

## AVALIAÇÃO DO ASPECTO SANITÁRIO E MICROBIOTA LÁTICA DURANTE A MATURAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO

### Evaluation of sanitary quality and lactic microbiota during parmesan cheese ripening

Jupyrcyara J. C. Barros<sup>1</sup>

Analice C. Azevedo<sup>2</sup>

Daise A. Rossi<sup>3</sup>

Celso J. Moura<sup>4</sup>

Ana Lúcia B. Penna<sup>5</sup>

#### RESUMO

Em produtos lácteos, como o queijo Parmesão, a presença de bactérias do grupo coliformes e do gênero *Staphylococcus* comprometem a qualidade higiênico-sanitária do produto. Esta pesquisa objetivou verificar a qualidade sanitária e viabilidade de bactérias lácticas no leite fluido e queijo Parmesão ao longo do período de estocagem. Os queijos foram produzidos com a adição de diferentes culturas de *Lactobacillus helveticus* (A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>), submetidos à maturação a 18 °C durante 180 dias, e avaliados quanto a enumeração total de bactérias lácticas, bactérias do grupo coliforme e *Staphylococcus* coagulase positiva. O leite empregado em cada processamento foi analisado quanto a incidência destes mesmos bioindicadores, incluindo a avaliação de mesófilos e *Salmonella* sp. Todas as amostras de leite e queijo Parmesão demonstraram conformidade aos padrões legais quanto aos bioindicadores de contaminação avaliados. Os queijos apresentaram qualidade sanitária adequada e presença de bactérias lácticas, que registraram uma redução a partir de 90 dias de maturação.

**Termos para indexação:** bactéria láctica; bioindicadores de contaminação; Parmesão; maturação.

#### 1 INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes etapas de fabricação do queijo Parmesão, destaca-se a bioconversão dos constituintes do leite pasteurizado ou *in natura* pelo complexo enzimático da microbiota autóctone e/ou exógena. Estas mudanças químicas

e bioquímicas, observadas na coalhada e no queijo ao longo da maturação, quando processadas de forma satisfatória, agregam valor a matéria-prima, e ainda, asseguram a qualidade sensorial do produto pronto para consumo.

A tecnologia de fabricação do queijo Parmesão exige que o leite, integral ou

- 1 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto - SP, Brasil, jupyscbarros@hotmail.com
- 2 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto - SP, Brasil, analiceazevedo@hotmail.com
- 3 Doutora em Ciência dos Alimentos. UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Uberlândia, Avenida Ceará, s/n, 38402-018, Uberlândia - MG, Brasil, daiser@umarama.ufu.br
- 4 Doutor em Ciência dos Alimentos. UFG - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Campus Samambaia, Rodovia Goiânia/Nova Veneza, Km 0, 74001-970, Goiânia - GO, cjdmoura@agro.ufg.br
- 5 Doutora em Tecnologia Bioquímica - Farmacêutica - Área de Tecnologia de Alimentos. UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto - SP, Brasil, analucia@ibilce.unesp.br

parcialmente desnatado, apresente condições higiênico-sanitárias adequadas e seja isento de resíduos químicos para evitar interferência de forma negativa nas etapas iniciais de fermentação (MARILLEY & CASEY, 2004; FURTADO, 2005).

No Brasil, o queijo Parmesão é comumente fabricado com leite pasteurizado, cujos padrões microbiológicos estão estabelecidos pela Instrução Normativa 51 - IN 51, que regulamenta a produção, identidade e qualidade do leite. De acordo com a IN 51 a contagem de bactérias mesófilas deve ser igual ou inferior a  $8,0 \times 10^4$  NMP.mL<sup>-1</sup>, coliformes termotolerantes não superior a  $2,0 \times 10^6$  NMP.mL<sup>-1</sup>, máximo de  $5,0 \times 10^6$  NMP.mL<sup>-1</sup> para coliformes totais e ausência de *Salmonella* sp em 25 mL no leite pós-pasteurização (BRASIL, 2002). Esta instrução não recomenda parâmetros para *Staphylococcus coagulase* positiva.

