL de RNase (20 µg/mL) e incubou-se a 37° C/60 min. Foi adicionado 0,5 mL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitou-se no vórtex por aproximadamente 30 seg. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 10.000 g./4° C e os sobrenadantes coletados e transferidos para novos microtubos. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,6 partes (proporcional ao volume do sobrenadante coletado) de isopropanol e incubou-se por 60 min. a -20° C. Transcorrido o período de incubação, as amostras foram novamente centrifugadas por 30 min. a 14.000 g./4° C para precipitação do DNA. Os sobrenadantes foram desprezados e ao precipitado foi adicionado 100 µL de NaCl 5 M e 400 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão por 30 seg. e centrifugados por 10 min. a 14.000 g./4° C. Os precipitados obtidos foram lavados com solução de etanol 70 % em água (v/v) e secos por 60 min. à temperatura ambiente, sendo em seguida resuspendidos em 50 µL de água ultrapura estéril. Os extratos foram quantificados em espectrofotômetro Genesys 6 (Thermo Scientific) a 260 nm tiveram a pureza avaliada pela relação das absorbâncias D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ nm, e sua integridade observada após eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TBE.

3.3.3 RFLP PCR-ITS

A técnica de RFLP PCR- ITS foi baseada na digestão com enzimas de restrição de produtos de amplificação do gene 16 S rRNA dos isolados obtidos.

Para as análises de RFLP PCR-ITS, foram utilizados os fragmentos amplificados da região intergênica 16S-23S utilizando os oligonucleotídeos iniciadores pHr (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p23S ((HONEYCUTT et al., 1995), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico.

As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 50 µL contendo: 1,0 µL dNTPs (estoque com 1,5 mM de cada base); 5 µL tampão 10X

(10mM Tris-HCL pH 8,3); 3,34 μL MgCl_2 (20 mM); 1 μL de cada oligonucleotídeo pHr e do oligonucleotídeo p23S (20 pMol μL^{-1}); 2 μL DNA molde (50 ng/ μL); 0,2 μL Taq DNA polimerase (5 U/ μL) e 36,46 μL de H_2O ultrapura estéril. A mistura da reação foi submetida ao termociclador BIOER-TC-96-G-H(b) usando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação (30 seg. a 95°C), anelamento (1 min a 52°C) e extensão (2 min a 72°C); e um ciclo de extensão final a 72°C por 15 min; manutenção a 4°C.

Os produtos foram submetidos à eletroforese a 90 V em gel de agarose 1,0% em cuba horizontal com tampão TBE 1 X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução) por 60 min. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A visualização dos fragmentos amplificados, com aproximadamente 517 a 1018 pares de base, foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e foto documentada com equipamento de fotografia Loccus Biotecnologia.

Os produtos da reação foram tratados com as endonucleases *CfoI*, *TaqI* e *RsaI*. Foram realizadas 2 reações de restrição para caracterização de bandas polimórficas: reação 1- DNA amplificado mais endonucleases *CfoI* e *RsaI*; reação 2- DNA amplificado mais *TaqI*.

Os produtos da digestão pelas endonucleases (aproximadamente 220 a 517 pares de bases, foram submetidos à eletroforese a 60 V em gel de agarose 2,5% em cuba horizontal com tampão TBE 1 X (10,8 g de Tris-base, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução) por 90 min. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A visualização dos fragmentos foi realizada em transluminador de luz ultravioleta e documentada com equipamento de fotografia Loccus Biotecnologia.

3.3.4 Análises de Agrupamento e Análises Filogenéticas

O perfil das bandas no gel foi transformado em uma matriz binária, utilizando o conjunto de programas estatísticos NTSYS-pc versão 2.1 (Applied Biostatistics). As relações genéticas foram medidas através do coeficiente de Jaccard. A construção do dendograma de similaridade genética foi feita pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair – Group Method with Arithmetical Average)

3.3.5 Amplificação e Sequenciamento Gene 16S rRNA

A amplificação das sequências do gene 16S rRNA dos isolados foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores 27f e 1492r (GURTLER; STANISICH, 1996).

Para reação de PCR foram utilizadas 50 ng de DNA dos isolados, 1,5 μ L de cada iniciador (20 pmol μ L⁻¹), 1 μ L de dNTPs (2,5 mM de cada), 5 μ L de tampão 10x (10mM Tris-HCL pH 8,3), 2,2 μ L de MgCl₂ (50mM), 1,5 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura estéril para um volume final de 50 μ L. A termociclagem seguiu com uma etapa de desnaturação inicial (94° C, 2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (94° C, 1 min), anelamento (58° C, 1 min) e extensão (72° C, 2 min).

Após amplificação, alíquotas de 5 μ L dos produtos da PCR com 3 μ L do tampão de corrida foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídeo. As amostras que apresentaram uma banda no tamanho esperado (aproximadamente 1600 pares de base) foram purificadas para reação de sequenciamento.

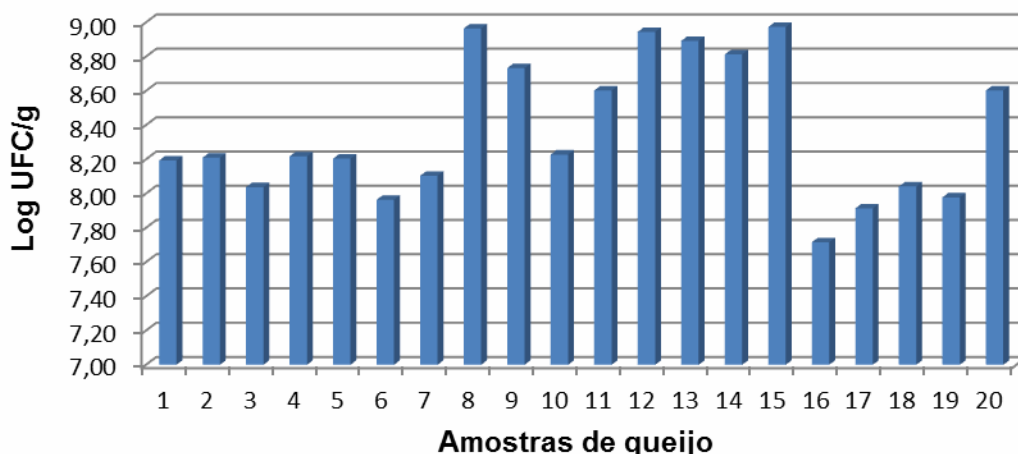
Os fragmentos da subunidade 16S rRNA amplificados pela reação de PCR foram purificados utilizando o kit HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT – (Roche). Foram sequenciadas 200 cepas representantes dos grupos obtidos no agrupamento pelo dendrograma. O sequenciamento direto foi realizado utilizando kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) com os primers internos (27f e 1492r), no 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), de acordo com o fabricante. As sequências obtidas foram examinadas com o PHRED software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) (ZHANG et al., 2009) para leitura das análises de qualidade do cromatograma. As sequências foram aceitas quando a qualidade das bases apresentaram se igual ou maiores que 20. O contig das sequências foram determinados usando CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>), e a identificação dos isolados foi obtida por comparação com as sequências depositadas no banco de dados do RDP utilizando a ferramenta classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp?timeout=true>) (WANG et al., 2007).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 755 isolados de BAL das 20 amostras de queijo artesanal Serrano catarinense utilizando placas de Petrifilm. Estes isolados apresentaram-se negativos na prova da catalase, Gram positivos e de morfologia cocoíde e bacilar. Do total de isolados obtidos, somente 543 foram recuperados após a criopreservação.

Os resultados mostraram que as contagens de BAL nas 20 amostras de queijo variaram de 7,72 LogUFC/g ($5,2 \times 10^7$ UFC/g) a 8,97 LogUFC/g ($9,4 \times 10^8$ UFC/g) (Figura 1) (Tabela 2 – anexos).

Figura 1a – Contagem total (Log UFC/g) de Bactérias Ácido Láticas em amostras de queijos artesanal Serrano Catarinense, produzidas no município de Lages/SC.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Os resultados obtidos mostraram uma microbiota heterogênea, com 4 linhagens diferentes de bactérias que foram sequenciadas e identificadas como pertencentes ao grupo das BAL. O sequenciamento das 200 cepas com representantes dos 4 perfis identificados no dendrograma identificou 268 (49,3%) cepas que foram classificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, 208 (38,3%) cepas como *Lactococcus*, 34 (6,3%) cepas como *Leuconostoc* e 33 (6,1%) cepas como *Enterococcus* (Figura 4). Estes gêneros de BAL têm sido identificados em leites crus como microbiota predominante na Argélia (BADIS et al., 2004), Itália (FRANCIOSI et al., 2009), Marrocos (KHEDID et al., 2006) e em queijos Itália (SUZZI et al., 2000), Romênia (ZAMFIR et al., 2006), Brasil (LIMA et al., 2009),

Espanha (NIETO-ARRIBAS et al., 2009, 2009a, 2010), Servia (JOKOVIC et al., 2011).

BAL predominante na microbiota do queijo Serrano foi o gênero *Lactobacillus*. A presença desse micro-organismo é comum em produtos derivados de leite, sendo importante na qualidade sensorial (SILVA et al., 2012). *Lactobacillus* podem fazer parte de fermentos lácticos com cultivos adjuntos, já que não contribuem diretamente com a acidificação da massa, mas exercem importante papel no desenvolvimento de sabor e aroma ao queijo (ONG et al., 2007). O gênero *Lactococcus* foi o segundo mais predominante, sendo a espécie *Lactococcus lactis* indicada como cultivo iniciador por sua capacidade de baixar o pH do leite usado na elaboração de queijo, através da produção de ácido láctico. O desenvolvimento de *Lactococcus lactis* no leite proporciona ótimas condições para a formação de coágulo, previne a multiplicação de bactérias patogênicas, desenvolve condições bioquímicas ideais para a maturação e participa da textura e do sabor do queijo (SILVA et al., 2012). *Leuconostoc* foram encontrados na proporção de 6,3% (34) em relação a microbiota total. *Leuconostoc* são conhecidos por seu baixo desenvolvimento no leite, são empregados na composição de fermentos junto com outras BAL, ajudam na produção de aroma e sabor. A espécie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* tem sido caracterizada como produtora de dextrano e outros exopolissacarídeos, que contribuem para a textura do queijo, uma importante característica deste gênero de BAL (PARENTE; COGAN, 2004; RUAS-MADIERO et al. , 2002).

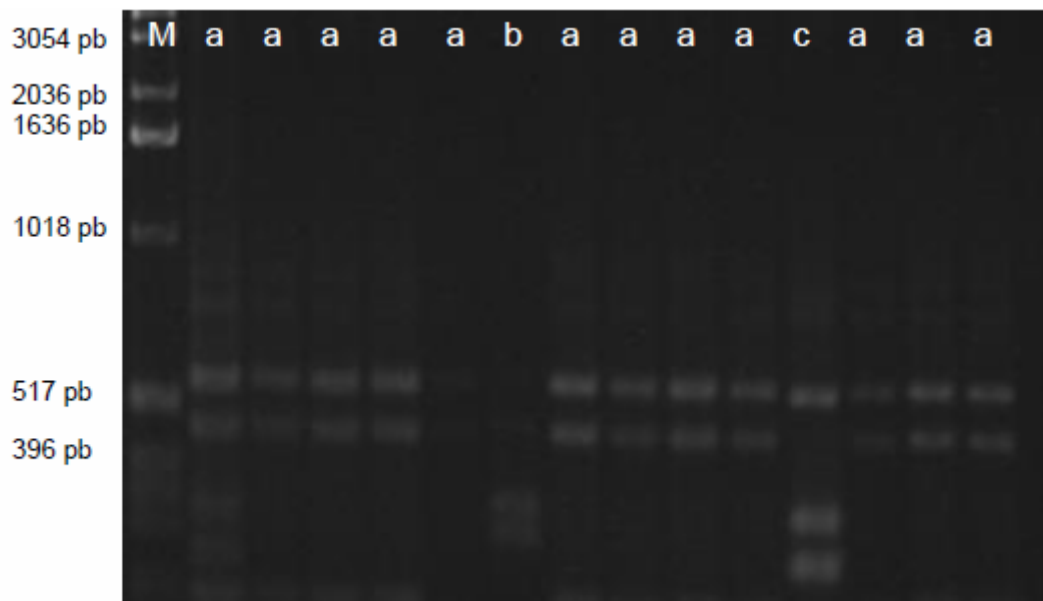
Serhan et al., (2009) avaliando as BAL presentes no queijo Darfiyeh, produzido na Líbia com leite cru de cabra encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, com a ocorrência dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Randazzo et al., (2010) estudando, na Itália a diversidade da microbiota em queijos Pecorino Crotonese produzido com leite cru de cabras com a técnica de RFLP, encontraram a predominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. Nieto-Arribas et al., (2009a, 2009, 2010), estudando a microbiota láctica do queijo Manchego na Espanha, isolou e caracterizou geneticamente por diferentes técnicas de PCR os gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Silva et al., (2012) diferenciaram pela PCR a microbiota do queijo coalho em Pernambuco uma microbiota composta por *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Enterococcus foi identificado em 6,1% (33) dos isolados. *Enterococcus* não é um gênero considerado seguro, pois são relacionados as doenças infecciosas em seres humanos. Porém, Beresford et al., (2001) comentam que nos queijos da região do mediterrâneo, eles exercem forte e positivo efeito sobre o desenvolvimento de sabores e aromas.

A distribuição dos gêneros não foi homogênea entre as diferentes amostras de queijos (Figura 5). *Lactobacillus* foi identificada em 17 de 20 amostras, das quais 4 ocorreram em conjunto com *Enterococcus*, 8 em associação a *Leuconostoc*, e 12 ocorreram em conjunto a *Lactococcus*, além de 1 amostra onde esteve presente isoladamente, assim como, apenas uma amostra apresentou o gênero *Lactococcus*.

Entretanto, o fato de não ter sido encontrado determinados gêneros em algumas amostras do queijo estudado, não significa que ele não estivesse presente, pois, recuperou-se as BAL isoladas em Petrifilm™ na maior diluição, sendo assim, se estivessem em baixas contagens a detecção pode não ter sido possível nas diluições utilizadas.

Figura 2a – Perfis de RFLP PCR-ITS obtidos de bactérias ácido lácticas isoladas de diferentes amostras de queijo Serrano. Após eletroforese em gel de agarose 2%: (a) *Enterococcus* spp., (b) *Lactococcus* spp., (c) *Lactobacillus* spp., (M) marcador molecular.



Fonte: o autor (2014).

Figura 3a – Dendograma de similaridade genética das cepas de BAL isoladas do queijo artesanal Serrano, agrupadas por RFLP PCR-ITS.

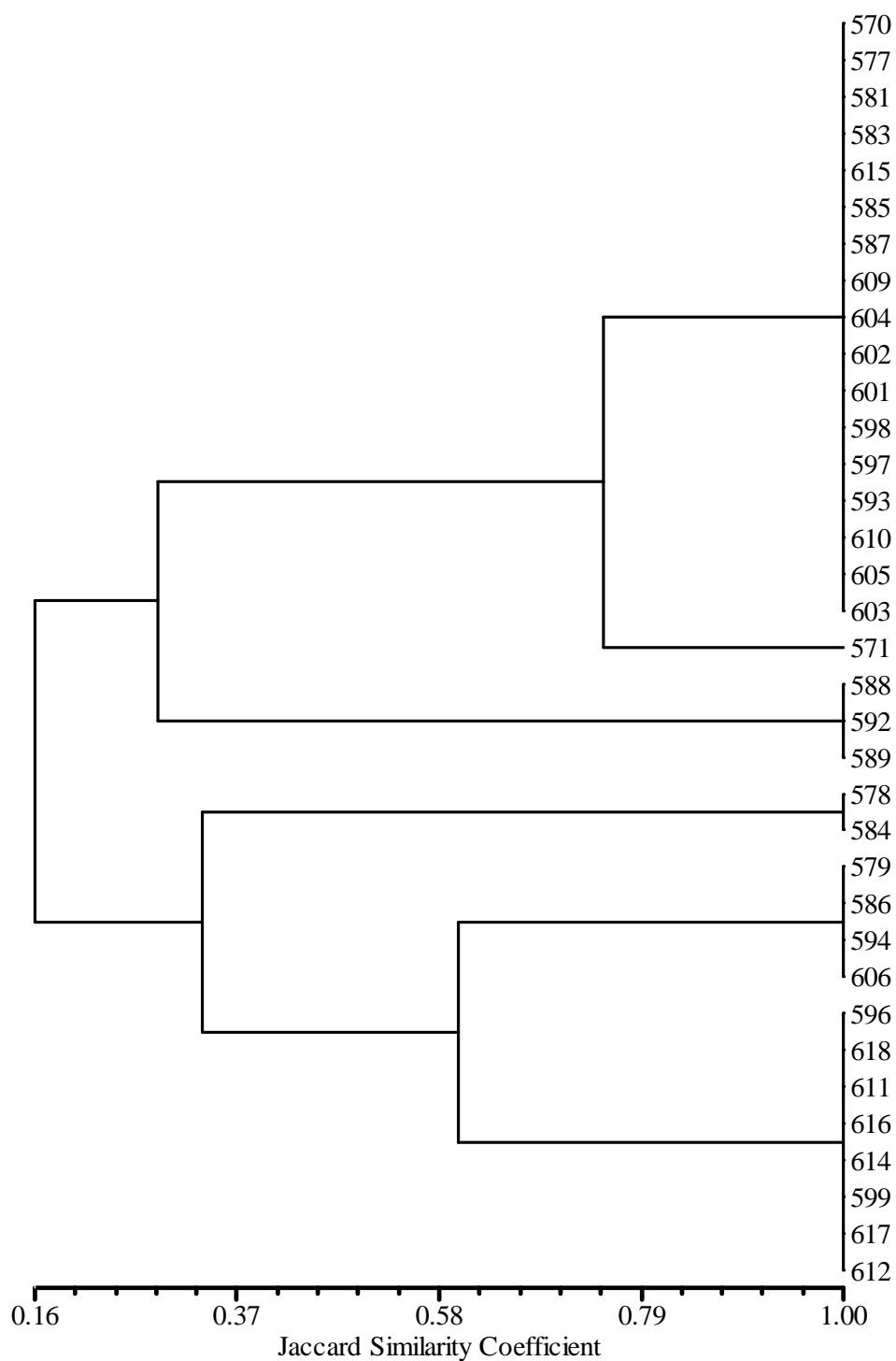
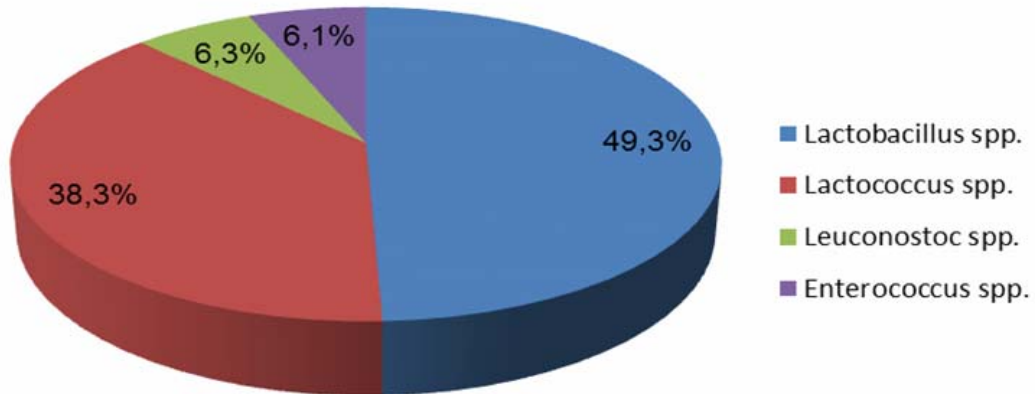
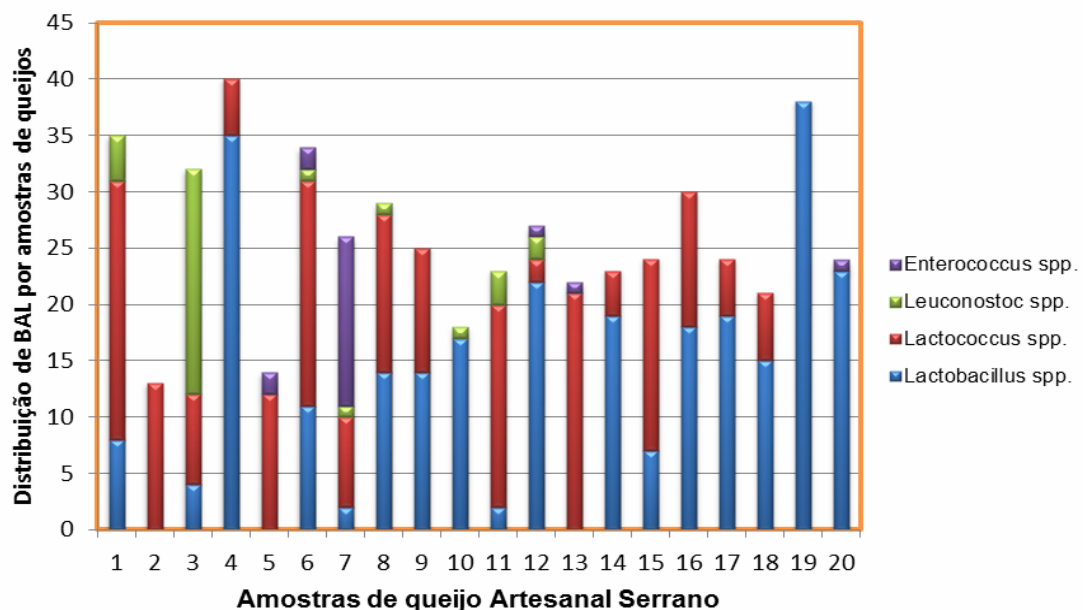


Figura 4a – Distribuição por gêneros dos 543 isolados de Bactérias Ácido Láticas isoladas de 20 amostras de queijo artesanal Serrano colhidas em pontos de comércio no município de Lages/SC e identificados por sequenciamento do gene 16S RNAr.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Figura 5a – Composição da microbiota de Bactérias Ácido Láticas, identificadas por sequenciamento em 20 amostras de queijo artesanal Serrano colhidas em pontos de comércio no município de Lages/SC identificadas por sequenciamento do gene 16S RNAr.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

3.5 CONCLUSÃO

O gênero isolado e identificado geneticamente com maior frequência no queijo artesanal Serrano foi *Lactobacillus* spp. Os demais gêneros identificados foram *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* caracterizando uma microbiota em

comum, porém, com distribuição variável nas diferentes amostras de queijos avaliadas. A presença destas BAL influenciam nas características organolépticas deste queijo, e podem fazer parte de um futuro fermento láctico a ser utilizado na produção de queijos com leite pasteurizado, atendendo as exigências da legislação vigente e mantendo as características do produto. Foram isolados três grupos de BAL com potencial para compor um fermento láctico, *Lactococcus* spp. como cultivo iniciador por seu caráter acidificante, e *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp. como cultivo adjunto por suas característica de produzir sabor e aroma a queijos.