Os carboidratos, lipídeos e proteínas presentes no queijo Parmesão são fontes potenciais para a proliferação da microbiota láctica e para o desenvolvimento de microrganismos saprofitos e patogênicos durante o período de maturação (SALAÜN et al., 2005; ÖKSÜZTEPE et al., 2005). As bactérias da Família Enterobacteriaceae, como àquelas do grupo coliforme, quando presentes no queijo podem provocar a formação de olhaduras e trincas em toda sua extensão (COPPOLA et al., 2000; McSWEENEY, 2004; COLOMBARI et al., 2005; SKEIE, 2007).

A análise de bioindicadores de contaminação é comumente utilizada para avaliar a qualidade sanitária de queijos duros como o Parmesão ou de suas variedades, devendo comparar os resultados laboratoriais aos padrões legais vigentes. As indústrias laticinistas, por exemplo, devem respeitar os padrões recomendados pelo Regulamento Técnico Geral Para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos (BRASIL, 1996) onde devem ser analisadas 5 amostras de queijo pronto para consumo, e no máximo duas podem apresentar valor máximo de  $1,0 \times 10^3$  a  $5,0 \times 10^3$  para coliformes totais, população entre  $1,0 \times 10^2$  a  $5,0 \times 10^2$  para termotolerantes, entre  $1,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^3$  para *Staphylococcus coagulase* positiva, ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25 gramas da amostra. Por outro lado, a Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, recomenda o mesmo parâmetro proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento excetuando análise de coliformes totais e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2001).

Perotti et al. (2004) observaram valores inferiores a  $10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> ( $<10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>) para coliformes totais em Reggianito Argentino maturado por 180 dias. Candiotti et al. (2002) ao analisarem coliformes totais em queijo Reggianito

Argentino maturado por 180 dias verificaram valores  $<10^2$  UFC.g<sup>-1</sup>. Coppola et al. (2000) observaram que em queijo Parmigiano-Reggiano maturado por 150 dias não foi detectado coliformes termotolerantes em nenhum período de maturação do produto.

Nos queijos que requerem longo período de maturação o mecanismo de proteção natural pode estar associado à degradação do piruvato pela lactato desidrogenase (LDH) resultando em lactato (MADIGAN et al., 2004; NELSON & COX, 2006). Esta reação promove o decréscimo do pH, inibindo morfotipos bacilares e cocos indesejáveis (GIRAFFA, 2004). Ácidos orgânicos e outras substâncias antagonicas como diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas também são mencionados como fatores que restringem a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos em queijos maturados (BONADÉ et al., 2001; CLEVELAND et al., 2001; GATTI et al., 2004; SOOMRO et al., 2002; BARROS et al., 2008a).

Barros (2005) observou, *in vitro*, a habilidade de cinco culturas de *Lactobacillus helveticus* autóctones em inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli* ATCC 25922, das quais 20% (1/5) também apresentaram espectro de inibição frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A autora sugeriu o emprego destas culturas na fabricação de fermentos lácticos destinados à produção do queijo Parmesão, como uma alternativa de conservação deste produto ao longo da maturação.

Neste estudo o objetivo foi avaliar o aspecto higiênico-sanitário e viabilidade de bactérias lácticas no leite pasteurizado e no queijo Parmesão durante o período de maturação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cinco culturas de *L. helveticus* identificadas por Rossi et al. (2002) e caracterizadas por Barros (2005) com perfil autolítico elevado (E<sub>5</sub>) e perfil autolítico intermediário (A, D<sub>1</sub>). A cultura comercial Cc<sub>1</sub> com perfil autolítico elevado foi utilizada como controle.

A ativação das culturas foi realizada a partir de 3 repiques sucessivos em caldo *De Man Rogosa e Sharp* - MRS (Difco™ Laboratories, Detroit, EUA) e incubação a 42 °C por 24 horas para garantir a estabilidade da cultura (JORGE et al., 1990). Em seguida, 1,5% da cultura foram inoculadas em leite desnatado reconstituído (Itambé, Sete Lagoas, Brasil) a 12 % (LDR<sub>12%</sub>) previamente aquecido a 42 °C e, posteriormente, incubado na mesma temperatura por 24 horas. A cultura foi resfriada a 5 °C e utilizada no momento da fabricação do queijo (Figura 1).