3.6 AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Paraná; ao Laboratório de Biologia Molecular – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (UEL) - Paraná; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela aprovação e financiamento deste estudo; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Laboratório de Virologia Animal (UEL), .

3.7 REFERÊNCIAS

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

BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA-BOUDJEMAA, B. et al. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v. 21, p. 343-349, 2004.

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, p. 19-24, 2005.

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

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: GARRITY, G. M.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. **The road map to the Manual**. 2 ed New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2001. p.119-154.

GIANNINO, M.L.; MARZOTTO, M.; DELLAGLIO, F. et al. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. **International Journal Food Microbiology**, v.130, p.188-195, 2009.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. Molecular identification and characterization of food associated lactobacilli. **Italian Journal Food Science**, v. 4, p. 403–423, 2000.

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

GURTLER, V.; STANISICH, V. A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**. 142:3-16, 1996.

HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v.141, p.3229-3239, 1995.

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

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Estabelece Diretrizes para a Produção do Queijo Minas Artesanal. Portaria no 1305, de 30/04/2013. **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**. 2013.

JOKOVIC, N.; VUKASINOVIC, M.; VELJOVIC, K. et al. Characterization of non-starter lactic acid bacteria in traditionally produced home-made radan cheese during ripening. **Archives of Biological Science**, v. 63, n. 1, p. 1-10, 2011.

KHEDID, K., FAID, M., MOKHTARI, A., et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the humped camel milk produced in Morocco. **Microbiological Research**, v. 164, p. 81–91, 2006.

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.

MANCINI, A.; LAZZI, C.; BERNINI, V. et al. Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. **Journal of Microbiological methods**, v. 91, n. 3, p. 380-390, 2012.

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

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F. et al. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L.; ELSAS, J.D.V.; BRUIN, F.J.D . (Ed.). *Molecular microbial ecology manual*. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, p.1-8, 1995.

- MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v. 9, p. 190-198, 2008.
- NERO, L. A. ; BELOTI, V. ; BARROS, M. A. F. et al. Comparison of Petrifilm Aerobic Count Plates and Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 14, p. 249-257, 2006.
- NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J.M.; SESEÑA, S. et al. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092–1098, 2009a.
- NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, p. 1505-1517, 2009.
- NIETO-ARRIBAS, P; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. **Food Microbiology**, v. 27, p. 85-93, 2010.
- ONG, L. HENRIKSSON, A., SHAH, N.P. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 67-78. 2007.
- PARENTE, E.; COGAN, T.M.,. Starter cultures: general aspects. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M. et al. ed. Cheese, chemistry, physics and microbiology, general aspects. **Elsevier Academic Press**, vol. 1, p. 123-147, 2004.
- RANDAZZO, C. L.; PITINO, I.; RIBBERA, A. et al. Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology**, v. 27, p. 363-374, 2010.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 163-171, 2002.
- SANTOS, A. P.; PUCCI, A. A.; MOTA, D. M. L. et al. Descrição do processo de fabricação artesanal do queijo serrano. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 93-113.
- SERHAN, M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; BORGES, F. et al. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.*, v.26, p.645-652, 2009.
- SILVA, R.A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012.

SUZZI, G.; LOMBARDI, A.; LANORTE, M.T. Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino Cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. **Journal Applied Microbiology**, v. 89, p. 267-274, 2000.

ZAMFIR, M.; VANCANNEYT, M.; LAFTERIS, M. et al. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 487-495, 2006.

ZHANG, Z.Y.; LIU, C.; ZHU, Y. Z. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 15, p. 5020-5021, 2009.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. et al . Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

4 ARTIGO 2: ANTAGONISTIC ACTIVITY OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM SERRANO CHEESE

POTENCIAL ANTAGÔNICO DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA AUTOCTONE DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE

4.1 ABSTRACT: The *Serrano* cheese is a farm-made variety of cheese, which is manufactured from raw milk and widely consumed in the southern region of Brazil. This study aimed to evaluate the microbiological quality of 20 samples of the *Serrano* cheese and the antagonistic activity from 543 strains of lactic acid bacteria (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* and *Salmonella* *Leuconostoc* spp.) against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Thyphimurium*. From de cheese samples, *Listeria monocytogenes* and positive coagulase *Staphylococcus* were isolated in 3 and 7 samples, respectively. The 11 samples were outside the standard from *Escherichia coli*. *Salmonella* spp. was not isolated from any sample. *Lactobacillus* spp. (76,5%) and *Leuconostoc* spp. (90%) have presented the higher antagonism activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, respectively, while the *Enterococcus* spp. showed its better antagonistic activity 87,8% and 65% respectively against *Escherichia coli* and *Salmonella* *Thyphimurium*.

4.2 INTRODUCTION

The *Serrano* cheese is made from raw milk of cow, produced mainly in small farms and is widely consumed among the population. In the highland region of Santa Catarina, Southern Brazil, the production of artisanal *Serrano* cheese is a very old practice. The microbiota of the *Serrano* cheese consists of desirable and undesirable microorganisms. The presence of desirable microorganisms contributes to the organoleptic characteristics, conservation and sanitary conditions of the product. The raw milk used to produce this type of cheese in rural areas may be a vehicle of various pathogens. The presence of undesirable microorganisms, spoilage or pathogenic microbes, may be related to contamination resulting from improper hygiene (Guedes Neto et al., 2004).

Researches about the autochthonous microbiota of artisanal cheeses from raw milk, conducted in other Brazilian regions (states of Minas Gerais, Sergipe, Santa Catarina, Sao Paulo, Bahia and Rio Grande do Norte), in the last decade, demonstrated that the products may be inappropriate for human consumption; the main microorganisms identified were *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*,

Escherichia coli and *Listeria monocytogenes* (Nassu et al., 2006; Rossi et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Santana et al., 2008.). These microorganisms contaminate milk through various routes as the dirty udder, the environment, utensils improperly sanitized and by the handlers. An example is the bacteria *Staphylococcus aureus*, which is a major cause of bovine mastitis and the most common agent responsible for outbreaks of food poisoning.

Staphylococcus spp. virulence is associated with the coagulase activity and the production of enterotoxins. However some strains classified as coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) have been reported as enterotoxins producers (Santana et al., 2006). *Listeria* is an environmental microorganism, whereas *E. coli* and *Salmonella* are from faecal origin and *Staphylococcus* are natural from human skin. The inadequate hygiene habits of farmers allow the food contamination by these microorganisms. Products contaminated with *Salmonella* may result in food-borne infections; salmonellosis is considered one of the most important causes of food-borne diseases in humans (Seixas et al., 2009). According to Jay et al. (2005), listeriosis is a particularly serious disease, which may cause meningitis, encephalitis, abortion, sepsis in newborns and immunocompromised adults, with 20-30% mortality rate.

Lactic Acid Bacteria (LAB) are a group of microorganisms represented by several genera that presented morphological, physiological and metabolic characteristics in common (Ramirez et al., 2011). These microorganisms are widely distributed in nature; they can ferment lactose and glucose, producing organic acids such as lactic acid. They are also producers of hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, acetaldehyde and antimicrobial substances of protein nature known as bacteriocins (Alvarado, 2009; Fernandez et al., 2002; Naidu et al., 1999; Lewus and Montville, 1991; Giraffa et al., 1997; Chioda et al., 2007; Lima et al., 2009). The accumulation of these substances in foods results in the antimicrobial activity of LAB. Bacteriocins and other products of LAB are implicated in the inhibition of pathogenic microorganisms as observed in studies performed on raw milk by Nero et al. (2006), Tamanini et al. (2007), Nero et al. (2008), Pires et al. (2008), Nero et al. (2009) and cheeses by Alexandre et al. (2002), Caridi et al. (2003), Guedes Neto et al. (2004), Chioda et al. (2006), Chioda et al. (2007).

The raw milk is good source of lactic acid bacteria (LAB) that can be used by dairy industries, especially because they are adapted to the climate and

conditions of the raw material (Alexandre et al., 2002). This autochthonous microbiota may contribute to the control of pathogens in foods during preparing and also during the cheese ripening, allowing the increase in the control and/or elimination of undesirable bacteria, hence providing food safety. The use of these LAB strains, and their metabolites produced, prevent the development of other microorganisms that negatively affect the food and the consumers indirectly, improving the shelf life of foods and human health (Vásquez et al., 2009).

This study aimed to identify the presence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., and quantify *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. populations in artisanal cheese Serrano Catarinense. Additionally verify the antagonist capacity of LAB isolated from this cheese, against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Thyphimurium, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

4.3 MATERIALS AND METHODS

Of the 20 cheese samples (identified as Q1 to Q20) were randomly collected from different locations of sale (market, greengrocer, warehouse) at Lages city in Santa Catarina/Brazil. The samples were identified (date, time and source) and stored at ice boxes until the processing. All analyses were performed at Laboratory of Animal Products Inspection (Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal-LIPOA) of Universidade Estadual de Londrina/PR/Brazil.

Aliquot of 25 g from each sample of cheese were used for microbiological analyses. The samples were homogenized with broth corresponding to each recommended methodology in (Stomacher® ITR-model 1204), then traditional agar isolation method was performed to identify expected microorganisms.

4.3.1 *Listeria monocytogenes*

The ISO 11290-1 (2004) method was performed for the detection of *Listeria monocytogenes*. An aliquot of 25 g cheese was added to 225mL Half-Fraser Broth (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) and the samples were homogenized, constituting the first selective enrichment, which was incubated at 30° C (+ / - 1 ° C) for 24 hours, after incubation, was inoculated 0.1 ml sample enriched in 10 mL of Fraser Broth and incubated at 35° C / 37° C for 48 hours. From the Half-

Fraser broth were grown a heave of culture on a plate of agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA) (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) and a heave agar Palcam (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil). This procedure was also performed with Fraser broth. Agar ALOA plates incubated at 37° C for 24 hours and agar Palcam at 35° C for 24/48 hours. 5 typical colony was selected and plated on TSA-YE agar plate for purification by 35-37° C for 24 hours. Was performed to confirm for Gram, hemolysis test, catalase, rhamnose and xylose fermentation and motility.

4.3.2 Coliforms and *Escherichia coli*

For quantification of total coliforms and *E.coli*, an aliquot of 25 g cheese was added to 225mL peptone water (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) and the samples were homogenized, 1ml of dilutions (10^1 , 10^3 e 10^5), of each sample, were inoculated in Petrifilm™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA) plate and incubated at 35°C for 48h. After incubation, gas-producing blue colonies were identified as *E. coli* and gas-producing red/blue colonies were considered as coliforms. The results were expressed in CFU/.

4.3.3 *Staphylococcus* spp.

For *Staphylococcus* spp. quantification, an aliquot of 25 g cheese was added to 225mL peptone water (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) and the samples were homogenized, 0.1 ml of dilutions (10^1 , 10^2 e 10^3), of each sample, were inoculated in Baird-Parker agar plate (Laborclin - Products Laboratory, Pinhais - PR, Brazil). The method was performed in duplicate to improve the accurate. The coagulase test (Coagu-plasma - Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) was performed to confirm coagulase positive *Staphylococcus*, according to the method of the American Public Health Association (APHA) (Lancette and Bennett, 2001).

4.3.4 *Salmonella* spp.

The ISO 6579 (2007) method modified was performed to isolate *Salmonella* spp. An aliquot of 25 g cheese was added to 225mL buffered peptone water (BPW) (Laborclin - Products for laboratory, Pinhais - PR, Brazil) and the samples were homogenized and incubated at 36-37° C (+ / - 1° C) for 18 to 20 hours corresponding to the pre-enrichment, 0.1 ml was transferred into culture tubes for BPW with 10 ml of Rappaport-Vassiliadis broth (RV) incubated at 41/42° C for 24 hours and, simultaneously, to 1 ml tubes with 10 ml of Tetrathionate broth (TT) incubated at 37° C for 24 h. After incubation of these were grown heave broth in Xylose lysine deoxycholate (XLD), Enteric Hectoen and *Salmonella* Chromogenic medium (SCA - Laborclin - Products Laboratory, Pinhais - PR, Brazil) agars were used for plate differentiation. The method was performed in duplicate and the plates were incubated at 35° C (+ / - 1° C) for 24 hours. Suspicious bacterial cultures were subjected to confirmation, using Kit for enterobacteria (Laborclin - Products Laboratory, Pinhais - PR, Brazil).

4.3.5 Latic Acid Bacteria (LAB)

A total of 543 strains, that were isolated from the same 20 samples of artisanal cheese Serrano Catarinense, were used to ascertain the bacteria antagonism. The taxonomic positioning of LAB isolates through 16 rRNA sequence analysis indicate that 268 as *Lactobacillus* spp, 208 as *Lactococcus* spp., 34 as *Leuconostoc* spp. and 33 as *Enterococcus* spp.

4.3.6 Evaluation of *In Vitro* Antagonism

Spot-on-the-lawn assay with minor modification was performed to evaluate the bacteria antagonism (LEWUS; MONTIVILLE, 1991).

The autochthonous LAB isolated from cheese samples were inoculated punctually in eight plates of PCA (Plate Count Agar), 8 colonies of each plate were isolated and incubated at 30° C for 48 hours. The antagonism was evaluated in relation to *L. monocytogenes* (ATCC 7644), coliforms, *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* Thyphymurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 12598). After growing the plates, 7 ml (concentration 1.5×10^8 CFU / ml, 0.5 Mc Farland's range) of a layer containing the pathogen was mixed in the plate.

After overlay solidification, the plates were incubated at 30°C for *L. monocytogenes* and at 35° C for *Escherichia coli*, *Salmonella* Thyphimurium, *Staphylococcus aureus* for 48 hours. Colonies presenting a translucent halo in the MRS agar upper-layer were considered antagonistic. This halo is caused by growth inhibition of the pathogen inoculated in the upper-layer. Well-defined halos (0,5 a 1 cm) were classified as a result of complete inhibition while diffused halos (<0,5 mm) were classified as partial inhibition (NERO et al., 2009).

4.4 RESULTS AND DISCUSSION

Listeria monocytogenes was isolated from 3 (15%) out of 20 samples of *Serrano* artisanal cheese samples (Q2, Q3 and Q16). According to Brazilian legislation (BRAZIL, 1996), which determinates the absence of this pathogen in 25 g of this food, these 3 samples were considered inappropriate for consumption. Zaffari et al. (2007) and Melo et al. (2013) also isolated *Listeria monocytogenes* in artisanal cheeses from Rio Grande do Sul and Santa Catarina, respectively. According to Zaffari et al. (2007) the presence of these bacteria in cheese demonstrates a lack of hygienic-sanitary procedures and unappropriate technology in cheese production.

In this study 17/20 (85%) *E. coli* positives samples have ranged between 5.0×10^1 CFU/g and 4.1×10^6 CFU/g. The Santa Catarina artisanal cheese is classified as medium moisture, and according to Brazilian legislation the maximum limit to Coliforms at 45°C or thermotolerant, in this type of cheese, is 500 CFU/g. The results showed that 11/20 (55%) samples were outside the hygienic-sanitary limit. The presence of *E. coli* indicated fecal contamination, therefore this microorganism is an indicator of microbial food safety, and the fecal contamination indicates possible presence of other pathogens from fecal origin.

Observed 7/20 (35%) samples have showed above 10^5 CFU/g for *Staphylococcus* coagulase-positive, with an average of 1.13×10^6 CFU/g. This amount of CFU is considered sufficient, and being toxigenic to cause food poisoning (SANTANA et al., 2006). According to Brazilian legislation 146/1996 (BRAZIL, 1996), these samples are outside of the established standard (1×10^2 to 1×10^3 CFU/g). Several authors have reported high counts of *Staphylococcus* coagulase positive

cheeses marketed in Brazil (SALOTTI et al., 2006; MELO et al., 2008; SANTANA et al., 2008; ANTONELLO et al., 2012; ZOCHE et al., 2012).

Some species of coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) have been described as potential producers of enterotoxin *in vitro* (Santana et al., 2006). Considering this, 19 (95%) of 20 samples have presented above 10^5 CFU/g, this results could mean a lack of hygiene in the handling of the product.

In this present study, *Salmonella* spp. was not detected in the samples. Concerning this pathogen, the samples meets the Brazilian legislation (BRAZIL, 1996). Salotti et al. (2006), Melo et al. (2008) and Melo et al. (2013) showed similar results in samples of artisanal cheeses from Jaboticabal/SP, Maranhão and Santa Catarina, respectively. However, Santana et al. (2008) and Antonello et al. (2012) isolated this pathogen in 26.7% and 17.85% of cheese samples from Sergipe and Paraná, respectively.

The antagonistic activity of the LAB 4 genera tested, against *Listeria monocytogenes* was demonstrated in 493/543 (90.7%) strains. 361/543 (66.5%) showed to be able to completely inhibit the pathogen *in vitro*, while 132/543 (24.2%) showed partial inhibition. In 4 genera the antagonism was classified as total type. *Lactobacillus* genus showed the highest total antagonism 205/268 (76.5%), followed by the genera *Enterococcus* spp. 24/33 (72.7%), *Leuconostoc* spp. 23/34 (65.7%) and *Lactococcus* spp. 110/208 (52.9%) (Figure1).

In 3 of the 20 cheeses Artisanal *Serrano* of which were collected strains of LAB tested in this study, *Listeria monocytogenes* was isolated, these cheeses noted the predominance of genera that showed less antagonism against this pathogen. In the Q2 sample cheese, 100% LAB of strains were identified as *Lactococcus* spp. In the Q3 sample was identified *Leuconostoc* spp in 62.5%, *Lactococcus* spp. in 25% and *Lactobacillus* spp in 12.5% of strains. In the Q16 sample *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp represented in 71% and 29% of the strains, respectively. This predominance of strains with less antagonistic potential in these cheeses may be related to presence of *Listeria monocytogenes* in these samples.