O pH da cultura láctica foi avaliado utilizando o potenciômetro digital PM 608 (Analion®,

Ribeirão Preto, Brasil). A viabilidade da cultura láctica foi determinada transferindo-se 1 mL da cultura em 9 mL de água peptonada 1% estéril, constituindo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-10}$ . Posteriormente, 1 mL de cada diluição selecionada foi inoculado, pela técnica de profundidade em placas estéreis, utilizando 15 mL de ágar *De Man Rogosa e Sharp* - MRS (**Difco™ Laboratories, Detroit**, EUA) como meio de cultura. Após completa solidificação, as placas foram incubadas invertidas a 37 °C em condições anaeróbicas durante 48 horas (adaptação de SILVA et al., 2007). O resultado obtido em cada placa foi multiplicado pela recíproca da diluição e o valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC.mL<sup>-1</sup>).

Para a produção dos queijos experimentais, o leite integral tipo C foi pasteurizado a 65 °C por 30 minutos no tanque encamisado para fabricação de queijo com capacidade de 200 litros. Por se tratar de uma pasteurização lenta, este

processamento foi isento de cloreto de cálcio. O leite foi resfriado a 35 °C no próprio tanque e em seguida foi adicionado 1,5 % da cultura láctica (FURTADO, 1991) e 4,0% de coalho genético CHY-MAX EXTRA (Chr. Hansen® Inc., Milwaukee, EUA).

Foram realizados dois processamentos para cada cultura. Em cada processamento utilizou-se 120 L de leite integral tipo C isento de resíduos de antibióticos, resultando na fabricação de 9 peças de cerca de 1,5 kg, perfazendo um total de 960 L de leite. Os queijos fabricados com as culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> foram maturados a 18 °C durante 180 dias de maturação.

### 2.1 Viabilidade de bioindicadores de contaminação e lactobacilos termófilos no leite pasteurizado e queijo maturado

Para a enumeração dos microrganismos, inicialmente, foram realizadas diluições decimais

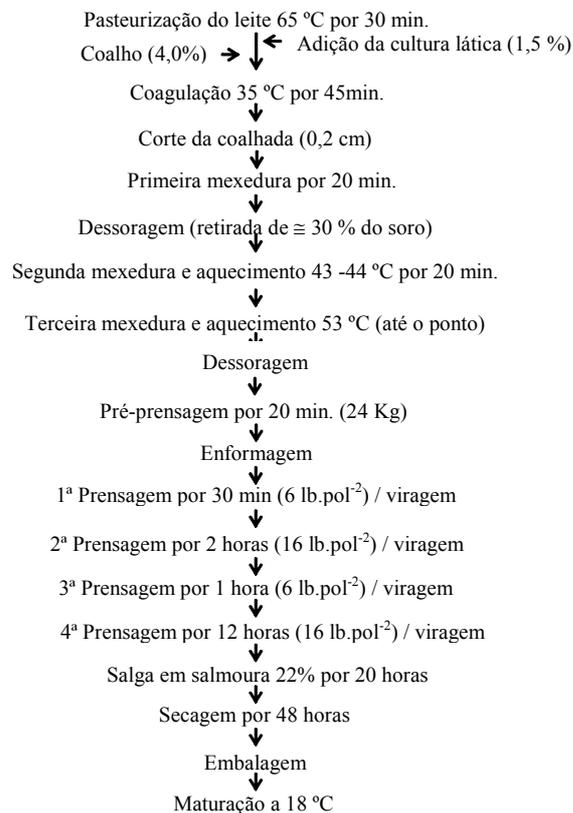


Figura 1. Fluxograma de fabricação do Parmesão experimental.