Similar results were demonstrated by Guerra and Bernardo (2001) in the Alentejo cheese, they showed that *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., and *Enterococcus* spp. presented antagonist profile against *Listeria monocytogenes*, while *Lactococcus* spp has not presented antagonism. Campo et al. (2008) also

identified strains of LAB with antagonism to *L. monocytogenes* in artisanal cheeses from Mexico.

Antagonism against *E. coli* observed in 509/543 (93.7%) LAB strains, 366/543 (62%) of LAB strains expressed total inhibition and 143/543 (17.1%) presented partial inhibition. The total inhibition in the 4 genera was predominated in this study. The *Enterococcus* spp. genus showed the highest total antagonism (29/33, 87.8%), followed by the genera *Leuconostoc* spp. (27/34, 79.4%), *Lactobacillus* spp. (186/268, 69.4%) and *Lactococcus* spp. (124/208, 59.6%) (Figure1).

Guedes-Neto et al. (2004) related antagonist activity of LAB (all strains of *Lactobacillus* spp.) isolated from “Coalho” of cheese against *L. monocytogenes* and *Escherichia coli*, however they related less antagonistic ability of *Lactococcus* spp. strains against these pathogens. Chioda et al. (2006, 2007) also observed potential antagonistic of *Lactobacillus* spp. against *L. monocytogenes* and *E. coli*, respectively.

Antagonism against *Staphylococcus aureus* was showed in 449/543 (82.7 %) of the LAB strains, while 337/543 (62 %) of LAB strains expressed total inhibition, only 113/543 (20.8%) presented partial inhibition. The total inhibition of *S. aureus* in the 4 genera was predominated in this study. *Leuconostoc* spp. showed the highest total antagonism 31/34 (90 %) followed by *Enterococcus* 24/34 (70.5%), *Lactobacillus* 180/268 (67 %) and *Lactococcus* 102/208 (49%) (Figure 1).

The presence of *Leuconostoc* spp. isolated in the cheese samples represented only 6.07% of LAB isolates, this may explain the high count of *Staphylococcus* spp., additionally the expression and production of antagonistic substances may be different *in vivo* and *in vitro*. Guedes-Neto et al. (2005) demonstrated that the inhibitory effect of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus* spp. reached 100%, and the strains of *Lactococcus* spp. showed the lowest antagonism for this microorganism.

Antagonism for *Salmonella* Thyphymurium was showed in 459/543 (84.5%) of the LAB strains, while 267/543 (49.2%) of LAB strains expressed partial inhibition, only 192/543 (35.4%) presented total inhibition. The total inhibition of *Salmonella* Thyphymurium was often presented in the *Enterococcus* e *Leuconostoc* genera. *Enterococcus* spp. showed the highest total antagonism (65%), followed by

the genera *Leuconostoc* spp. 19/34 (54%), *Lactobacillus* spp. 103/268 (38%) and *Lactococcus* spp. 49/208 (24%) (Figure 1).

The identification of *Enterococcus* spp. may indicate biosecurity in foods, however this hypothesis is contested, because the presence of these bacteria may cause variation in the preservation of food, additionally they are indicators of faecal contamination (FRANCO; LANDGRAF, 2003). According to Lima et al. (2009) the presence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in cheese is an alert to the hygienic conditions during the development of artisanal products.

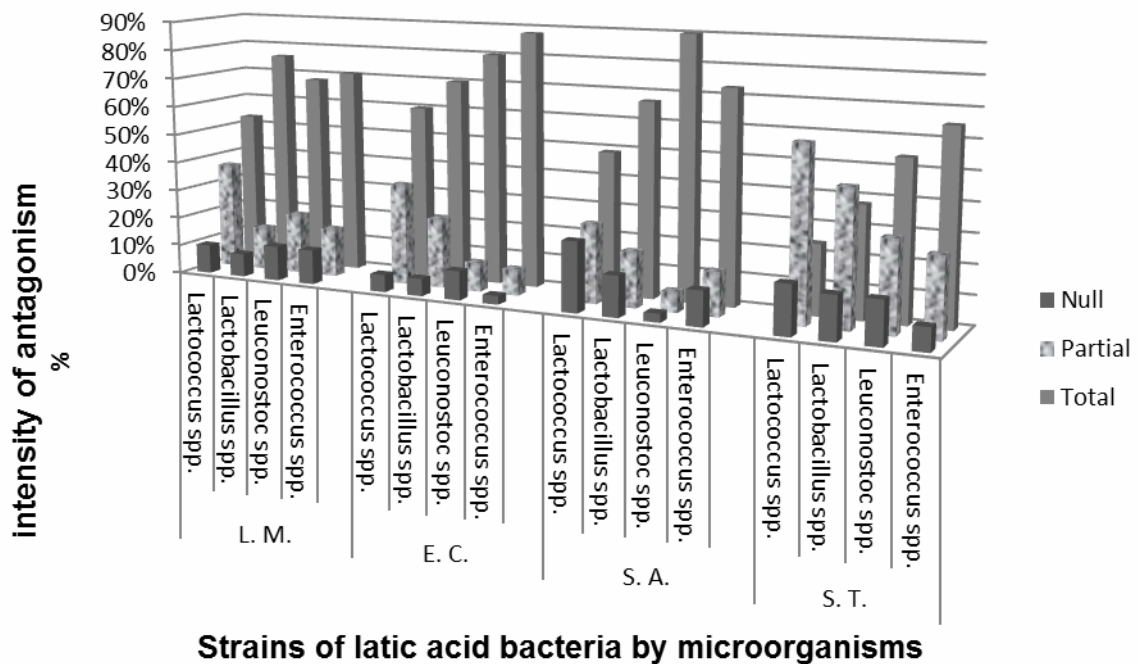
Alexandre et al. (2002) related that the isolated LAB in artisanal Minas do Serro cheese presented antagonism against *Salmonella* spp. (83.3%) and *Staphylococcus* spp (56.2%). Campo et al. (2008) observed similar results in antagonist activity for *Staphylococcus aureus* in relation to LAB, however the growth inhibition of *Salmonella agona* were not observed. In this study, the low number of strains of LAB with a total capacity antagonist for *Salmonella* spp., in relation with other three microorganisms, coincides with the antagonism cited by Campo et al. (2008). The reduced bacteriocins action against Gram-negative bacteria may explain in part the lowest antagonistic activity. However *Escherichia coli* is also a Gram-negative bacterium and the antagonism for this pathogen was more expressive, although others bacteriological mechanisms may be involved. Further studies are needed to clarify this hypothesis.

Three genera predominated with total antagonism in this study, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Enterococcus* spp. but due to inconsistency in the use of *Enterococcus* as biopreservatives bacteria in the food industry this would not be the most suitable in starter culture. However, while the antagonism *Enterococcus* spp. presents to be the best, the genus was also observed high antagonistic activity, so *Leuconostoc* spp. may be indicated to starter culture with inhibitory function to pathogens along with *Lactobacillus* spp. studied.

The potential antagonist of LAB against undesirable microorganisms in foods has been described in several studies, the findings of this research show the LAB ability to control or destroy undesirable microorganisms. The identification of new autochthonous strains corroborates to produce safe food, additionally with ability to maintain quality throughout over time in the trade. Prospects for the application of LAB or production of bacteriocins in the food industry are promising, due to the interest of consumer of using biological conservatives and the interest of industries of

using these substances as a relatively economical biotechnology (CAMPO et al. 2008).

Figure 1b – Lactic acid bacteria antagonism intensity against pathogenic bacteria as determined by the relative inhibition on growth in spot-on-the-lawn assay



4.5 CONCLUSION

All samples showed the presence or count some kind of microorganisms, *Listeria monocytogenes* was identified in three samples of the cheese, *Staphylococcus* positive coagulase in seven samples and 11 samples presented counts above the established by the legislation for the *Escherichia coli*. *Salmonella* spp. was not isolated in any of the samples analyzed. Indicating risk to consumers. With the exception of *Salmonella* sp., which was not isolated in any of the samples analyzed. The genus *Lactobacillus* spp. showed higher antagonism against *Listeria monocytogenes*, the *Leuconostoc* spp. against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. against *Escherichia coli* and *Salmonella* Thyphymurium. The antagonistic activity of *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. are especially welcome, because these generous are potential starter cultures for dairy products by collaborating with their microbiological safety.

4.6 REFERENCES

- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo – de – minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 54, n. 4, 2002.
- ALVARADO, C.C. R.; DÍAZ, C.G. Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. **Revista de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes**. v. 51, n.1, p. 8-14, 2009.
- ANTONELLO, L.; KUPKOVSKI, A.; BRAVO, C. C. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. **Revista Thema**. v. 9, n. 1, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. p. 3977 - 3978. 1996.
- CARIDI, A.; MICARI, P.; CAPARRA, P. et al. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physic-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 191-200, 2003.
- CAMPO, C. I. M. del; GÓMEZ, H. E.; ALANIZ, R. de la O. Bacteria ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. **E-Gnosis**. v. 6, art. 5, 2008.
- CHIODA, T. M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R. et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p.121-124, 2006.
- CHIODA, T. M.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* em Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**. v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.
- FERNANDEZ, M.F.; BORIS, S.; BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal Applied Microbiology**. v. 94, p. 449-455, 2002.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 182p.
- GIRAFFA, G.; CARMINATTI, D.; NEVANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potencial technological use. **Journal Food Protection**. v. 60, p. 732-738, 1997.
- GUEDES NETO, L. G.; VELOSO, F. P.; PAIVA, R. M. B., et al. Qualidade físico-química e microbiológica de queijos produzidos no Brasil – Revisão. In: Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. **Anais**. v. 59, n. 339, p.233-236, 2004.

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 96, 65-69, 2001.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – **Horizontal Method for the detection of Salmonella spp.**, 4 ed. 2002. The International Organization for Standardization, amendment 1: 15/07/2007.

ISO 11290-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs – **Horizontal Method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 2: Enumeration Method**, 1 ed. 1998. The International Organization for Standardization, Amendment 1:15/10/2004.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. Y.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. Springer, NY, USA. 2005, 790pp.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P. and K. ITO (ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 de. American Public Health Association, Washington, D.C., 2001. Chapter 39, p. 387-403.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam. v.13, n.2, p.145-150, 1991.

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.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo minas padrão comercializado na cidade de São Luiz, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 7, n. 4, p. 547-551, 2009.

MELO, F. D.; DALMINA, K. A.; PEREIRA, M. N. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, 2013.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews Food Science Nutrition**. v. 38, p. 13-126, 1999.

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.

NERO, L. A. ; BELOTI, V. ; BARROS, M. A. F. et al. Comparison of Petrifilm Aerobic Count Plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of Lactic Acid Bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 14, p. 249-257, 2006.

NERO, L. A.; De MATTOS, M.; BARROS, M. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 299-305. 2008.

NERO, L.A.; De MATTOS, M.; BARROS, M. A.; BELOTI, V. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**, v. 164, p. 529-535, 2009.

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.

PIRES, E. M. F. ; TAMANINI, R. ; ANGELA, H. L. et al. Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus Aureus* isoladas de leite cru produzido na região agreste de Pernambuco. In: III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008, Recife- PE. **Anais**, III Congresso Brasileiro de Qualidade do leite, 2008.

RAMÍREZ, J. C. R; ULLOA, P. R.; GONZALEZ, M. Y. V. et al. Bactérias Lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**. Año 2, n. 7, 2011.

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.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B. AMARAL, L.A. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**. v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANTANA, E. H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Estafilococos: morfologias das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

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.

SEIXAS, F. N.; FERRAZ, S. M. Qualidade microbiológica do queijo colonial produzido com leite não pasteurizado no município de Lages – SC, In: congresso estadual de medicina veterinária, 17, congresso estadual da anclivepa, 2, encontro de especialistas em pequenos ruminantes do conesul, 5, 2008, Gramado. **Anais**...Gramado, 2008.

TAMANINI, R. ; BATTAGLINI, A. P. P. ; SILVA, L. C. C. Bactérias ácido lácticas com ação antagonista a *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru colhidas na região agreste de Pernambuco. In: IV Encontro de Pesquisadores em Mastites,

2007, Botucatu. **Anais**, IV Encontro de Pesquisadores em Mastites, 2007. p. 107-107. 2007.

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de substancias antimicrobianas producidas por bacterias acido lácticas en la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**. v. 36, n. 1, 2009.

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.

ZOCHE, F.; BASTOS, C. P.; BASSANI, M. T. Estafilococos coagulase positiva em queijos minas frescal e minas padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de processamento de Alimentos**. v. 30, n. 1, p. 119-124, 2012.

5 ARTIGO 3: CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS DE *LACTOCOCCUS* AISLADAS DE QUESO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE (BRASIL)

CARACTERIÇÃO TECNOLÓGICA DE CEPAS DE *LACTOCOCCUS* ISOLADOS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE (BRASIL)

5.1 RESUMEN: Diecinueve cepas de *Lactococcus* aisladas del queso Artesanal Serrano elaborado con la leche cruda, fueron evaluadas para las actividades acidificante, proteolítica, autolítica, aminopeptidásica, producción de aminas biógenas, resistencia a la sal y a la temperatura. Las evaluaciones estadísticas enseñaron que las cepas Lc 23 (*Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*), Lc 26 (*Lactococcus* sp.), Lc 72 y Lc 74 (*Lactococcus lactis*) presentaron mejor performance. La cepa Lc 23 se destacó en tres características (acidificante, proteolítica y autolítica), la Lc 26 presentó mejor resultado para actividad proteolítica y autolítica, y las dos cepas de *Lactococcus lactis* presentaron mejores para la actividad aminopeptidásica, con valores más elevados para Leu-aminopeptidásica que desarrolla compuestos responsables por los sabores y aromas nos quesos durante la maduración. Estas cepas pueden hacer parte de la composición de cultivos iniciadores con contribución para las características sensoriales.

Palabras-clave: Queso serrano brasileño. Caracterización tecnológica. Cultivos iniciadores. Bacterias lácticas.

5.2 INTRODUCCIÓN

La producción artesanal del queso artesanal Serrano Catarinense en el municipio de Lages, Brasil es una práctica muy antigua, constituyendo éste parte de la dieta tradicional de la población. Este producto tradicional se elabora con leche cruda de vaca, sin la utilización de fermentos comerciales, y por tener un tiempo de maduración menor que 60 días, se encuentra alejado de la legislación brasileña, siendo su comercialización oficial prohibida hasta la fecha. Tiene como característica de presentación el interior de textura blanda y de sabor ácido, con casca amarilla (IDE; BENEDET, 2001). Los quesos con tiempo de maduración menor de 60 días deben ser elaborados con leche pasteurizada, todavía, cuando la leche pasa por tratamiento térmico hay una destrucción de la microbiota autóctona de la leche, y el queso no presenta características de sabor y aromas típico.

El uso de fermentos compuestos por cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas pueden ofrecer condiciones para que este alimento tenga

las características organolépticas iguales al artesanal, mismo con la utilización de la leche pasteurizada. La microbiota nativa parece ser el principal elemento capaz de producir las propiedades organolépticas de los quesos de leche cruda (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). El fermento láctico puede ser definido como una preparación microbiana conteniendo elevados números de células de un o más géneros y especies de BAL. La principal función es proporcionar una rápida acidificación durante el proceso fermentativo y así garantizar la seguridad del alimento, y también ayudar para o desarrollo de las características sensoriales deseadas (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Los géneros de BAL más comúnmente presentes en quesos hechos con leche cruda son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000).

Los *Lactococcus* son bacterias que poseen un metabolismo homofermentativo, asegurando la transformación de la lactosa residual en ácido láctico. Son las principales bacterias responsables por la acidificación de la leche (LOPEZ-DÍAZ et al., 2000). Además intervienen con su sistema proteolítico en la degradación de las caseínas, en particular debido a sus proteasas y peptidasas (MONNET et al., 1993; PRITCHARD y COOLBEAR, 1993). Siendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* las especies más utilizadas en la formulación de cultivos iniciadores para la elaboración de queso (CASALTA; MONTEL, 2008).

Para elegir las cepas para componer un cultivo iniciador es necesario identificar las características tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, por ejemplo, resistencia al sal, capacidad de acidificación, actividad proteolítica y peptidásica, y producción de aminas biógenas (DESMEAUEAUD; COGAN 1996; GARDINER et al. 1998; KIMARYO et al. 2000), con la finalidad de seleccionar aquellos con mayor potencial de aplicación en la industria (NIETO ARRIBAS et al., 2009).

El conocimiento detallado de la microbiota del queso artesanal Serrano Catarinense, juntamente con las informaciones ya obtenidas por otros expertos, sobre su naturaleza, características físico-químicas y tecnológicas de fabricación, permitirá también una mejor caracterización y tipificación del queso e incluso el registro de la Denominación de Origen Protegida, agregando valor y seguridad al producto.

Este trabajo tuvo como objetivo la identificación de la capacidad tecnológica de los *Lactococcus* aislados del queso artesanal Serrano, para una futura elaboración de cultivos iniciadores que puedan ser utilizados a nivel industrial para elaboración de productos lácteos, bien como la producción del queso Artesanal Serrano Catarinense preservando sus características tradicionales.

5.3 MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1 Microorganismos

Las 19 cepas de *Lactococcus* (Tabla 1) utilizadas en este estudio fueron anteriormente aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense e identificadas genéticamente, y hacen parte de la colección de BAL del Laboratorio de Inspección de Productos de Origen Animal de la Universidad Estadual de Londrina (Brasil). Las cepas de BAL aisladas fueron mantenidas congeladas en caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) glicerinado a -80° C hasta el momento de las analices de caracterización tecnológica.

Las caracterizaciones tecnológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha (España). Todas las analices fueron realizadas por triplicado.

Tabla 1b – Identificación de las 19 cepas de *Lactococcus* aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, evaluadas para las caracterizaciones tecnológicas.

Identificación	Bacteria Ácido Láctica
Lc 12	<i>Lactococcus lactis</i>
Lc 14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 16	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 17	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 18	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lc 24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 26	<i>Lactococcus</i> sp.
Lc 28	<i>Lactococcus garvieae</i>
Lc 29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 59	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Lc 72	<i>Lactococcus lactis</i>
Lc 74	<i>Lactococcus lactis</i>

5.3.2 Actividad Acidificante:

La determinación consistió en inocular el microorganismo a evaluar (1%) en 10 mL de leche desnatada estéril (Oxoid) e incubar a 30°C. La capacidad acidificante fue calculada como el Δ pH ocurrido durante la incubación (Δ pH= pH tras incubación – pH inicial de la leche), para lo que se efectuó una medida del pH antes de la inoculación, otra tras 6 h y otra tras 24 horas de incubación. Las medidas se realizaron con un pH metro (Crison pH metro Basic 20, Crison – Barcelona)(GARRIGA et al. 1996).

5.3.3 Actividad Proteolítica:

La cuantificación de la actividad proteolítica de los aislados fue realizada por el método espectrofotométrico descrito por Church et al. (1983) y modificado posteriormente en 1985 por los mismos autores. El método está basado en la reacción del o-phthaldialdehído (oPA) y el β -mercaptoetanol con las aminos, formando 1,2-inositol disustituido que absorbe a 340 nm.

Los resultados se expresaron como mmol glicina/L (mmol Gly/L), interpolando los valores de absorbancia en una curva de glicina de concentraciones comprendidas entre 0,1 mM y 10 mM.

5.3.4 Actividad Autolítica:

La capacidad autolítica de los aislados se determinó en cultivos crecidos hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en caldo MRS (D.O.660 = 0,7-0,8). Éstos se recogieron y lavaron por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C, resuspendiéndose las células en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,8 (D.O.660=0,6-0,7). Las suspensiones celulares en tampón se incubaron durante 4 horas a 30°C y se midió el descenso de densidad óptica a 660 nm cada 30 minutos en un lector de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). La capacidad autolítica se expresó según Lansgrud et al. (1987) como $100 - (A1/A2 \times 100)$, donde A1 y A2 son la mínima y máxima densidad celular, respectivamente, medidas durante la incubación.

5.3.5 Producción de Aminas Biógenas:

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas, fue ensayada utilizando el método cualitativo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). En éste se realizó una siembra en estría de la cepa objeto de estudio, en un agar que contiene los aminoácidos (L-tirosina (Sigma), L-histidina (Sigma), L-ornitina monohidrócloruro (Merck) o L-lisina monohidrócloruro (Merck) y el indicador del pH púrpura de bromocresol. La prueba fue considerada positiva si, tras la incubación, en el medio se produce un viraje del color amarillo a púrpura como consecuencia del aumento de pH producido por la descarboxilación del aminoácido. En el caso de la tirosina, por tratarse de un compuesto insoluble, se consideró que el ensayo fue positivo cuando alrededor de la estría desaparecen los cristales del aminoácido.

5.3.6 Actividad Aminopeptidásica:

La actividad aminopeptidásica de las cepas fue ensayada utilizando el método descrito por Requena et al. (1991) modificado por Arizcun et al. (1997). Se

evaluó la actividad aminopeptidásica para dos sustratos, L-lisina p-nitroanilida (Lys-pNA) y L-leucina p-nitroanilida (Leu-pNA) (Sigma-Aldrich Ltd).

El contenido de p-nitroanilida liberado se determinó mediante la medida de la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-530. Los resultados se expresaron en unidades de actividad aminopeptidásica (U), donde 1 U es el incremento de 0,001 unidades de absorbancia en un minuto.

5.3.7 Resistencia al NaCl:

Las cepas se inocularon por duplicado al 1% del inóculo en caldo MRS conteniendo concentraciones de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0% de NaCl y se incubaron durante 24 horas a 32°C en placas de microtitulación. Transcurrido este tiempo se midió la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). Los resultados se expresaron como el porcentaje de absorbancia alcanzada por los cultivos con respecto a la mostrada por los cultivos control en ausencia de NaCl (Sánchez et al., 2005).

5.3.8 Resistencia a la Temperatura:

La determinación de la resistencia a la temperatura se realizó inoculando cada cepa al 1% en caldo MRS, incubando a diferentes temperaturas 10, 15 y 20°C y midiendo la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). Los resultados se expresaron utilizando como control un cultivo incubado a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (30°C para los *Lactococcus*).

5.3.9 Análisis Estadísticos:

Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) usando el teste de Student-Newman-Keuls programa, IBM SPSS Statistics, versión 18.2 (SPSS Inc., Chicago, IL., EUA).

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los aislados para las actividades tecnológicas ensayadas. Los valores más elevados de actividad acidificante ($P < 0,05$) a las 6 horas se encontraron para las cepas Lc 23 con una baja de pH de 1,32 U seguido Lc 18 y Lc 16. A las 24 horas de incubación las cepas Lc 23 fue la que presentó la mayor reducción de pH 2,41U, acompañados de las cepas Lc 26, Lc 72 y Lc 17 con valores de pH bajando entre 2,31 y 2,37 U (Tabla2). Os resultados para acidificación a 6 horas enseñaron que la cepa Lc 23 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) fue la que presentó la mayor baja de pH, lo que difieren de Nieto-Arribas et al., (2009) en relación a la especie de *Lactococcus*, pues este autor observó que el *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* fue el que presentó menor capacidad de acidificación, pero a las 24 horas los resultados fueron similares. Todas las cepas tuvieron una gran baja de pH de 6 horas para 24 horas, esto es importante para que puedan hacer parte como cultivos iniciadores con la finalidad de acidificar la leche para producción de queso. De acuerdo con Bouton et al., (2002) observando el pH a las 24 horas, puede clasificar las cepas en tres grupos por su capacidad acidificante: 47,3% de las cepas con alta capacidad de acidificación, con reducción de pH de más de 2 unidades; 36,8% de las cepas con capacidad de acidificación intermediaria con decrecimientos de pH de 1 a 2 unidades y 15,7% de las cepas con baja capacidad de acidificación con pH debajo de 1 unidad.

Tabla 2b – Actividad acidificante, proteolítica y autolítica de las cepas de *Lactococcus* aislados de queso Serrano Catarinense observadas con pHmetro y densidad óptica.

Cepa	Actividad acidificante (ApH 6 h)		Actividad acidificante (ApH 24 h)		Actividad proteolítica (mmol Gly)		Actividad autolítica (%) ²	
	media	sd	media	sd	media	sd	media	sd
Lc 12	0,62 ^{e-h}	0,04	1,68 ^{de}	0,05	0,2 ^a	0,03	0,83 ^a	0,74
Lc 14	0,43 ^{b-f}	0,02	1,95 ^f	0,07	0,27 ^{ab}	0,04	11,69 ^{bc}	0,74
Lc15	0,19 ^{ab}	0,05	1,06 ^c	0,15	0,23 ^{ab}	0,04	0,69 ^{def}	0,49
Lc 16	1,02 ⁱ	0,15	2,26 ^{gh}	0,05	0,49 ^{def}	0,08	12,05 ^{bcd}	0,12
Lc 17	0,85 ^{hi}	0,27	2,31 ^{ghi}	0,07	0,47 ^{def}	0,09	7,32 ^g	0,51
Lc 18	1,04 ⁱ	0,17	2,2 ^g	0,01	0,28 ^{ab}	0,08	6,71 ^a	0,26
Lc 19	0,77 ^{gh}	0,03	2,01 ^f	0,05	0,3 ^{abc}	0,03	8,23 ^a	0,74
Lc 20	0,55 ^{d-g}	0,4	1,8 ^e	0,04	0,26 ^{ab}	0,05	7,22 ^{fg}	2,14
Lc 21	0,46 ^{b-f}	0,08	1,79 ^e	0,05	0,27 ^{ab}	0,02	10,67 ^{def}	1,57
Lc 22	0,51 ^{c-g}	0,11	1,65 ^d	0,08	0,26 ^{ab}	0,02	8,7 ^b	2,22
Lc 23	1,32 ^j	0,04	2,41 ⁱ	0,02	0,79 ^g	0,01	15,15 ^{b-e}	1,12
Lc 24	0,73 ^{fgh}	0,08	2,25 ^{gh}	0,03	0,43 ^{cde}	0,04	11,28 ^{b-e}	0,58
Lc 25	0,67 ^{fgh}	0,18	2,29 ^{ghi}	0,02	0,51 ^{ef}	0,04	9,71 ^{b-e}	1,05
Lc 26	0,85 ^{hi}	0,23	2,38 ^{hi}	0,03	0,53 ^{ef}	0,06	8,33 ^{b-e}	1,3
Lc 28	0,37 ^{a-e}	0,01	0,73 ^a	0,03	0,37 ^{bcd}	0,07	8,92 ^{b-e}	1,29
Lc 29	0,23 ^{abc}	0,02	0,8 ^{ab}	0,09	0,34 ^{abc}	0,09	0,67 ^{b-e}	0,41
Lc 59	0,28 ^{a-d}	0,02	0,86 ^b	0,09	0,32 ^{abc}	0,03	0,75 ^{b-e}	0,35
Lc 72	0,52 ^{c-g}	0,08	2,37 ^{hi}	0,03	0,6 ^f	0,09	5,96 ^{ef}	0,95
Lc 74	0,14 ^a	0,03	1,63 ^d	0,05	0,37 ^{bcd}	0,01	16,64 ^{c-f}	5,26

² disminución de la densidad óptica

* (a/j) acidificante 6h, (a/i) acidificante 24h, (a/g) proteolítica, (a/g) autolítica, letras o conjunto de letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes (p<0,05).

Fuente:Elaborado pelo autor.

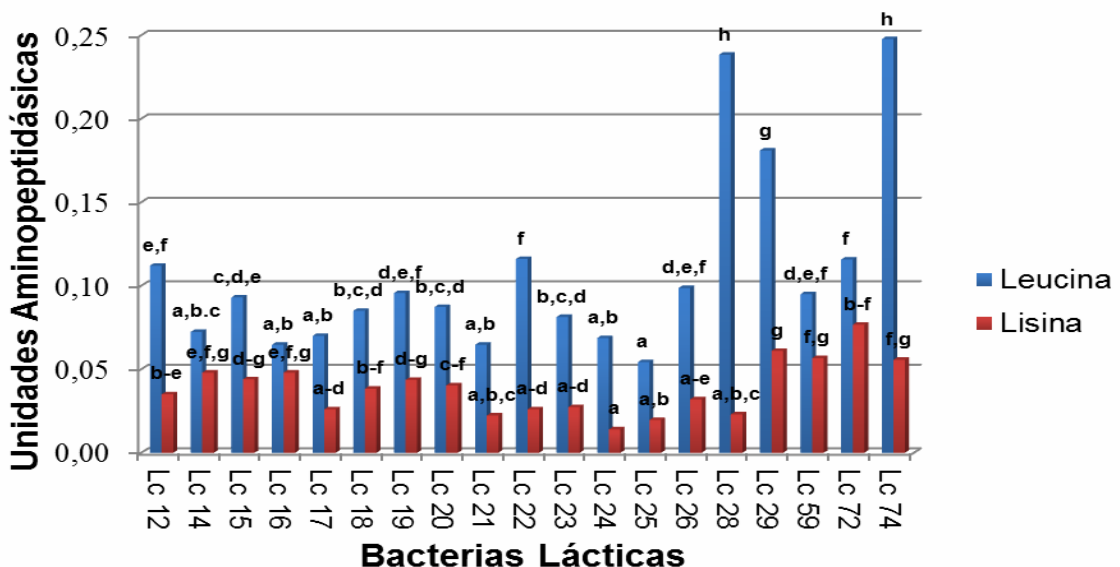
Los aislados con mayor actividad proteolítica fueron también Lc 23 y Lc 26 (Tabla 2). Lo *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* presento la mayor proteólisis en relación a las demás cepas estudiadas. Otros autores (AYAD et al., 2006; NIETO-ARRIBAS et al., 2009) citan en sus trabajos que el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mostró actividad proteolítica mayor que el *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Los valores de autolise pueden ser considerados bajos de acuerdo con Ayad et al., (2004) que relatan que las tasas de autolise ideal para las cepas deben quedar alrededor de 50% para que sean consideradas buenas de actividad autolítica. *Lactococcus* autóctonos son estables tienen una tasa más baja de autolise. Esto porque, ellos posean enzimas activas que convierten aminoácidos que tienen un

papel clave en la producción de componentes aromáticos en el queso (AYAD et al., 2003).

Para aminas biógenas se observó que las cepas Lc14, Lc21, Lc22, Lc24, Lc 25 fueran capaces de descarboxilar la L- histidina en histamina. No se observó en las cepas estudiadas la capacidad de descarboxilar la L-ornitina, L-tirosina, L-lisina. Sin embargo, es importante que tenga en cuenta que este comportamiento puede ser diferente en el queso en otros factores tales como el pH, la temperatura o el contenido de sal están implicados durante la maduración (NIETO-ARRIBAS et al., 2009). Algunas aminas biógenas pueden ser tóxicas incluso si ingeridas en bajas concentraciones. Nieto-Arribas et al., (2009) también observaron la producción de histamina por *Lactococcus lactis*. *Lactococcus* ha sido descrito como un potente productor de aminas biogénicas (BURDYCHOVÁ; KOMPRDA 2007).

Todas las cepas presentaron la actividad Leu-aminopeptidasa más elevada que Lys-aminopeptidasa, con destaque para la Leu-PNA de las cepas Lc 22, Lc 28, Lc 29, Lc 72, Lc 74 y Lys-PNA las Lc 29, Lc 59, Lc 74 ($P<0,05$) (Figura 1b).

Figura 1c – Actividad aminopeptidásica de *Lactococcus* aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense observada con densidad óptica (410 nm).

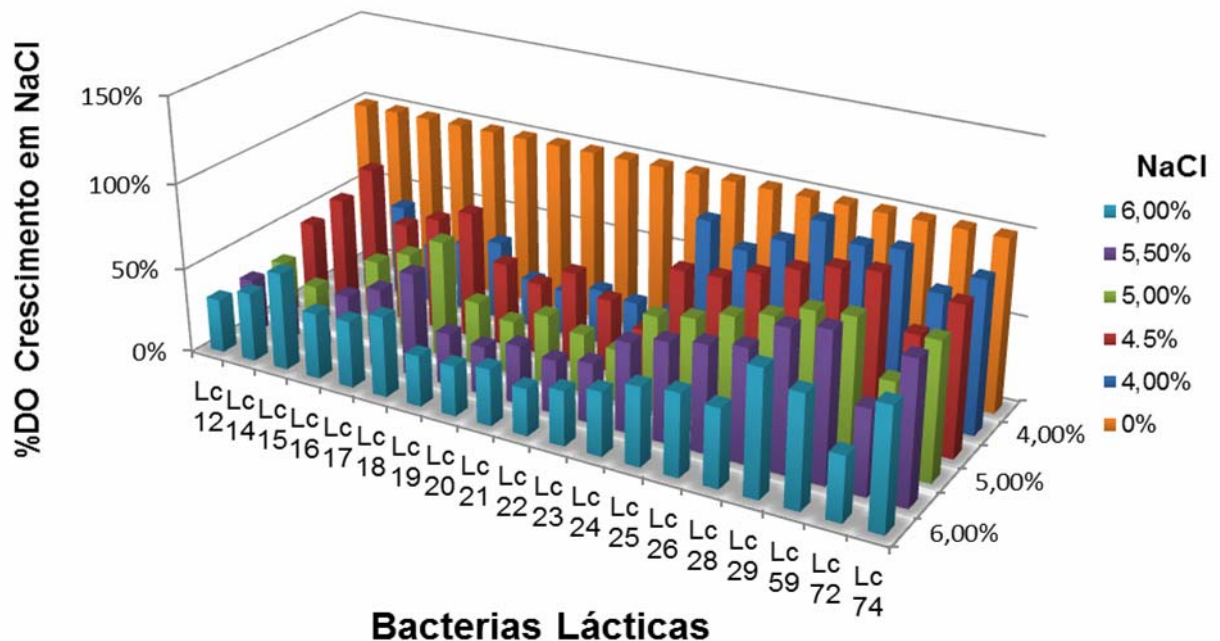


Letras o conjunto de letras diferentes indican actividad aminopeptidásica significativamente diferentes. (a-f) para Leucina y (a-g) para lisina indican que las barras sin sobrescritos comunes son significativamente diferentes ($p<0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

El aumento de la concentración del NaCl (4 a 6%) enseñó una inhibición en el crecimiento de las cepas, pero 58% presentaron mayor crecimiento a 4,5% de NaCl, y las cepas Lc15, Lc26, Lc 29, Lc 59, Lc 74 fueron las más resistentes a 6% de NaCl ($P<0,05$) (Figura 2b). Las cepas con una mayor capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de NaCl se indica para componer un buen cultivo iniciador, ya que tienen una mayor resistencia durante el período de maduración del queso, cuando la proporción de NaCl aumenta debido a la reducción de la humedad de la masa. Con los estudios realizados con las variaciones de temperatura se pueden observar que las cepas presentaron su crecimiento inhibido con la disminución de la temperatura, con menor crecimiento a 10° C. En la incubación a 20° C las cepas si mostraron con un comportamiento de crecimiento superior a 84%, siendo que las Lc 12, Lc 14, Lc 19, Lc 20, Lc 21, Lc 24, Lc 25, Lc 28 tuvieron crecimiento igual al control del cultivo incubado a la temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo (30° C).

Figura 2c – Crecimiento de *Lactococcus* spp. aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense en diferentes concentraciones de NaCl observado por densidad optica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

5.5 CONCLUSIÓN

La cepa Lc 23 (*Lactococcus Lactis* subsp. cremoris) fue la que más se destacó en características organolépticas deseadas (acidificante, proteolítica, autolítica), otras cepas que también presentaron resultados importantes fueron las Lc 26, Lc 72 y Lc 74 y que podrían ser potenciales candidatas a integrantes de un cultivo iniciador para este tipo de queso. Estos *Lactococcus* pueden ser utilizados en diferentes productos lácteos y en la elaboración del queso artesanal Serrano con leche pasteurizada para la preservación de las características de sabor y aroma de este alimento.

5.6 REFERENCIA

- ARIZCUN, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheese. *Lait*, v.77, p. 729–736, 1997.
- AYAD E.H.E.; VERHEUL A.; BRUINENBERG P. et al. Starter culture development for improving the flavour of Proosdij-type cheese, *International Dairy Journal*, v. 13, p. 159–168, 2003.
- AYAD, E.H.E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N. et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*. v. 21, p. 715–725, 2004.
- AYAD, E. H. E.; OMRAN, N.; EL-SONDA, M. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. *Lait*, v. 86, p. 317-331, 2006.
- 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.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; et al (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 287-317, v. 1.
- BOUTON, Y.; GUYOT, P.; BEUVIR, E. Use of PCR based method and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese ripening. *International Journal Food Microbiology*, v. 76, p. 27-38, 2002.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 53, p. 33-41, 1999.
- BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, v.276, p. 149-155, 2007.

- CASALTA, E.; MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal Food Microbiology**, v. 126, p. 271-273, 2008.
- CHURCH, F.C.; SWAISGOOD, H.E.; PORTER, D.H. et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal Dairy Science**. v. 66, p. 1219-1227, 1983.
- CHURCH, F.C.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. et al. An *o*-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. **Analytical Biochemistry**, v.146, p. 343:348, 1985.
- DESMEAZEAUD, M.; COGAN, T.M. Role of cultures in cheese ripening. In: COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. **Dairy Starter Cultures**, New York: VCH Publishers, Inc., 1996, p. 207–231.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.
- GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K. et al. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.2192–2199, 1998.
- GARRIGA, M.; HUGAS, M.; GOU, P. et al. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 32, p. 173–183, 1996.
- GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese: A review. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 327, p. 16–19, 1997.
- IDE, L. P. A .; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**., v. 25, n. 6, p. 1351-1358, nov./dez., 2001.
- KIMARYO, V.M.; MASSAWE, G.A.; OLASUPO, N.A. et al. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of “kivunde”, a traditional Tanzanian food product. **International Journal Food Microbiology**, v. 56, p.179–190, 2000.
- LANSGRUD, T.; LANDAAS, A.,; CASTEBERG, H. B. Autolytic properties of different strains of group N streptococci. **Milchwissenschaft**, v. 42, p. 556–560, 1987.
- LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C. et al. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.
- MONNET, V.; CHAPOT-CHARTIER, M.P.; GRIPON, J.C. Métabolisme - Régulation Les peptidases des lactocoques. **Lait**, v. 73, p. 97-108, 1993.
- NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional

processing of artisanal Manchego cheese. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, p. 1505-1517, 2009.

PRITCHARD, G.G.; COOLBEAR, T. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**. v.12, p. 179-206, 1993.

REQUENA, T.; PELAEZ, C.; DESMAZEAUD, M.J. Characterization of *lactococci* and *lactobacilli* isolated from semi-hard goat's cheese. **Journal Dairy Research**. v. 58, p. 137–145, 1991.

SÁNCHEZ, J.I.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. **International Journal Food Microbiology**. v. 105, p.377-387, 2005.

6 ARTIGO 4: CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA DE CEPAS DE *LEUCONOSTOC* AISLADAS DE QUESO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE, BRASIL

CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE CEPAS DE *LEUCONOSTOC* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE, BRASIL

6.1 RESUMEN: Fueron evaluadas las actividades acidificante, proteolítica, autolítica, aminopeptidásica, lipolítica, resistencia al NaCl, producción de dextrano y de aminos biógenas de 12 *Leuconostoc* aislados de quesos artesanales Serrano elaborado con la leche cruda de vacunas en la provincia de Santa Catarina, con el objetivo de conocer sus características tecnológicas. Los resultados enseñaron una homogeneidad entre las medias de las actividades acidificante, proteolítica, autolítica y aminopeptidásica. Los *Leuconostoc* con los mejores resultados para estas analices fueron Ln 9, Ln 60 y Ln 61. Para la producción de dextrano la mejor cepa fue el *Leuconostoc* Ln 6 e ningún ha producido aminos biógenas. Casi ningún *Leuconostoc* fue capaz de crecer bien por debajo de pH 4,9.

Palabras-claves: Queso serrano brasileño. Caracterización tecnológica. Cultivos iniciadores. Bacterias lácticas.