para as amostras de leite pós-pasteurização e para as amostras de queijos Parmesão maturados (30, 60, 90, 120, 150, 180 dias). Em 9 mL de água peptonada 1% estéril foi adicionado 1 mL da amostra de leite, constituindo-se a diluição  $10^{-1}$ , a partir da qual foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-4}$ . Para o queijo Parmesão, 10 g da amostra foram transferidas para 90 mL de citrato de sódio 2%, constituindo-se a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-10}$  utilizando 9 mL de citrato de sódio 2% como diluente. As diluições foram reservadas para posterior enumeração de bactérias do grupo coliforme, bactérias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de lactobacilos termófilos (SILVA et al., 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na contagem de bactérias do grupo coliforme 1 mL de cada diluição selecionada foi transferida para placas contendo meio de cultura cromogênico *Compact Dry*® EC (Nissui Pharmaceutical Co, Tóquio, Japão). Estas placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 24 horas e, posteriormente, foram contadas as colônias características para coliformes totais (cor púrpura) e *Escherichia coli* (cor azul). O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro - UFC.mL<sup>-1</sup>, para as amostras de leite, e unidades formadoras de colônias por grama - UFC.g<sup>-1</sup>, para as amostras de queijo maturado (SILVA et al., 2007).

Os microrganismos mesofílicos foram quantificados apenas para as amostras de leite pela técnica de cultivo em profundidade. Um mL de cada diluição selecionada foi pipetado e distribuído em placas estéreis, acrescentou-se 15 mL de Ágar Padrão para Contagem - PCA (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Índia) fundido e resfriado a 45 °C. Após completa solidificação as placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 48 horas. O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por grama da amostra (UFC.g<sup>-1</sup>) (SILVA et al., 2007).

*Staphylococcus* coagulase positiva foi avaliado pelo método de *spreadplate* em ágar *Baird Parker* - BP (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Índia), depositando 0,1mL de cada diluição sobre a superfície do ágar e, com o auxílio de um bastão de vidro tipo *hockey* flambado, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do meio até a completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 48 horas. Foram selecionadas as placas contendo entre 30 e 300 colônias, selecionando as colônias típicas (negras com halo transparente) e atípicas (negras isentas de halo transparente). A partir destas, foram selecionadas três colônias de cada placa, que foram

inoculadas em tubos contendo 1 mL de Caldo *Brain Heart Infusion* - BHI (Difco™ Laboratories, Detroit, EUA), os quais foram incubados a 37 °C por 24 horas. Após, os cultivos foram analisados em microscopia diferencial de Gram, analisados quanto a presença da enzima catalase e habilidade em coagular o plasma sanguíneo (NewProv®, Pinhais, Brasil), previamente ressuscitado em solução fisiológica estéril 0,85% (solução de cloreto de sódio - NaCl 0,85%). O resultado expresso em UFC.g<sup>-1</sup> (SILVA et al., 2007).

A análise de *Salmonella* sp foi realizada apenas para as amostras de leite utilizando o kit *Lateral Flow System Salmonella* (Dupont Qualicon™, Wilmington, EUA). Para a análise, 25 mL do leite foram adicionados a 225 mL do meio de enriquecimento DuPont™ *Lateral Flow System Salmonella*, seguida da incubação a 37 °C/ 24 horas. A seguir, uma alíquota da amostra enriquecida foi aplicada na tira de teste, e a leitura realizada após 10 minutos. A presença de duas linhas vermelhas na tira indica presença de  $10^0$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *Salmonella* sp no leite (SILVA et al., 2007).

A contagem total de lactobacilos termófilos no leite foi realizada conforme metodologia empregada para verificar a viabilidade da cultura láctica (adaptado de SILVA et al., 2007).

O aspecto higiênico-sanitário do queijo, maturado por 6 meses a 18 °C, foi avaliado a partir das mesmas análises, excetuando a investigação de microrganismos mesofílicos e *Salmonella* sp.