6.2 INTRODUCCIÓN

El queso artesanal Serrano es un producto histórico, típico de la sierra de la provincia de Santa Catarina, Brasil. El queso es elaborado con la leche cruda integral de vacunas, es cuajado y acidificado artesanalmente, madurado en las propiedades rurales y es un alimento de gran consumo por la población. Tiene como característica de presentación el interior de textura blanda y de sabor picante, con casca amarilla (IDE; BENEDET, 2001). Su comercialización es considerada fuera de la legislación brasileña que determina que los quesos deben ser producidos con la leche pasteurizada (BRASIL, 1996). Todavía, este producto tiene importancia económica y es una actividad rentable para gran número de propiedades rurales en esta región (NUNES; JESUS, 2011).

Para muchos el producto elaborado con leche pasteurizada cambia las características organolépticas del original. Quesos artesanales presentan aroma y sabor más intensos que los producidos con leche pasteurizada debido a las bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas de la leche (FRANCIOSI et al., 2009).

La utilización de la leche pasteurizada resulta en un producto fuera de los padrones característicos de este tipo de queso. La pasteurización de la leche destruye microorganismos patógenos, pero también reduce las bacterias ácido lácticas que forman parte de la microbiota natural de la leche y son responsables para el desarrollo de las características sensoriales del producto. Esto ocurre como resultado de la sustitución total de la compleja microbiota autóctona presentes en la leche cruda por fermentos lácticos comerciales, que conduce a una normalización de los productos (MACEDO et al. 2004).

Estudios se han desarrollado en el país en un intento de mantener la identidad de los diferentes quesos de fabricación artesanal y que puedan ser seguros para el consumo humano. El objetivo principal es identificar y caracterizar la microbiota láctica que forma las características que hacen este producto tan buscado como alimento (LIMA et al, 2009). Las BAL son microorganismos constituyentes de la leche cruda, y hacen parte de la microbiota de los quesos que usan esta leche como materia prima. Ellas son responsables por desarrollar los componentes que influyen la textura, sabor y aroma del queso. Por estos motivos, aislar y identificar las BAL autóctonas de la leche, y después de pasteurizada añadir estas BAL, puede contribuir para preservar las características típicas del queso artesanal.

Estas BAL pueden ser aisladas de los productos lácteos para estudios y posterior desarrollo de fermentos que serán utilizados en la industria. Los principales microorganismos implicados son bacterias de los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. La capacidad de las bacterias de producción de las características organolépticas deseada en los quesos está relacionada con las características tecnológicas y fisiológicas de las cepas predominantes, por ejemplo, resistencia al NaCl, capacidad de acidificación, actividad proteolítica, peptidásica, autolítica y producción de aminas biógenas (DESMEAZEAUD; COGAN 1996; GARDINER et al. 1998; KIMARYO et al., 2000).

La presencia de especies de *Leuconostoc* en muchos quesos durante la maduración ha sido descrita por diversos autores, siendo las especies aisladas con mayor frecuencia *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (ARIZCUN et al., 1997; NIETO-ARRIBAS et al., 2010).

El género *Leuconostoc* es conocido por su baja producción de ácido láctico y actividad proteolítica, siendo dependiente de otros géneros para su desarrollo en la leche. Sin embargo, en algunos estudios se han observado importantes actividades proteásicas y peptidásicas en algunas cepas de *Leuconostoc* (MACEDO; MALCATA, 1997; HERREROS et al. 2003).

Este trabajo tuvo como objetivo la identificación de la capacidad tecnológica de *Leuconostoc* aislados del queso artesanal Serrano Catarinense, para una futura elaboración de cultivos que puedan ser utilizados en la industria para elaboración de productos lácteos, bien como la producción del queso artesanal Serrano Catarinense con leche pasteurizada preservando sus características tradicionales.

6.3 MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1 Microorganismos

Las 12 cepas de *Leuconostoc* (Tabla 1) utilizadas en este estudio fueron anteriormente aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense e identificadas genéticamente, y hacen parte de la colección de BAL del Laboratorio de Inspección de Productos de Origen Animal de la Universidad Estadual de Londrina (Brasil). Las cepas de BAL aisladas fueron mantenidas congeladas en caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) glicerinado a -80° C hasta el momento de las analices de caracterización tecnológica.

Las caracterizaciones tecnológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha (España). Todas las analices fueron realizadas por triplicado.

Tabla 1c – Identificación de las 12 cepas de *Leuconostoc* aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, evaluadas para las caracterizaciones tecnológicas.

Numero	Bacteria Ácido Láctico
Ln 02	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
Ln 03	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Ln 04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Ln 05	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Ln 06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
Ln 07	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Ln 08	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Ln 09	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
Ln 10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Ln 11	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
Ln 60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Ln 61	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>

6.3.2 Actividad Acidificante:

La determinación consistió en inocular el microorganismo a evaluar (1%) en 10 mL de leche desnatada estéril (Oxoid) e incubar a 30°C. La capacidad acidificante fue calculada como el Δ pH ocurrido durante la incubación (Δ pH= pH tras incubación – pH inicial de la leche), para lo que se efectuó una medida del pH antes de la inoculación, otra tras 6 h y otra tras 24 horas de incubación. Las medidas se realizaron con un pH metro (Crison pH metro Basic 20, Crison – Barcelona) (GARRIGA et al. 1996).

6.3.3 Actividad Proteolítica:

La cuantificación de la actividad proteolítica de los aislados fue realizada por el método espectrofotométrico descrito por Church et al. (1983) y modificado posteriormente en 1985 por los mismos autores. El método está basado en la reacción del o-phthaldialdehído (oPA) y el β -mercaptoetanol con las aminas, formando 1,2-inositol disustituido que absorbe a 340 nm.

Los resultados se expresaron como mmol glicina/L (mmol Gly/L), interpolando los valores de absorbancia en una curva de glicina de concentraciones comprendidas entre 0,1 mM y 10 mM.

6.3.4 Actividad Autolítica:

La capacidad autolítica de los aislados se determinó en cultivos crecidos hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en caldo MRS (D.O.660 = 0,7-0,8). Éstos se recogieron y lavaron por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C, resuspendiéndose las células en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,8 (D.O.660=0,6-0,7). Las suspensiones celulares en tampón se incubaron durante 4 horas a 30°C y se midió el descenso de densidad óptica a 660 nm cada 30 minutos en un lector de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). La capacidad autolítica se expresó según Lansgrud et al. (1987) como $100 - (A1/A2 \times 100)$, donde A1 y A2 son la mínima y máxima densidad celular, respectivamente, medidas durante la incubación.

6.3.5 Actividad Aminopeptidásica:

La actividad aminopeptidásica de las cepas fue ensayada utilizando el método descrito por Requena et al. (1991) modificado por Arizcun et al. (1997). Se evaluó la actividad aminopeptidásica para dos sustratos, L-lisina p-nitroanilida (Lys-pNA) y L-leucina p-nitroanilida (Leu-pNA) (Sigma-Aldrich Ltd).

El contenido de p-nitroanilida liberado se determinó mediante la medida de la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-530. Los resultados se expresaron en unidades de actividad aminopeptidásica (U), donde 1 U es el incremento de 0,001 unidades de absorbancia en un minuto.

6.3.6 Producción de Aminas Biógenas:

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas, fue ensayada utilizando el método cualitativo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). En éste se realizó una siembra en estría de la cepa objeto de estudio, en un medio que contiene el del aminoácido a ensayar y el indicador del pH púrpura de bromocresol. La prueba

fue considerada positiva si, tras la incubación, en el medio se produce un viraje del color amarillo a púrpura como consecuencia del aumento de pH producido por la descarboxilación del aminoácido. En el caso de la tirosina, por tratarse de un compuesto insoluble, se consideró que el ensayo fue positivo cuando alrededor de la estría desaparecen los cristales del aminoácido.

6.3.7 Actividad Lipolítica:

Para evaluar la capacidad lipolítica de las cepas se utilizó un medio de cultivo enriquecidos en materia grasa: Agar Tributirina (Panreac). Las cepas se inocularon al 10% en caldo MRS y fueron incubadas a su temperatura óptima de crecimiento, en condiciones aerobias hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial. A partir de la cepa revitalizada se realizó una siembra por estría en agar Tributirina e incubó durante 7 días a 37°C. La presencia de un halo alrededor de la colonia se interpretó como lipólisis positiva (MORANDI et al., 2006).

6.3.8 Producción de Dextrano:

Para estudiar la producción de dextrano de las cepas de *Leuconostoc*, se sembraron cultivos de una noche sobre placas de medio agar Mayeaux (Scharlau) y se incubaron a 22°C. La producción de dextrano se puso de manifiesto por la aparición de colonias mucosas transcurridos cinco días de incubación (SCHILLINGER; LÜCKE, 1987).

6.3.9 Resistencia al NaCl:

Las cepas se inocularon por duplicado al 1% del inóculo en caldo MRS conteniendo concentraciones de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0% de NaCl y se incubaron durante 24 horas a 32°C en placas de microtitulación. Transcurrido este tiempo se midió la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). Los resultados se expresaron como el porcentaje de absorbancia alcanzada por los cultivos con respecto a la mostrada por los cultivos control en ausencia de NaCl (SÁNCHEZ et al., 2005).

6.3.10 Resistencia a Acidez:

La determinación de la resistencia a la acidez se realizó como se indica en el apartado anterior, utilizando medio MRS previamente acidificado con ácido láctico (Panreac) a pH 4,3, 4,6, 4,9, 5,2 y 5,5. Los resultados se expresaron utilizando como control un cultivo con medio sin acidificar (SÁNCHEZ et al., 2005).

6.3.11 Analices Estadísticas:

Se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) usando el teste de Student-Newman-Keulsprograma, IBM SPSS Statistics, versión 18.2 (SPSS Inc., Chicago, IL., EUA).

6.4 RESULTADOS E DISCUSIÓN

De las 12 cepas de *Leuconostoc* estudiadas, las que presentaron los valores significativamente más elevados ($P < 0,05$) para la actividad acidificante pueden ser observados en la Tabla 2, donde las medias con mayor descenso de pH fueron Ln 61 con una baja de 0,4 U en la leche seguido de las cepas Ln 5, Ln 9 y Ln 7 a las 6 h de incubación, y el aislado Ln 9 fue el que presentó mayor baja de 1,12 U acompañado de las cepas Ln 11 y Ln 61 a las 24 h de incubación. La actividad acidificante obtenida en este estudio fue mayor del que la observada por otros autores (NIETO-ARRIBAS et al., 2010). De acuerdo con Eck (1990) la baja del pH ayuda en el control bacteriostático de los microorganismos alterantes y de los patógenos que están presentes en la leche usado para la producción del queso. Los *Leuconostoc* son conocidos por no tener una buena actividad acidificante, por esto recomendase que hagan parte de fermentos con otras cepas que posean metabolismo homofermentativos como los *Lactococcus*.

En relación a la actividad proteolítica de los *Leuconostoc*, fueron las cepas Ln 61, Ln 9 y la Ln 60 las que mostraron la mayor actividad proteolítica ($P < 0,05$). Todavía, los valores observados fueron menores que los observados por otros autores (GARABAL et al., 2008; NIETO-ARRIBAS et al., 2010). Mismo las cepas presentando valores bajos el empleo de estas son importante una vez que

influyen durante la maduración del queso, mejorando la calidad nutritiva y sensorial de este alimento.

El proceso de autólisis es importante en la elaboración de quesos pues la lisis celular libera enzimas que contribuyen con las características sensoriales deseadas. En la actividad autolítica los aislados con mayores valores ($p < 0,05$) fueron Ln 5, Ln 11 y Ln 60. Pero, los valores presentados (Tabla 2) fueron bajos comparados con otros autores (AYAD et al., 2004, AQUILANTI et al., 2007, NIETO-ARRIBAS et al., 2010).

Estos valores de autólisis pueden ser considerados bajos de acuerdo con Ayad et al., (2004) que relatan que las tasas de autólisis ideal para las cepas deben quedar alrededor de 50% para que sean consideradas buenas de actividad autolítica.

En relación a la actividad aminopeptidásica, todas las cepas presentaron la actividad Leu-aminopeptidasa más elevada que Lys-aminopeptidasa, con destaque para la Leu-PNA de las cepas Ln 02, Ln 05, Ln 06, Ln 07, Ln 08, Ln 10, Ln 60, Ln 61 y Lys-PNA las Ln 02, Ln 03, Ln 10, Ln 60 ($P < 0,05$) Diferentemente Macedo et al., (2000) observaron elevada actividad Leu-aminopeptidasa y Lys-aminopeptidasa evaluando cepas de *Leuconostoc*. No fue evidenciada una correlación entre las cepas con mayor capacidad autolítica y las cepas con mayor capacidad aminopeptidásica.

Tabla 2c – Actividad acidificante, proteolítica, autolítica y aminopeptidásica de las cepas de *Leuconostoc* aisladas de queso artesanal Serrano Catarinense, observadas con pHmetro y densidad óptica.

Cepa	Actividad acidificante (Δ pH 6 h)		Actividad acidificante (Δ pH 24 h)		Actividad proteolítica (mmol Gly/L) ¹		Actividad autolítica (%) ¹		Actividad aminopeptidásica ²			
	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd	Lys		Leu	
	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd	Media*	sd
Ln 2	0,10 ^a	0,03	0,48 ^{a,b}	0,08	0,17 ^{a,b}	0,02	8,13 ^{b,c}	0,79	0,03 ^c	0,008	0,05 ^d	0,007
Ln 3	0,12 ^{a,b}	0,03	0,35 ^a	0,11	0,14 ^{a,b}	0,03	5,96 ^{a,b,c}	0,27	0,03 ^c	0,002	0,03 ^{b,c}	0,005
Ln 4	0,18 ^{a,b}	0,02	0,32 ^a	0,05	0,22 ^{a,b}	0,01	7,55 ^{b,c}	1,62	0,02 ^{a,b,c}	0,005	0,03 ^{b,c}	0,007
Ln 5	0,21 ^{a,b,c}	0,03	0,16 ^a	0,04	0,23 ^{a,b}	0,02	8,95 ^c	1,29	0,02 ^{b,c}	0,004	0,09 ^e	0,003
Ln 6	0,15 ^{a,b}	0,07	0,15 ^a	0,05	0,19 ^{a,b}	0,03	5,19 ^{a,b}	0,26	0,02 ^{b,c}	0,005	0,12 ^f	0,004
Ln 7	0,25 ^{b,c}	0,04	0,21 ^a	0,04	0,25 ^{a,b}	0,02	6,74 ^{b,c}	1,20	0,02 ^{a,b,c}	0,003	0,09 ^e	0,012
Ln 8	0,14 ^{a,b}	0,05	0,66 ^b	0,27	0,17 ^{a,b}	0,08	3,61 ^a	1,16	0,01 ^{a,b,c}	0,009	0,05 ^d	0,006
Ln 9	0,30 ^c	0,06	1,12 ^c	0,11	0,31 ^b	0,17	6,89 ^{b,c}	0,63	0,01 ^a	0,013	0,03 ^{a,b}	0,004
Ln 10	0,17 ^{a,b}	0,09	0,29 ^a	0,03	0,21 ^{a,b}	0,02	8,63 ^{b,c}	1,48	0,03 ^c	0,002	0,04 ^{c,d}	0,002
Ln 11	0,17 ^{a,b}	0,04	1,04 ^c	0,22	0,12 ^a	0,06	9,07 ^c	1,52	0,01 ^{a,b}	0,005	0,02 ^a	0,003
Ln 60	0,18	0,01	0,44	0,04	0,28	0,02	11,81 ^d	0,30	0,03 ^c	0,003	0,05 ^d	0,006
Ln 61	0,4	0,03	0,73	0,07	0,32	0,03	5,36 ^{a,b}	2,59	0,02 ^{bc}	0,005	0,04 ^d	0,005

¹ disminución de la densidad óptica

² Unidad de actividad aminopeptidásica. 1 U es la cantidad de enzima igual a un aumento de absorbancia de 0,001 unidad a 410 nm en 1 min.

* (a-g/a-m) acidificante, (a-e) proteolítica, (a-k) autolítica, (a-c) Lysina, (a-f) Leucina, letras o conjunto de letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fuente: Elaborado pelo autor.

Ninguna de las cepas de *Leuconostoc* estudiadas fueron capaces de descarboxilar las aminas biógenas evaluadas. De acuerdo con Fernandez et al., (2010) el género *Leuconostoc* raramente está envuelto en la producción de aminas biógenas. Esto es importante porque algunas aminas biógenas pueden ser tóxicas incluso ingeridas en baja concentraciones, como la histidina que puede ser descarboxilada en histamina o la tirosina que descarboxila en tiramina, las dos son responsables por crisis de hipertensión en humanos. Todavía, esto no garantiza que estas cepas vengán a producir aminas biógenas en el queso. Para algunos autores (JOOSTEN; VAN BOEKEL, 1988; GARDINI et al. 2001; NIETO-ARRIBAS et al., 2009) algunos factores como la disponibilidad de precursores de aminoácidos, pH, actividad de agua, concentración de sal y también la temperatura, la densidad las bacterias y los efectos sinérgicos entre microorganismo pueden contribuir a la presencia y acumulación de aminas biógenas en el queso.

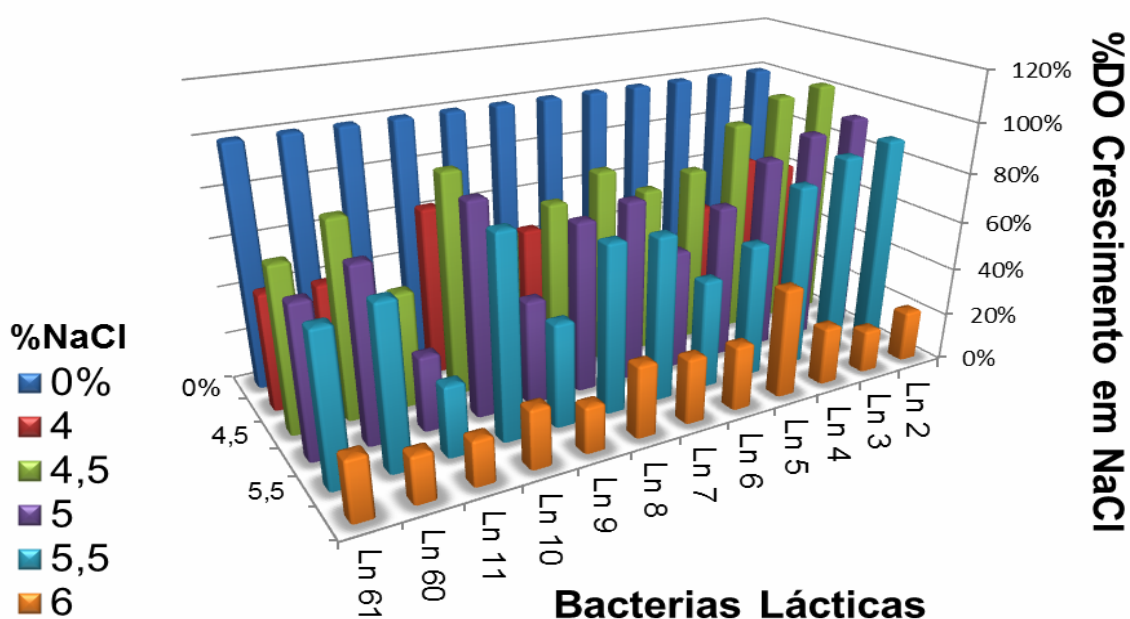
Las cepas que presentaron capacidad lipolítica fueron las Ln 02, Ln 03, Ln 04, Ln 09 y Ln 10. La hidrólisis de lípidos y los ácidos grasos contribuyen para las propiedades organolépticas, tanto de sabor como de aroma. De acuerdo con

McSweeney; Sousa (2000) lipólisis es un fenómeno bioquímico, con la liberación de ácidos grasos y glicéridos de la descomposición de la grasa de leche, proporciona sabor y aroma al queso, además de influir en la textura. Para Herrero et al., (1996) esta capacidad de metabolizar lípidos no es considerado como algo ventajoso en algunos quesos, pues puede con el tiempo llevar al apareamiento de rancidez.

La evaluación de producción de dextrano identifico 10 *Leuconostoc* productores de colonias viscosas características de dextrano, siendo que la cepa Ln 06 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*) fue la que más se destacó. Este exopolisacárido es responsable por las características de textura del producto.