## 2.2 Análise estatística dos dados experimentais

A análise de variância (ANOVA) das amostras foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 5x6 (amostras x tempos de maturação). Foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias das amostras, considerando um nível de significância  $p < 0,05$ , utilizando o programa computacional SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (ZONTA & MACHADO, 1996).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Qualidade sanitária do leite pasteurizado e do queijo Parmesão maturado

O caráter sanitário do leite é fator essencial à estabilidade microbiológica do Parmesão durante sua maturação (BARROS et al., 2008b). O leite pasteurizado utilizado nos processamentos apresentou conformidade à Instrução Normativa 51,

com valor médio para coliformes totais e *Escherichia coli* menor que 1,0 LogUFC.mL<sup>-1</sup>, valor inferior a 1,0 LogUFC.mL<sup>-1</sup> de *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* sp (BRASIL, 2002). O maior valor médio para microrganismos mesofílicos nas amostras de leite foi de 0,07 Log UFC.mL<sup>-1</sup> para o leite utilizado na fabricação do queijo com a cultura D<sub>1</sub>, seguido de 0,05 Log UFC.mL<sup>-1</sup> para aquele fabricado com a cultura E<sub>5</sub>, com diferença estatística significativa (p<0,05). Barros et al. (2008b) verificaram resultados semelhantes para estes bioindicadores em leite pasteurizado destinado a produção comercial de queijos Parmesão maturados a 12 °C, registrando também valor máximo de 10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para a microrganismos mesofílicos.

O espectro de inibição *in vitro*, obtidos por Barros (2005), demonstrou a produção de substâncias antagônicas pelos *Lactobacillus helveticus* autóctones A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, com destaque para a cultura D<sub>1</sub>, que foi hábil em inibir o desenvolvimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, com halos de inibição de 16,0 mm e 14,1 mm, respectivamente. Provavelmente, esta característica das culturas lácticas tenha sido efetiva também nos ensaios *in situ*, pois nas amostras de queijo Parmesão maturados por 30 a 180 dias, não foi identificado *Escherichia coli* (<1,0 LogUFC.g<sup>-1</sup>) e *Staphylococcus* coagulase positiva (<2,0 LogUFC.g<sup>-1</sup>) em nenhuma das amostras. Todas as amostras analisadas estão de acordo com os padrões legais que sugerem limites máximos de 5,0x10<sup>2</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e 1,0x10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup>, para coliformes termotolerantes e *S. coagulase* positiva, respectivamente para queijos de baixa umidade (BRASIL, 1996). As amostras de queijo Parmesão também estão de acordo com a Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001, que recomenda contagem máxima de 5,0x10<sup>2</sup> UFC.g<sup>-1</sup> para coliformes termotolerantes, ausência de *Salmonella* sp em 25 gramas da amostra investigada e valor não superior a 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> para *Staphylococcus* coagulase positiva (BRASIL, 2001). A incidência de coliformes totais

foi registrada apenas nos períodos de 30 dias e 60 dias de maturação (Tabela 1).

Leroy & Vuyst (2004) afirmam que os metabólitos de bactérias lácticas são efetivos na indução da lise celular de microrganismos patogênicos e/ou saprofitos, possivelmente, este fato contribuiu para a redução de coliformes totais no decorrer do período de maturação (p<0,05). Este resultado é favorável sob o ponto de vista tecnológico, pois estes microrganismos estão comumente associados à higiene operacional precária (COPPOLA et al., 2000; RIEDEL, 2005; SILVA Jr., 2005), e podem também resultar em alterações de sabor e textura do produto (COLOMBARI et al., 2005; SKEIE, 2007).

O decréscimo de coliformes totais ao longo da maturação também foi observado por Perotti et al. (2004) em Reggiano Argentino estocado por 180 dias, não sendo detectados coliformes termotolerantes. Barros et al. (2008b) ao analisarem diferentes lotes de queijo Parmesão comercial fabricado com *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*, verificaram que coliformes totais prevaleceram apenas em um dos lotes aos 30 dias de maturação, com valor médio de 1,2x10<sup>1</sup> UFC.g<sup>-1</sup> e que todos os lotes não apresentaram coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva.