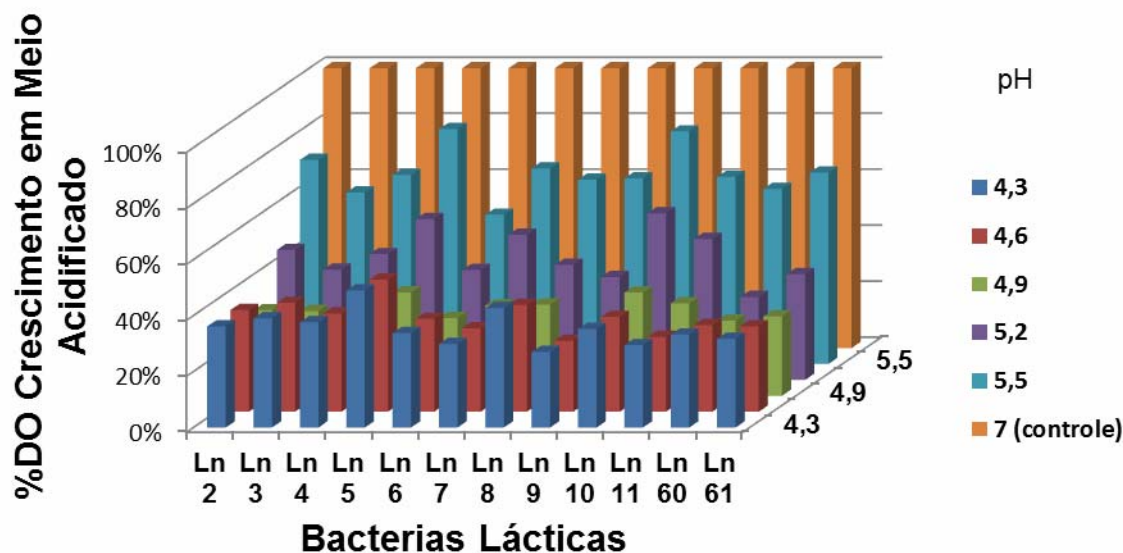
El aumento de la concentración del NaCl (4 a 6%) presentó una reducción en el crecimiento de las cepas, pero todas presentaron mayor tasa de supervivencia a 4,5% de NaCl aunque lentamente. Ninguna cepa fue capaz de presentar crecimiento importante a 6% de concentración de NaCl ($P < 0,05$) (Figura 1c). El pH (4,3 a 5,5) también influyó en el crecimiento ($P < 0,05$), con una reducción proporcional a la disminución de pH. Casi ninguna cepa fue capaz de crecer bien por debajo de pH 4,9. Las cepas Ln 03, Ln 04, Ln 05, Ln 08 presentaron una resistencia mayor al pH 4,3 que las otras, pero con crecimiento poco significativo (Figura 2c).

Figura 1d – Crecimiento de *Leuconostoc* spp. aislados de quesos artesanal Serrano Catarinense en diferentes concentraciones de NaCl, observado por densidade óptica.



Fuente: elaborado por el autor (2014).

Figura 2d – Crecimiento de *Leuconostoc* spp. aislados de quesos Artesanal Serrano Catarinense en diferentes pH, observados por densidade optica.



Fuente: elaborado por el autor (2014).

6.5 CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados permiten seleccionar las cepas de *Leuconostoc* que más se destacaron en los ensayos realizados. Podrían hacer parte de un cultivo láctico las cepas Ln 2, Ln 3, Ln 5, Ln 9, Ln10 y Ln 60, pero, ni todas coincidieron en los mismos ensayos, lo que sugiere que sería necesario elaborar una mezcla de estas cepas de *Leuconostoc*. De esta forma es posible tener una colección de *Leuconostoc* con funcionalidades tecnológicas que pueden ser aplicadas en la elaboración de productos con calidad en la industria, también pueden hacer parte de un fermento que permita mantener las características deseadas en el queso artesanal Serrano mismo cuando de la utilización de leche pasteurizada.

6.6 REFERENCIAS

AYAD, E.H.E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N. et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**. v. 21, p. 715–725, 2004.

ARIZCUN, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheese. **Lait**, v.77, 729–736, 1997.

- AQUILANTI, L.; ZANNINI, E.; ZOCCHETTI, A. et al. Polyphasic characterization of indigenous lactobacilli and lactococci from PDO Canestrato Pugliese cheese. **LWT - Food Science Microbiology**, v. 40, p. 1146–1155, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria nº 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília. p. 3977 - 3978. 1996.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology*, v. 53, p. 33-41, 1999.
- BUFFA, M.; MORAIS, J.; JIMÉNEZ-BELENGUER, A. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making. **Milchwissenschaft**, v. 61, p. 404–407, 2005.
- CHURCH, F.C.; SWAISGOOD, H.E.; PORTER, D.H. et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal Dairy Science**. v. 66, p. 1219-1227, 1983.
- CHURCH, F.C.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. et al. An *o*-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. **Analytical Biochemistry**, v.146, p. 343:348, 1985.
- DESMEAZEAUD, M.; COGAN, T.M. Role of cultures in cheese ripening. In: COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. **Dairy Starter Cultures**, New York: VCH Publishers, Inc., 1996, p. 207–231.
- ECK, A. **Queso**, ed. Ed. Omega, 1990, 512p.
- FERNÁNDEZ, E.; ALEGRÍA, A.; DELGADO, S. et al. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 142-148, 2010.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**. v. 19, p. 3-11, 2009.
- GARABAL, J.I.; RODRIGUEZ-ALONSO, P.; CENTENO, J.A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). **LWT – Food Science Microbiology**, v.41, n. 8, p. 1452–1458, 2008.
- GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K. et al. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p.2192–2199, 1998.
- GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CARUSO, M.C. et al. Effects of pH, temperature and CLna concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. **International Journal Food Microbiology**, v. 64, p. 105-117, 2001.

GARRIGA, M.; HUGAS, M.; GOU, P. et al. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 32, p. 173–183, 1996.

HERRERO, M.; MAYO, B.; GONZALES, B. et al. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. **Journal Applied Bacteriologic**, v. 81, p. 565–570, 1996.

HERREROS, M.A.; FRESNO, J.M.; GONZÁLEZ PRIETO, M.J. et al. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **International Dairy Journal**, v. 13, p. 469–479, 2003.

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

JOOSTEN, H.M.L.J.; VAN BOEKEL, M.A.J.S., 1988. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 4. A study of the kinetics of histamine formation in an infected Gouda cheese. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 42, p. 3–24, 1988.

KIMARYO, V.M.; MASSAWE, G.A.; OLASUPO, N.A. et al. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of “kivunde”, a traditional Tanzanian food product. **International Journal Food Microbiology**, v. 56, p.179–190, 2000.

LANSGRUD, T.; LANDAAS, A.,; CASTEBERG, H. B. Autolytic properties of different strains of group N streptococci. **Milchwissenschaft**, v. 42, p. 556–560, 1987.

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.

MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X. Secondary proteolysis in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. **Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 204, p. 173–179, 1997.

MACEDO, A.C., VIEIRA, M., POÇAS, R. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 769–774, 2000.

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

McSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. A review. **Lait**, v. 80, p. 293–324, 2000.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C. et al. Technological characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 867-875, 2006.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. **Journal Applied Microbiology**, v. 107, p. 1505-1517, 2009.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M. et al. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. **Food Microbiology**, v. 27, p. 85-93, 2010.

NUNES, I. R.; JESUS, N. N. Área geográfica de produção, importância econômica e comercialização. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 53-63.

REQUENA, T.; PELAEZ, C.; DESMAZEAUD, M.J. Characterization of *lactococci* and *lactobacilli* isolated from semi-hard goat's cheese. **Journal Dairy Research**. v. 58, p. 137-145, 1991.

SÁNCHEZ, J.I.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. **International Journal Food Microbiology**. v. 105, p.377-387, 2005.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, v. 4, p. 199-208, 1987.

7 ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE *LACTOBACILLUS* SPP. ISOLADOS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO CATARINENSE PRODUZIDO COM LEITE CRU, BRASIL

7.1 RESUMO: O gênero *Lactobacillus* faz parte da microbiota que se desenvolve principalmente durante a maturação de queijo e participa do desenvolvimento do sabor, aroma e textura do produto. As atividades acidificantes, proteolíticas, autolíticas, lipolíticas, aminopeptidásica e produção de aminas biogênicas de 43 cepas de *Lactobacillus*, isoladas do queijo artesanal Serrano Catarinense, foram avaliadas com o objetivo de conhecer as características tecnológicas desses isolados. Os resultados mostraram uma grande heterogeneidade de respostas às análises entre os isolados de *Lactobacillus* avaliados. Apenas duas (Lb 30 e Lb 49) cepas apresentaram resultados adequados em duas das atividades, acidificante e aminopeptidásica, essas características permitem a degradação de aminoácidos pequenos que podem causar sabor amargo, e qualificam estas cepas a serem utilizadas para compor um fermento contribua com as características sensoriais do queijo na fase de maturação. As demais cepas não apresentaram coincidência na intensidade de produção das características tecnológicas estudadas. Seis amostras produziram aminas biogênicas e não poderiam ser empregadas na formulação de fermentos.

Palavras-chaves: Queijo serrano. Caracterização tecnológica. Fermentos. Bactérias lácticas.

7.2 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal Serrano é um produto tradicional elaborado com leite integral cru de vacas, coalhado e acidificado de forma artesanal, separado do soro e maturado nas propriedades rurais. Representa a cultura e a gastronomia da região serrana do estado de Santa Catarina. É um produto com características próprias de sabor, aroma e textura, portanto, como os demais queijos artesanais produzidos no país também necessita de estudos que identifiquem a microbiota responsável pelas características organolépticas que possui. Apresenta como características o interior macio de sabor láctico e levemente picante, com a casca amarela e firme (IDE; BENEDET, 2001). Este produto tem importância econômica e para grande número de propriedades rurais da região serrana (NUNES; JESUS, 2011).

Alguns estudos têm identificado bactérias ácido lácticas na tentativa de manter a identidade dos diferentes queijos de fabricação artesanal produzidos no Brasil e possibilitar que estes sejam seguros ao consumo humano. O objetivo

comum na maioria dos trabalhos é identificar e caracterizar a microbiota láctica formadora das características do queijo artesanal (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2012).

Os queijos artesanais apresentam aroma e sabor característicos devido à biodiversidade das bactérias ácido lácticas endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009). Segundo Peláez e Requena (2005) as variações entre as características sensoriais de um queijo produzido com leite cru dependem, principalmente, da diversidade e complexidade da microbiota existente neste leite. Diferente dos queijos feitos com leite pasteurizado e acrescidos de fermentos com pouca variabilidade de culturas.

De acordo com Carrasco et al., (2002) o uso de bactérias ácido lácticas (BAL) nos cultivos iniciadores possuem uma ampla aplicação na produção de alimentos fermentados. As BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas, lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados, elas permitem preservar o valor nutritivo e a salubridade da matéria prima, proporcionando um produto bastante palatável.

As BAL não integrantes do cultivo iniciador são, as NSLAB, sigla para *non-starter lactic acid* bactéria, constituem a microbiota chamada secundária da qual o gênero *Lactobacillus* faz parte. Esta microbiota se desenvolve espontaneamente em todos os queijos produzidos com leite cru. As NSLAB não contribuem para a produção de ácido durante a fabricação, mas geralmente desempenham um papel significativo durante a maturação, com marcada influencia no desenvolvimento do sabor, aroma e textura dos queijos e, portanto, em sua qualidade (SHEEHAN et al. 2008).

Este trabalho teve como objetivo a identificação da capacidade tecnológica de cepas de *Lactobacillus* isoladas de queijo artesanal Serrano, visando uma futura elaboração de fermentos lácticos, para produção deste queijo preservando suas características tradicionais e utilizando leite pasteurizado.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 Micro-organismos

As 43 cepas de *Lactobacillus* utilizadas neste estudo foram anteriormente isoladas de queijo artesanal Serrano Catarinense e identificadas geneticamente, e fazem parte da coleção de BAL do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina (Brasil). As cepas de BAL isoladas foram mantidas congeladas em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) glicerinado a -80°C até o momento das análises de caracterização tecnológica.

As caracterizações tecnológicas foram realizadas no Laboratório de Alimentos da Universidade de Castilla-La Mancha (Espanha). Todas as análises foram realizadas em triplicada.

7.3.2 Atividade Acidificante:

A determinação consistiu em inocular o micro-organismo a ser avaliado (1%) em 10 mL de leite desnatado estéril (Oxoid) e incubar a 37°C . A capacidade acidificante foi calculada como a ΔpH ocorrida durante a incubação ($\Delta\text{pH} = \text{pH}$ após incubação – pH inicial do leite), para o que se efetuou uma medida do pH antes da inoculação, após 6 h e após 24 horas de incubação. As medidas se realizaram com um pHmetro (Crison pH metro Basic 20, Crison – Barcelona) (GARRIGA et al. 1996).

7.3.3 Atividade Proteolítica:

A quantificação da atividade proteolítica dos isolados foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Church et al., (1983) e modificado posteriormente por Church et al., (1985). O método está baseado na relação do o-phthaldialdehído (oPA) e o β -mercaptoetanol com as aminas, formando 1,2-inositol que absorve a densidade óptica (D.O.) 340 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530.

Os resultados se expressaram como mmol glicina/L (mmol Gly/L), interpolando os valores de absorbância em uma curva de glicina de concentrações compreendidas entre 0,1 mM e 10 mM.

7.3.4 Atividade Autolítica:

A capacidade autolítica dos isolados se determinou em cultivos crescidos até a metade da fase exponencial de crescimento em caldo MRS (D.O.660 = 0,7-0,8). Depois os cultivos foram lavados por centrifugação a 10.000 g. durante 10 minutos a 4° C, resuspendendo-se as células em tampão fosfato sódico 20 mM, pH 6,8 (D.O.660=0,6-0,7). As suspensões celulares em tampão foram incubadas durante 4 h. a 37° C e se mediu o decréscimo de densidade óptica a 660 nm cada 30 min. Em um leitor de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). A capacidade autolítica foi expressada segundo Lansgrud et al. (1987) como $100 - (A1/A2 \times 100)$, onde A1 e A2 são a mínima e máxima densidade celular, respectivamente, medidas durante a incubação.

7.3.5 Atividade Lipolítica:

Para avaliar a capacidade lipolítica das cepas se utilizou o meio de cultivo enriquecido com gordura – Ágar Tributirina.

As cepas foram inoculadas a 10% em caldo MRS e foram incubadas a sua temperatura ótima de crescimento, em condições aeróbias até que os cultivos alcançaram a fase exponencial. A partir da cepa revitalizada se realizou uma semeadura por estria em ágar Tributirina e se incubou durante 7 h. a 37° C. A presença de um halo ao redor da colônia foi interpretado como lipólise positiva (Morandi et al., 2006).

7.3.6 Produção de Aminas Biogênicas:

A atividade amino-descarboxilasa das cepas foi analisada utilizando o método qualitativo descrito por Bover-Cid; Holzapfel (1999). Se realizou uma semeadura em estria da cepa objeto de estudo, em um meio que contém o aminoácido a ser analisado e o indicador de pH púrpura de bromocresol. A prova foi

considerada positiva se, depois da incubação, no meio se produz uma virada da cor amarelo a púrpura como consequência do aumento de pH produzido pela descarboxilação do aminoácido. No caso da tirosina, por tratar se de um composto insolúvel, se considerou que a análise foi positivo quando ao redor da estria desaparecem os cristais do aminoácido.

7.3.7 Atividade Aminopeptidásica:

A atividade aminopeptidásica das cepas foi analisada utilizando o método descrito por Requena et al. (1991) modificado por Arizcun et al. (1997). Se avaliou a atividade aminopeptidásica para dois substratos, L-lisina p-nitroanilida (Lys-pNA) e L-leucina p-nitroanilida (Leu-pNA).

O conteúdo de p-nitroanilida liberado se determinou mediante a medida da absorbância a 410 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530. Os resultados se expressaram em unidades de Atividade aminopeptidásica (U), onde 1 U é o incremento de 0,001 unidades de absorbância em um minuto.

7.3.8 Análises Estatísticas:

Se aplicou as análises da variância (ANOVA) usando o teste de Student-Newman-Keuls programa, IBM SPSS Statistics, versão 18.2 (SPSS Inc., Chicago, IL., EUA).

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *Lactobacillus* spp. mostraram diferenças significativas para os valores de atividade acidificante, com valores de decréscimo das médias de pH compreendidos entre 0,22 a 1,68 U (Tabela 1). Apesar desse gênero de BAL não ser considerado como principal produtor de ácido no início do processo de elaboração do queijo, ao longo do período de maturação ele produzirá ácidos que ajudaram neste processo. As cepas com redução de pH significativamente maiores ($P < 0,05$) após 24 horas de incubação foram a Lb 30 e Lb 49, que reduziram o pH em 1,68 U e 1,53 U em média, respectivamente. Os resultados mostraram que 86% dos *Lactobacillus* avaliados apresentaram valores de

redução do pH inferiores a uma unidade, semelhante aos resultados observados por Nieto-Arribas et al., (2009) que encontraram 90% dos isolados com baixa capacidade acidificante, e aos observados por Menéndez et al., (2000), que descrevem que os *Lactobacillus* estudados por eles também mostraram baixa redução do pH. BAL são consideradas altamente acidificantes quando reduzem mais de duas unidades de pH, como se observa frequentemente entre cepas de *Lactococcus*, que são as principais integrantes da composição do fermento com função de acidificar o leite. Os *Lactobacillus* são considerados como integrantes adjuntos.

A atividade proteolítica apresentou menores diferenças entre as cepas avaliadas, sendo as cepas Lb 37, Lb 40 e Lb 44 aquelas com maior capacidade proteolíticas ($P < 0,05$) (Tabela 1). As cepas com maior atividade acidificante não foram as que apresentaram maior atividade proteolítica, semelhante aos resultados vistos por outros autores (DURLU-OZKAYA et al., 2001, NIETO-ARRIBAS et al., 2009). Atividade proteolítica é uma propriedade importante para culturas adjuntas uma vez que pode influenciar o sabor de fundo do produto, produzindo a maioria dos precursores do aroma (YVON, 2006), influenciando diretamente as características organolépticas ao queijo, essas NSLAB originárias do leite cru estão ligadas a tipicidade destes queijos (FOULQUIE' MORENO et al., 2006)

A atividade autolítica apresentou diferenças altamente significativas, com variações entre 0,38% até 13,65% entre as cepas analisadas, as com maior destaque em relação à autólise foram as Lb 85, Lb 68 e Lb 66. A autólise celular é desejada durante o período de maturação, e nesta fase a liberação de enzimas intracelulares causada pela morte da bactéria aumentam a proteólise, incrementando o desenvolvimento das características relacionadas ao aroma, sabor e a textura. A capacidade de autólise, tem sido descrita como uma propriedade dependente da cepa (EL-SODA et a., 2000). A autólise das BAL durante a maturação tem mostrado um impacto positivo no desenvolvimento do flavour e na textura dos queijos, e é considerada como um parâmetro essencial na aceleração dos mesmos (SALLAMI et al., 2004).

Tabela 1d – Valores de médias e desvio padrão (sd) das atividades acidificante, proteolítica e autolítica das cepas de *Lactobacillus* isoladas de queijo artesanal Serrano Catarinense observadas com pHmetro e densidade óptica, respectivamente.

Cepas	Atividade acidificante (Δ pH 6 h)		Atividade acidificante (Δ pH 24 h)		Atividade proteolítica (mmol Gly/L) ¹		Atividade autolítica ¹ (%)	
	media	sd	media	sd	media	sd	Media	sd
30	0,32 ^{i-l}	0,01	1,68 ^s	0,02	1,49 ^{c-f}	0,02	4,49 ^{hij}	0,22
32	0,16 ^{a-f}	0,01	1,4 ^r	0,14	1,45 ^{b-f}	0,06	4,47 ^{hij}	0,54
33	0,34 ^{kl}	0,01	0,99 ^{no}	0,12	1,37 ^{b-e}	0,06	1,16 ^{abc}	0,89
34	0,28 ^{g-k}	0,02	0,89 ^{mno}	0,02	1,34 ^{b-e}	0,25	1,46 ^{a-e}	0,61
35	0,13 ^{a-d}	0,01	0,52 ^{d-j}	0,08	1,56 ^{c-f}	0,05	1,68 ^{a-f}	0,36
36	0,36 ^{kl}	0,07	0,87 ^{l-o}	0,02	1,05 ^{bc}	0,19	9,07 ^l	0,26
37	0,13 ^{a-d}	0,09	0,87 ^{l-o}	0,13	1,78 ^{ef}	0,04	10,38 ^m	0,6
38	0,16 ^{a-f}	0,03	1,21 ^q	0,05	1,65 ^{def}	0,13	3,65 ^{ghi}	0,33
39	0,27 ^{g-k}	0,05	0,95 ^{mno}	0,10	1,45 ^{b-f}	0,05	1,55 ^{a-e}	0,5
40	0,14 ^{a-e}	0,03	0,97 ^{mno}	0,27	1,88 ^f	0,08	2,01 ^{a-f}	0,15
41	0,29 ^{h-l}	0,05	0,77 ^{klm}	0,02	1,62 ^{def}	0,13	4,51 ^{hij}	0,33
42	0,16 ^{a-f}	0,02	0,42 ^{b-h}	0,01	1,55 ^{c-f}	0,05	2,78 ^{d-g}	0,32
43	0,27 ^{g-k}	0,03	0,69 ^{ijkl}	0,02	1,6 ^{def}	0,04	1,22 ^{a-d}	0,16
44	0,24 ^{e-i}	0,01	0,65 ^{ijk}	0,02	1,68 ^{def}	0,02	0,61 ^a	0,03
45	0,09 ^{ab}	0,08	0,32 ^{b-e}	0,12	1,27 ^{b-e}	0,18	2,75 ^{c-g}	0,69
46	0,07 ^a	0,03	0,55 ^{e-j}	0,11	1,35 ^{b-e}	0,21	3,69 ^{ghi}	1,47
47	0,31 ^{i-l}	0,03	0,63 ^{h-k}	0,06	0,97 ^b	0,23	2,99 ^{e-h}	0,18
48	0,17 ^{a-f}	0,03	0,45 ^{b-i}	0,05	1,17 ^{bcd}	0,19	7,48 ^k	0,57
49	0,34 ^{kl}	0,05	1,53 ^r	0,06	1,27 ^{b-e}	0,24	0,38 ^a	0,15
50	0,11 ^{a-d}	0,01	0,23 ^{ab}	0,01	1,26 ^{bcd}	0,23	3,15 ^{fgh}	0,66
51	0,11 ^{a-d}	0,03	0,4 ^{b-g}	0,05	1,18 ^{bcd}	0,1	12,4 ^o	1,25
52	0,14 ^{a-d}	0,06	0,45 ^{c-i}	0,04	1,39 ^{b-f}	0,04	0,83 ^a	0,22
53	0,27 ^{g-k}	0,04	1,41 ^r	0,11	1,42 ^{b-f}	0,09	2,6 ^{b-g}	0,78
54	0,1 ^{abc}	0,02	0,31 ^{bcd}	0,08	1,35 ^{b-e}	0,18	1,32 ^{a-d}	0,13
55	0,34 ^{kl}	0,01	0,53 ^{e-j}	0,05	1,24 ^{bcd}	0,07	1,09 ^{ij}	0,12
56	0,28 ^{g-k}	0,02	0,56 ^{f-j}	0,05	1,27 ^{b-e}	0,08	1,76 ^{ab}	0,72
57	0,37 ^l	0,03	0,63 ^{h-k}	0,01	1,41 ^{b-f}	0,06	0,5 ^{a-f}	0,58
58	0,08 ^a	0,04	0,38 ^{b-f}	0,01	1,55 ^{c-f}	0,58	0,56 ^a	0,24
65	0,07 ^{ab}	0,06	0,22 ^{b-e}	0,19	0,38 ^a	0,11	2,72 ^a	0,8
66	0,09 ^{ab}	0,06	0,46 ^{c-i}	0,02	1,55 ^{c-f}	0,18	12,12 ^{c-g}	1,15
68	0,07 ^a	0,05	0,56 ^{f-j}	0,03	1,47 ^{c-f}	0,06	12,78 ^o	0,35
69	0,2 ^{c-h}	0,03	0,98 ^{no}	0,04	1,48 ^{c-f}	0,05	7,91 ^{op}	0,42
75	0,2 ^{c-h}	0,02	0,66 ^{ijk}	0,02	1,43 ^{b-f}	0,03	5,42 ^k	0,56
76	0,15 ^{a-e}	0,02	0,32 ^{b-e}	0,08	1,33 ^{b-e}	0,14	3,22 ^j	0,27
77	0,21 ^{d-h}	0,01	0,6 ^{g-k}	0,06	0,32 ^a	0,03	0,89 ^{fgh}	0,26
78	0,15 ^{a-f}	0,03	0,38 ^{b-f}	0,10	1,22 ^{bcd}	0,11	0,54 ^a	0,37
79	0,2 ^{c-h}	0,02	0,8 ^{k-n}	0,17	1,58 ^{def}	0,38	0,81 ^a	0,27

80	0,2 ^{c-h}	0,01	0,42 ^{b-h}	0,03	1,47 ^{c-f}	0,25	0,89 ^a	0,59
82	0,13 ^{a-d}	0,02	0,13 ^a	0,02	0,1 ^a	0,01	0,41 ^a	0,18
83	0,16 ^{a-f}	0,02	1,07 ^p	0,08	0,32 ^a	0,01	3,61 ^a	0,34
84	0,13 ^{a-d}	0,02	0,28 ^{bc}	0,03	1,59 ^{def}	0,15	9,46 ^{ghi}	0,32
85	0,25 ^{f-j}	0,02	0,78 ^{k-n}	0,03	1,51 ^{c-f}	0,1	13,65 ^{lm}	1,16
86	0,19 ^{b-g}	0,02	0,92 ^{mno}	0,03	0,33 ^a	0,01	4,78 ^p	0,95

[†] diminuição da densidade óptica

* (a/l) acidificante 6h, (a/s) acidificante 24h, (a/f) proteolítica, (a/p) autolítica indicam que as médias sem sobrescritos comuns são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração do autor

Seis cepas de *Lactobacillus* apresentaram capacidade lipolítica, as Lb 53, Lb 79, Lb 83, Lb 86 (Tabela 2). De acordo com McSweeney; Sousa (2000) a lipólise é um fenômeno bioquímico que, com a liberação de ácidos graxos e glicerídeos a partir da quebra da gordura do leite, conferem sabor e aroma ao queijo, assim como influenciam a textura. As BAL usadas como integrantes em fermentos devem apresentar baixa atividade lipolítica, a fim de evitar a produção de aroma sem sabor de ranço. Os resultados deste estudo diferem dos encontrados por Pérez et al., (2003) em queijos Tenerife e por Nieto-Arriba et al., (2009) em queijo Manchego que relatam que nenhuma cepa de *Lactobacillus* mostrou atividade lipolítica em ágar Tributirina.

Para aminas biogênicas foi observado que as cepas Lb 48, Lb 65, Lb 77, Lb 80, Lb 82, Lb 83 foram capazes de descarboxilar a L-histidina. Não se observou nas cepas estudadas a capacidade de descarboxilar a L-ornitina, L-tirosina, L-lisina. Algumas aminas biogênicas podem ser tóxicas inclusive quando ingeridas em baixas concentrações. Cepas com produção de aminas biogênicas são indesejáveis, não devendo ser adicionadas a formulações de fermentos lácticos. A identificação de cepas com capacidade aminobiogênica para composição de fermentos é necessária em virtude dos riscos toxicológicos que podem derivar se da presença de aminas biogênicas no queijo (MARTÍN-PLATERO et al. 2009; FERNÁNDEZ et al., 2010). Alguns autores observaram que alguns *Lactobacillus* possuem a capacidade de descarboxilar a L-tirosina em tiramina (ROIG-SAGUÉS et al., 2002; MADERA et al., 2003; NIETO-ARRIBA et al., 2009).

Em relação a atividade aminopeptidásica todas as cepas apresentaram a atividade Leu-aminopeptidase mais elevada que Lys-aminopeptidase, com destaque para a Leu-pNA das cepas Lb 83, Lb 30, Lb 49 e Lys-pNA as Lb 80, Lb 84, Lb 77, Lb 33 ($P < 0,05$) (Tabela 2). Estes resultados diferem

de Macedo et al., (2000) que encontraram os valores de Lys-aminopeptidase mais elevadas que Leu-aminopeptidase. Porém, assemelham se com os resultados obtidos por Nieto-Arribas et al., (2009). Cepas com boa capacidade aminopeptidásica são ideais para integrar um fermento láctico, uma vez que elas conseguem hidrolisar peptídeos que causariam sabor amargo no queijo.

Tabela 2d – Médias e Desvio Padrão (sd) da Atividade Aminopeptidásica (a-q) para Leucina e (a-o) para Lisina indicam que valores sem sobrescritos comuns são significativamente diferentes ($p < 0,05$) e resultados para Aminas Biogênicas e Lipólise por cepas de *Lactobacillus* isoladas de queijo artesanal Serrano Catarinense.

Isolados	Lipólise	Aminas Biogênicas *				Atividade Aminopeptidásica ¹			
		L-Tirosina	L-Histidina	L-Ornitina	L-Lisina	L-Leucina		L-Lisina	
						Média	sd	Média	sd
Lb 30	-	-	-	-	-	0,45 ^p	0,03	0,04 ^{b-h}	0,01
Lb 32	-	-	-	-	-	0,25 ^{m, p}	0,01	0,03 ^b	0,01
Lb 33	-	-	-	-	-	0,21 ^{l, m}	0,01	0,03 ^m	0,01
Lb 34	-	-	-	-	-	0,16 ^{d-i}	0,01	0,03 ^{b, c}	0,01
Lb 35	-	-	-	-	-	0,1 ^b	0,01	0,05 ^{d-i}	0,01
Lb 36	-	-	-	-	-	0,19 ^{g-m}	0,01	0,09 ^l	0,01
Lb 37	-	-	-	-	-	0,2 ^{h-m}	0,01	0,04 ^{b-f}	0,01
Lb 38	-	-	-	-	-	0,18 ^{e-k}	0,01	0,04 ^{b, c, d}	0,01
Lb 39	-	-	-	-	-	0,18 ^{f-l}	0,003	0,03 ^{b, c}	0,003
Lb 40	-	-	-	-	-	0,15 ^{d-g}	0,02	0,04 ^{b-e}	0,01
Lb 41	-	-	-	-	-	0,18 ^{f-l}	0,01	0,05 ^{e-i}	0,01
Lb 42	-	-	-	-	-	0,21 ^{j-m}	0,01	0,05 ^{c-h}	0,01
Lb 43	-	-	-	-	-	0,2 ^{i-m}	0,06	0,06 ^{g-j}	0,01
Lb 44	-	-	-	-	-	0,22 ^m	0,01	0,05 ^{d-i}	0,01
Lb 45	-	-	-	-	-	0,26 ^o	0,01	0,07 ^{j-k}	0,01
Lb 46	-	-	-	-	-	0,1 ^b	0,01	0,04 ^{b-h}	0,01
Lb 47	-	-	-	-	-	0,27 ^o	0,01	0,03 ^{b, c}	0,01
Lb 48	-	-	+	-	-	0,18 ^{f-l}	0,01	0,04 ^{b-g}	0,01
Lb 49	-	-	-	-	-	0,47 ^p	0,04	0,07 ^k	0,01
Lb 50	-	-	-	-	-	0,11 ^{b, c}	0,01	0,04 ^{b-f}	0,01
Lb 51	-	-	-	-	-	0,25 ^{n, o}	0,01	0,06 ^{i, j, k}	0,01
Lb 52	-	-	-	-	-	0,14 ^{c, d, e}	0,01	0,04 ^{b-f}	0,01
Lb 53	+	-	-	-	-	0,03 ^a	0,01	0,01 ^a	0,01
Lb 54	-	-	-	-	-	0,17 ^{e-i}	0,01	0,03 ^{b, c}	0,01
Lb 55	-	-	-	-	-	0,15 ^{d-g}	0,01	0,04 ^{b-f}	0,01

Lb 56	-	-	-	-	-	0,17 ^{e-j}	0,01	0,07 ^{j,k}	0,01
Lb 57	-	-	-	-	-	0,16 ^{d-g}	0,01	0,06 ^{h-k}	0,01
Lb 58	-	-	-	-	-	0,13 ^{b,c,d}	0,01	0,1 ^l	0,01
Lb 65	-	-	+	-	-	0,17 ^{e-k}	0,01	0,04 ^{b-e}	0,01
Lb 66	-	-	-	-	-	0,1 ^b	0,01	0,06 ^{i,j,k}	0,01
Lb 68	-	-	-	-	-	0,12 ^{b,c}	0,01	0,09 ^l	0,01
Lb 69	-	-	-	-	-	0,15 ^{d-g}	0,01	0,05 ^{d-i}	0,02
Lb 75	-	-	-	-	-	0,23 ^{m,n}	0,02	0,04 ^{b-g}	0,01
Lb 76	-	-	-	-	-	0,14 ^{c,d,e}	0,01	0,04 ^{b-h}	0,01
Lb 77	-	-	+	-	-	0,15 ^{d-g}	0,01	0,1 ^m	0,01
Lb 78	-	-	-	-	-	0,16 ^{d-h}	0,01	0,05 ^{f-i}	0,01
Lb 79	+	-	-	-	-	0,15 ^{d,e,f}	0,01	0,05 ^{c-h}	0,01
Lb 80	-	-	+	-	-	0,27 ^o	0,01	0,15 ^o	0,01
Lb 82	-	-	+	-	-	0,06 ^a	0,01	0,04 ^{b-f}	0,01
Lb 83	+	-	+	-	-	0,5 ^q	0,01	0,07 ^{j,k}	0,01
Lb 84	-	-	-	-	-	0,22 ^{l,m}	0,01	0,13 ⁿ	0,01
Lb 85	-	-	-	-	-	0,21 ^{k,l,m}	0,01	0,04 ^{b-g}	0,01
Lb 86	+	-	-	-	-	0,27 ^o	0,02	0,06 ^{g-j}	0,01

[†] Unidade de atividade aminopeptidásica. 1 U de enzima igual a um aumento de absorbância de 0,001 unidade a 410 nm em 1 min.

*Resultado para aminas biogênicas e lipólise expressos em (-) negativo e (+) positivo.

(a-m) Lysina, (a-q) Leucina indicam que as médias sem sobrescritos comuns são significativamente diferentes (p<0,05).

7.5 CONCLUSÃO

As cepas de *Lactobacillus* estudadas apresentaram heterogeneidade quanto às características tecnológicas estudadas, variando significativamente quando a atividade acidificante. No entanto as médias da atividade proteolítica e da atividade aminopeptidásica foram mais interessantes. Mesmo assim apenas duas cepas apresentaram bons resultados para estas duas características, foram elas a Lb 30 e Lb 49, que poderiam ser utilizadas na composição como cultivo adjunto em um fermento, e mesmo para auxiliar na manutenção das características sensoriais do queijo Artesanal Serrano Catarinense quando produzido com leite pasteurizado.

7.6 REFERÊNCIAS

- ARIZCUN, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazábal cheese. **Lait**, v.77, 729–736, 1997.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal Food Microbiology**, v. 53, p. 33-41, 1999.
- CHURCH, F.C.; SWAISGOOD, H.E.; PORTER, D.H. et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. **Journal Dairy Science**. v. 66, p. 1219-1227, 1983.
- CHURCH, F.C.; PORTER, D.H.; CATIGNANI, G.L. et al. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. **Analytical Biochemistry**, v.146, p. 343:348, 1985.
- CARRASCO, M.S.; SCARINCINI, H.E.; SIMONETTA, A.C. Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v. 57. n. 1, 15-19, 2002.
- DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS; V., TINAIL, N. Technologically important properties of lactic acid bacteria from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 861–870, 2001.
- EL-SODA, M. MADKOR, S. A.; TONG, P. S. Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 4. Comparison between attenuated and not attenuated *lactobacilli*. **Milchwissenschaft**, v.55, p. 260–263, 2000.
- FERNÁNDEZ, E.; ALEGRÍA, A.; DELGADO, S. et al. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, 142-148, 2010.

- FOULQUIE' MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E. et al. The role and application of *enterococci* in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1–24, 2006.
- FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**. v. 19, p. 3-11, 2009.
- GARRIGA, M.; HUGAS, M.; GOU, P. et al. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 32, p. 173–183, 1996.
- IDE, L. P. A .; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**., v. 25, n. 6, p. 1351-1358, nov./dez., 2001.
- LANSGRUD, T.; LANDAAS, A.,; CASTEBERG, H. B. Autolytic properties of different strains of group N streptococci. **Milchwissenschaft**, v. 42, p. 556–560, 1987.
- 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.
- MACEDO, A.C., VIEIRA, M., POÇAS, R. Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 769–774, 2000.
- MADERA, C., GARCÍA, P., JANZEN, T. et al. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal Food Microbiology**, v. 86, p. 213–222, 2003.
- MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Food Microbiology**, v. 132, p. 24-32, 2009.
- McSWEENEY, P.L.H., SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. A review. **Lait**, v. 80, p. 293–324, 2000.
- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J. A., GODÍNEZ, R. Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. **International Dairy Journal**, v. 59, p. 37–46, 2000.
- MORANDI, S., BRASCA, M., ANDRIGHETTO, C. et al. Technological characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 867-875, 2006.
- NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J.M.; SESEÑA, S. et al. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092–1098, 2009.

NUNES, I. R.; JESUS, N. N. Área geográfica de produção, importância econômica e comercialização. In: CORDOVA, U. A.; SANTOS, A. P. dos; PUCCI, A. A.; et al. **O queijo artesanal serrano nos campos do planalto das araucárias catarinense**. Florianópolis: GMC/Epagri. 2011. P. 53-63.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 831-844, 2005.

PÉREZ, G., CARDELL, E., ZÁRATE, V. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. **International Journal Food Science Technology**, v. 38, p. 537-546, 2003.

REQUENA, T.; PELAEZ, C.; DESMAZEAUD, M.J. Characterization of *lactococci* and *lactobacilli* isolated from semi-hard goat's cheese. **Journal Dairy Research**. v. 58, p. 137-145, 1991.

ROIG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **Europe Food Res. Technology**. v. 215, p. 96-100, 2002.

SILVA, R.A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 6, p. 1732-1738, 2012.

SALLAMI, L., KHEADR, E. E., FLISS, I. et al. Impact of autolytic, proteolytic and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1585-1594, 2004.

SERHAN, M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; BORGES, F. et al. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. **Food Microbiology**, v.26, p. 645-652, 2009.

SHEEHAN, J.J., WILKINSON, M.G., MCSWEENEY P.L.H. Influence of processing and ripening parameters on starter, non starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 905-917, 2008.

YVON, M. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 61, p. 16-24, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho possibilitaram conhecer a microbiota láctica das amostras de queijos estudadas, o que permite estimar a composição microbiana láctica do queijo artesanal Serrano como um todo.

A microbiota autóctone das bactérias ácido lácticas (BAL) do queijo artesanal Serrano demonstrou ser composta por quatro gêneros: *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Enterococcus* spp. No entanto, a distribuição dos gêneros nas amostras não foi homogênea, Os resultados mostraram que as contagens de BAL isoladas das amostras de queijos variaram de $5,2 \times 10^7$ UFC/g a $9,4 \times 10^8$ UFC/g. Dentro dos gêneros identificados, o *Lactobacillus* foi o que apresentou maior numero de isolados em relação aos demais.

Nenhuma das amostras de queijo avaliadas atenderam aos padrões de segurança alimentar determinados na legislação brasileira. Três amostras de queijo apresentaram *Listeria monocytogenes*, 7 amostras de queijo apresentaram *Staphylococcus* coagulase positivo, 11 amostras continham *Escherichia coli* acima do padrão legal para queijo de média umidade. Não foi isolada *Salmonella* spp. em nenhuma amostra. Os resultados mostram que o queijo artesanal Serrano merece maior atenção em relação a sua qualidade microbiológica pelas autoridades de saúde do estado de Santa Catarina.

Quanto ao antagonismo das BAL à patógenos, os resultados foram variados. Não se evidenciou um gênero de BAL com potencial antagônico contra os quatro patógenos ao mesmo tempo. Entre as cepas estudadas, algumas não apresentaram nenhum tipo de antagonismo, *Lactobacillus* spp. se destacou com maior antagonismo a *Listeria monocytogenes*; *Enterococcus* spp. contra *Escherichia coli* e *Salmonella* Thyphimurium; *Leuconostoc* spp. foi predominante antagonista a *Staphylococcus aureus*. Quanto ao tipo de antagonismo, houve predominância de antagonismo total, e estas cepas podem ser utilizadas na elaboração do queijo Artesanal Serrano com a finalidade de colaborar com a segurança microbiológica do alimento.

A avaliação das características tecnológicas das BAL selecionadas neste trabalho mostrou que das 19 cepas de *Lactococcus* estudadas, quatro (Lc23, Lc 26, Lc 72 e Lc 74) apresentaram melhores resultados em relação às demais. Três destas cepas mostraram bons resultados na atividade acidificante, importante para

este gênero conhecido por ser responsável pela redução de pH do leite na fabricação de queijos. A cepa Lc 23 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) se destacou com melhores resultados nas atividades acidificante, proteolítica e autolítica, que evidencia sua capacidade de acidificar o leite e de produzir aroma e sabor aos queijos, podendo ser utilizada como constituinte de um cultivo iniciador.

Das 12 cepas *Leuconostoc* avaliadas em relação a suas características tecnológicas, seis (Ln 2, Ln 3, Ln 5, Ln 9, Ln 10 e Ln 60) apresentaram resultados desejáveis, com destaque nas atividades aminopeptidásica, lipolítica e na produção de dextrano que têm importância no desenvolvimento de sabor, aroma e textura, estas cepas também poderiam compor fermentos.

Dentre os *Lactobacillus* spp. estudados, apenas duas cepas se destacaram apresentando bons resultados para atividade acidificante e aminopeptidásica. No entanto, outras cepas mostraram bons resultados em apenas uma avaliação, podendo de acordo com a característica tecnológica evidenciada, também vir a compor um fermento láctico.

As cepas autóctones estudadas com melhores resultados na avaliação das características tecnológicas, apresentam condições para compor fermentos lácticos, assim como, cepas com potencial antagônico, que podem colaborar com a segurança microbiológica do queijo artesanal Serrano e, ao mesmo tempo, manter suas características peculiares de sabor e aroma.

Como as cepas com potencial tecnológico e potencial antagônico são diferentes, um fermento interessante tecnologicamente e sanitariamente deveria ser composto por um *mix* das cepas que demonstraram melhores potenciais para as características desejadas.

Outros estudos são necessários para aprimorar a proporcionalidade das cepas dos três gêneros com potencial tecnológico para confecção de um fermento industrial, que resulte em um queijo artesanal Serrano Catarinense que preserve ou recomponha as características originais do produto e permita que ele possa ser elaborado com leite pasteurizado.

ANEXOS

Tabela 1d – Contagem total (UFC/g) de Bactérias Ácido Láticas em amostras de queijos artesanal Serrano Catarinense, produzidas no município de Lages/SC.

Amostras de Queijos	UFC/g
Q 1	1,56x10 ⁸
Q 2	1,62x10 ⁸
Q 3	1,09x10 ⁸
Q 4	1,65x10 ⁸
Q 5	1,6x10 ⁸
Q 6	9,2x10 ⁷
Q 7	1,27x10 ⁸
Q 8	9,2x10 ⁸
Q 9	5,4x10 ⁸
Q 10	1,69x10 ⁸
Q 11	4,0x10 ⁸
Q 12	8,8x10 ⁸
Q 13	7,8x10 ⁸
Q 14	6,5x10 ⁸
Q 15	9,4x10 ⁸
Q 16	5,2x10 ⁷
Q 17	8,2x10 ⁷
Q 18	1,1x10 ⁸
Q 19	9,5x10 ⁷
Q 20	4,0x10 ⁸

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Tabela 2d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 19 cepas de *Lactococcus* avaliadas para as caracterizações tecnológicas.

Identificação	Bactéria Ácido Lática	Queijo
Lc 12	<i>Lactococcus lactis</i>	Q6
Lc 14	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q2
Lc 15	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q2
Lc 16	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q2
Lc 17	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q1
Lc 18	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q4
Lc 19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q4
Lc 20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q5
Lc 21	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q5
Lc 22	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q7
Lc 23	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Q8
Lc 24	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q13
Lc 25	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q13
Lc 26	<i>Lactococcus</i> sp.	Q13
Lc 28	<i>Lactococcus garvieae</i>	Q16
Lc 29	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q17
Lc 59	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q1
Lc 72	<i>Lactococcus lactis</i>	Q18
Lc 74	<i>Lactococcus lactis</i>	Q18

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Tabela 3d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 12 cepas de *Leuconostoc* avaliadas para as caracterizações tecnológicas.

Numero	Bactéria Ácido Láctica	Queijo
Ln 02	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Q1
Ln 03	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Q1
Ln 04	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q3
Ln 05	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q3
Ln 06	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Q6
Ln 07	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q7
Ln 08	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Q8
Ln 09	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Q10
Ln 10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q11
Ln 11	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Q12
Ln 60	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q3
Ln 61	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Q8

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Tabela 4d – Identificação do queijo artesanal Serrano de origem das 43 cepas de *Lactobacillus* avaliadas para as caracterizações tecnológicas

Cepa	Cepas de <i>Lactobacillus</i>		Queijo
	Queijo	Cepa	
30	Q6	53	Q14
32	Q6	54	Q14
33	Q6	55	Q14
34	Q1	56	Q14
35	Q1	57	Q14
36	Q1	58	Q15
37	Q4	65	Q15
38	Q4	66	Q17
39	Q3	68	Q17
40	Q7	69	Q18
41	Q4	75	Q19
42	Q4	76	Q19
43	Q8	77	Q19
44	Q8	78	Q19
45	Q9	79	Q19
46	Q9	80	Q20
47	Q9	82	Q20
48	Q10	83	Q20
49	Q10	84	Q16
50	Q11	85	Q16
51	Q12	86	Q16
52	Q12		

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Tabela 5d – Cepas de BAL (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*) com melhores resultados encontrados nas análises realizadas para verificação da capacidade tecnológica.

Capacidade Tecnológica	Ln 02	Ln 03	Ln 05	Ln 09	Ln 10	Ln 60	Lc 23	Lc 26	Lc 72	Lc 74	Lb 30	Lb 49
Dextrano	X	X		X	X	X						
R. Acidez		X	X									
R. NaCl	X	X	X	X	X	X		X		X		
R. Temperatura												
Lipolítica	X	X		X	X							
Autolítica			X			X	X			X		
Proteolítica				X			X	X				
Acidificante				X			X	X	X		X	X
L-lisina PNA	X	X			X	X				X		
L-Leucina PNA	X		X		X	X			X	X	X	X
L-Tirosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L- Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. Thyphimurium</i>	P	T	P	N	T	P	T	P	P	P	T	P
<i>L.monocytogenes</i>	T	P	P	P	T	T	T	P	P	P	T	T
<i>S. aureus</i>	T	P	T	T	T	T	P	P	P	T	P	T
<i>E. coli</i>	T	T	T	P	P	T	T	P	P	T	T	P

X – melhores resultados encontrados nas análises de verificação da capacidade tecnológica de BAL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Tabela 6d – Micro-organismos isolados do queijo artesanal Serrano, com resultados expresso em positivo ou negativo para *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* e em UFC/g para *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli* e BAL (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*).

Amostra	Patógenos	BAL	Lactobacillus spp.	Lactococcus spp.	Leuconostoc spp.	Enterococcus spp.	
Q1	<i>Staphylococcus</i> sp.	4,3x10 ⁵	1,56x10 ⁸	3,6x10 ⁷	1,02x10 ⁸	1,8x10 ⁷	-
	<i>E. coli</i>	2,0x10 ³					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q2	<i>Staphylococcus</i> sp.	4,4x10 ⁵	1,62x10 ⁸	-	1,62x10 ⁸	-	-
	<i>E. coli</i>	5,9x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q3	<i>Staphylococcus</i> sp.	8x10 ⁴	1,09x10 ⁸	1,36x10 ⁷	2,73x10 ⁷	6,81x10 ⁷	-
	<i>E. coli</i>	2,2x10					
	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q4	<i>Staphylococcus</i> sp.	1,09x10 ⁶	1,65x10 ⁸	1,44x10 ⁸	2,06x10 ⁷	-	-
	<i>E. coli</i>	5,8x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q5	<i>Staphylococcus</i> sp.	2,5x10 ⁶	1,6x10 ⁸	-	1,37x10 ⁸	-	2,29x10 ⁷
	<i>E. coli</i>	4,1x10 ⁶					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q6	<i>Staphylococcus</i> sp.	5,7x10 ⁵	9,2x10 ⁷	2,98x10 ⁷	5,41x10 ⁷	2,71x10 ⁶	5,41x10 ⁶
	<i>E. coli</i>	1,0x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q7	<i>Staphylococcus</i> sp.	1,29x10 ⁶	1,27x10 ⁸	9,77x10 ⁶	3,91x10 ⁷	4,88x10 ⁶	7,33x10 ⁷
	<i>E. coli</i>	1,8x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					

Q8	<i>Staphylococcus</i> sp.	1,4x10 ⁷	9,2x10 ⁸	4,44x10 ⁸	4,44x10 ⁸	3,17x10 ⁷	-
	<i>E. coli</i>	1,5x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q9	<i>Staphylococcus</i> sp.	2,5x10 ⁶	5,4x10 ⁸	3,02x10 ⁸	2,38x10 ⁸	-	-
	<i>E. coli</i>	2,1x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q10	<i>Staphylococcus</i> sp.	3,3x10 ⁶	1,69x10 ⁸	1,60x10 ⁸	-	9,39x10 ⁶	-
	<i>E. coli</i>	03x10 ²					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q11	<i>Staphylococcus</i> sp.	2,01x10 ⁷	4,0x10 ⁸	3,48x10 ⁷	3,13x10 ⁸	5,22x10 ⁷	-
	<i>E. coli</i>	5,9x10 ⁴					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q12	<i>Staphylococcus</i> sp.	5,1x10 ⁵	8,8x10 ⁸	7,17x10 ⁸	6,52x10 ⁷	6,52x10 ⁷	3,26x10 ⁷
	<i>E. coli</i>	05x10					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q13	<i>Staphylococcus</i> sp.	4,6x10 ⁵	7,8x10 ⁸	-	7,45x10 ⁸	-	3,55x10 ⁷
	<i>E. coli</i>	1					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q14	<i>Staphylococcus</i> sp.	3,3x10 ⁵	6,5x10 ⁸	5,37x10 ⁸	1,13x10 ⁸	-	-
	<i>E. coli</i>	1,4x10 ⁵					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q15	<i>Staphylococcus</i> sp.	1,49x10 ⁶	9,4x10 ⁸	2,74x10 ⁸	6,66x10 ⁸	-	-
	<i>E. coli</i>	1					
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q16	<i>Staphylococcus</i> sp.	8,9x10 ⁷	5,2x10 ⁷	3,12x10 ⁷	2,08x10 ⁷	-	-
	<i>E. coli</i>	03x10					

	<i>L. monocytogenes</i>	Positivo					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q17	<i>Staphylococcus</i> sp.	$1,0 \times 10^5$					
	<i>E. coli</i>	$5,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^7$	$6,49 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q18	<i>Staphylococcus</i> sp.	$8,3 \times 10^7$					
	<i>E. coli</i>	1	$1,1 \times 10^8$	$7,86 \times 10^7$	$3,14 \times 10^7$	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q19	<i>Staphylococcus</i> sp.	$1,57 \times 10^6$					
	<i>E. coli</i>	$8,8 \times 10^2$	$9,5 \times 10^7$	$9,5 \times 10^7$	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					
Q20	<i>Staphylococcus</i> sp.	$2,4 \times 10^7$					
	<i>E. coli</i>	08×10	$4,0 \times 10^8$	$3,83 \times 10^8$	-	-	$1,67 \times 10^7$
	<i>L. monocytogenes</i>	Ausente					
	<i>Salmonella</i> sp.	Ausente					

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

ANEXO A

Propriedades Tecnológicas

Atividade Acidificante:

As cepas foram inoculadas a 10% em caldo MRS e foram incubadas a 37° C, em aerobiose até que os cultivos alcançaram a fase exponencial desejada. O crescimento foi determinado por medida da densidade óptica (D.O.) a 660 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530 e se padronizou todas as suspensões celulares com a mesma densidade óptica. A determinação consistiu em inocular o micro-organismo a ser avaliado (1%) em 10 mL de leite desnatado estéril (Oxoid) e incubar a 37° C. A capacidade acidificante foi calculada como a ΔpH ocorrida durante a incubação ($\Delta\text{pH} = \text{pH}$ após incubação – pH inicial do leite), para o que se efetuou uma medida do pH antes da inoculação, após 6 h e após 24 horas de incubação. As medidas se realizaram com um pHmetro (Crison pH metro Basic 20, Crison – Barcelona) (GARRIGA et al. 1996).

Atividade Proteolítica:

A quantificação da atividade proteolítica dos isolados foi realizada pelo método espectrofotométrico descrito por Church et al., (1983) e modificado posteriormente por Church et al., (1985). O método está baseado na relação do o-phthaldialdeído (oPA) e o β -mercaptoetanol com as amins, formando 1,2-inositol que absorve a densidade óptica (D.O.) 340 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530.

As cepas foram inoculadas a 10% em caldo MRS e foram incubadas em sua temperatura ótima de crescimento (37° C) em condições aeróbias até que os cultivos alcançaram a fase exponencial. O crescimento foi determinado por medida da D.O. a 660 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530. Uma vez que se alcançou a fase exponencial se centrifugou a máxima potencia durante 5 min., as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato 32 mM pH 7,2, para minimizar o aporte de aminoácidos desde meio de cultivo e se padronizou todas as suspensões celulares a mesma densidade óptica. As células foram resuspendidas no mesmo volume original (1 mL) e se inocularam a 1% em leite desnatado em pó

(Oxoid) reconstituído a 10%, incubando-se durante 24 h. a 22° C. Posteriormente, foram transferido 0,5 mL do cultivo em um eppendorf e foi acrescentado 100 µL de água destilada e 1 mL de ácido tricloroacético para deter a reação, agitando se a mistura. Depois de 10 min., a mistura foi centrifugada durante 5 min. A 15000 g. e conservado o sobrenadante até análises posterior. A determinação foi realizada com a adição de 50 µL do sobrenadante em 1 mL da solução de oPA. Incubou se durante 2 minutos a temperatura ambiente, e se mediu o incremento de absorbância a 340 nm.

Os resultados se expressaram como mmol glicina/L (mmol Gly/L), interpolando os valores de absorbância em uma curva de glicina de concentrações compreendidas entre 0,1 mM e 10 mM.

Atividade Autolítica:

A capacidade autolítica dos isolados se determinou em cultivos crescidos até a metade da fase exponencial de crescimento em caldo MRS (D.O.660 = 0,7-0,8). Depois os cultivos foram lavados por centrifugação a 10.000 g. durante 10 minutos a 4° C, resuspendendo-se as células em tampão fosfato sódico 20 mM, pH 6,8 (D.O.660=0,6-0,7). As suspensões celulares em tampão foram incubadas durante 4 h. a 37° C e se mediu o decréscimo de densidade óptica a 660 nm cada 30 min. Em um leitor de microplacas (Sinergy HT, Biotek, España). A capacidade autolítica foi expressada segundo Lansgrud et al. (1987) como $100 - (A1/A2 \times 100)$, onde A1 e A2 são a mínima e máxima densidade celular, respectivamente, medidas durante a incubação.

Atividade Lipolítica:

Para avaliar a capacidade lipolítica das cepas se utilizou o meio de cultivo enriquecido com gordura – Ágar Tributirina.

As cepas foram inoculadas a 10% em caldo MRS e foram incubadas a sua temperatura ótima de crescimento, em condições aeróbias até que os cultivos alcançaram a fase exponencial. A partir da cepa revitalizada se realizou uma semeadura por estria em ágar Tributirina e se incubou durante 7 h. a 37° C. A

presença de um halo ao redor da colônia foi interpretado como lipólise positiva (Morandi et al., 2006).

Produção de Aminas Biogênicas:

Antes de realizar os experimentos e com o objetivo de induzir a produção das correspondentes enzimas, as cepas foram subcultivadas seis vezes, a intervalos de 48 h., em caldo MRS ao qual foi acrescentado 0,1% (p/v) do aminoácido substrato da enzima a determinar (L-tirosina (Sigma), L-histidina (Sigma), L-ornitina monoclóridrato (Merck) o L-lisina monoclóridrato (Merck)), e 0,005% do cofator piridoxal-5-fosfato (Sigma) (Bover-Cid y Holzapfel, 1999).

A atividade amino-descarboxilasa das cepas foi analisada utilizando o método qualitativo descrito por Bover-Cid; Holzapfel (1999). Se realizou uma semeadura em estria da cepa objeto de estudo, em um meio que contém o aminoácido a ser analisado e o indicador de pH púrpura de bromocresol. A prova foi considerada positiva se, depois da incubação, no meio se produz uma virada da cor amarelo a púrpura como consequência do aumento de pH produzido pela descarboxilação do aminoácido. No caso da tirosina, por tratar se de um composto insolúvel, se considerou que a análise foi positivo quando ao redor da estria desaparecem os cristais do aminoácido.

Atividade Aminopeptidásica:

A atividade aminopeptidásica das cepas foi analisada utilizando o método descrito por Requena et al. (1991) modificado por Arizcun et al. (1997). Se avaliou a atividade aminopeptidásica para dois substratos, L-lisina p-nitroanilida (Lys-pNA) e L-leucina p-nitroanilida (Leu-pNA).

As cepas foram inoculadas a 10% em caldo MRS e foram incubadas em sua temperatura ótima de crescimento (37° C) em condições aeróbias até que os cultivos alcançaram a fase exponencial. Se centrifugou a máxima potencia durante 5 min., as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Se padronizaram todas as suspenções celulares a uma D.O. equivalente ao número 4 da escala de McFarland (correspondente a uma absorbância de 1,25 a 660 nm). Posteriormente, foram transferido 0,4 mL do cultivo e se acrescentaram 200 µL da

solução do substrato a avaliar (Lys-pNa ou Leu-pNA) (Sigma-Aldrich LTDA) e 3,6 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. A mistura foi incubada com agitação em banho de água a 30° C durante uma hora. A reação foi parada acrescentando 1 mL de ácido acético a 30%(v/v). O conteúdo dos tubos se centrifugou a 5000 g. durante 10 min. A 4° C.

O conteúdo de p-nitroanilida liberado se determinou mediante a medida da absorbância a 410 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-530. Os resultados se expressaram em unidades de Atividade aminopeptidásica (U), onde 1 U é o incremento de 0,001 unidades de absorbância em um minuto.

Produção de Dextrano

Para estudar a produção de dextrano das cepas de *Leuconostoc*, cultivos crescido em caldo MRS por 24 horas foram semeados em placas com ágar Mayeaux (Scharlau) e incubado a 22° C. A produção de dextrano foi manifestada com a aparição de colônias mucosas após 5 dias de incubação. Como método para comparar a produção de dextrano pelas distintas cepas, foi realizado medidas do diâmetro das colônias mucosas (Schillinger; Lüke, 1987).

Resistência ao NaCl

As cepas foram inoculadas por duplicado a 1% em meio MRS contendo concentrações de 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0% de NaCl e se incubaram durante 24 horas a 32° C em placas de microtitulação. Transcorrido este tempo foi medido a densidade óptica a 595 nm em um leitor de microplacas (Sinergy HT, Biotek, Espanha). Os resultados se expressaram como a porcentagem de absorbância alcançada pelos cultivos com respeito à mostrada pelos cultivos controle em ausência de NaCl (Sánchez et al., 2005).

Resistência a acidez

A determinação da resistência a acidez se realizou como o já citado acima, utilizando caldo MRS previamente acidificado com ácido láctico (Panreac) a

pH 4,3; 4,6; 4,9; 5,2 e 5,5. Os resultados foram expressos utilizando como controle um cultivo com caldo MRS sem acidificar (Sánchez et al., 2005).

Resistência a temperatura

A determinação da resistência a temperatura se realizou inoculando cada cepa a 1% em caldo MRS, incubando a diferentes temperaturas (10, 15 e 20° C para os *Lactococcus*) e medindo a densidade óptica a 595 nm. Os resultados se expressaram utilizando como controle um cultivo incubado a temperatura ótima de crescimento do micro-organismos (30° C para os *Lactococcus*).