No Brasil, devido às diversas enfermidades que acometem o rebanho leiteiro, diferentemente do que acontece nas regiões italianas, os queijos são fabricados com leite pasteurizado. Provavelmente, o tratamento térmico aliado à ação das proteínas antimicrobianas dos cultivos de *Lactobacillus helveticus*, e também às práticas corretas de higiene empregadas durante todo o processamento do queijo, impediram a inserção e/ou proliferação dos patógenos no queijo Parmesão.

### 3.2 Viabilidade de lactobacilos termófilos durante o período de maturação do Parmesão

A população de lactobacilos termófilos no leite

**Tabela 1** - Coliformes totais\* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) em queijo Parmesão maturado a 18 °C durante 30 e 60 dias.

Amostras	Log UFC.g <sup>-1</sup>	
	30 dias	60 dias
A	1,36 <sup>a</sup>	1,04 <sup>a</sup>
Cc <sub>1</sub>	1,76 <sup>b</sup>	1,04 <sup>a</sup>
D <sub>1</sub>	<1,0 <sup>c</sup>	<1,0 <sup>b</sup>
E <sub>5</sub>	1,57 <sup>d</sup>	1,22x10 <sup>c</sup>

\*Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05).

pasteurizado apresentou valores superiores quando comparado àqueles obtidos para microrganismos mesofílicos. Provavelmente, as condições anaeróbicas, aliada aos nutrientes dissolvidos no caldo MRS permitiram que os lactobacilos mantivessem sua homeostasia celular (JAY, 2005).

Houve diferença significativa na população de lactobacilos termófilos no leite empregado nos diferentes processamentos ( $p < 0,05$ ). O valor máximo foi identificado no leite empregado no queijo fabricado com a cultura D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, com valor médio de 2,57 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Os lactobacilos termófilos remanescentes após pasteurização, podem atuar de forma favorável, juntamente com as culturas adicionadas, agregando características peculiares ao queijo durante a maturação (CANDIOTI et al., 2002).

O melhor desempenho em leite desnatado reconstituído a 12 % - LDR<sub>12%</sub> foi observado para a cultura comercial Cc<sub>1</sub>, seguida da cultura D<sub>1</sub>, as quais apresentaram população média igual a 10,47 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e 9,08 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). A atividade do microrganismo utilizado para a elaboração da cultura lática deve ser avaliada quanto a sua viabilidade e habilidade acidificante (FURTADO, 1991).

O teor de sólidos totais presentes no leite usado na fabricação da cultura é parâmetro importante ao metabolismo do microrganismo, garantindo sua atividade ao longo de todas as etapas de produção do queijo. Furtado (1991) afirma que em leite desnatado reconstituído de 12 % de sólidos totais, utilizado conforme o desenvolvimento da cultura, é possível prever um pH final de 4,59 e viabilidade lática de 10<sup>8</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>.

Dentre as culturas utilizadas, a menor população média de lactobacilos termófilos em LDR<sub>12%</sub> foi registrada no queijo E<sub>5</sub> com 7,76 Log

UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto o menor pH foi igual a 4,60 observado para o queijo D<sub>1</sub> (Tabela 2). Culturas com pH igual ou inferior a 4,3 devem ser rejeitadas, pois afetam, negativamente, a ação do complexo enzimático das células lácticas no processo de fermentação (FURTADO, 1991; STEPANIAK, 2004), bem como a competição com células microbianas oportunistas (BERESFORD et al., 2001; BONADÉ et al., 2001; LORTAL & CHAPOT-CHARTIER, 2005) durante a fabricação dos queijos. Nos diferentes queijos, a viabilidade de lactobacilos termófilos apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo de 6 meses de maturação do queijo Parmesão (Figura 2). Os valores médios da população de lactobacilos termófilos em 30 dias foram de 8,60 Log UFC.g<sup>-1</sup>, 11,85 Log UFC.g<sup>-1</sup>, 8,78 Log UFC.g<sup>-1</sup> e 8,32 Log UFC.g<sup>-1</sup> referente aos queijos fabricados com as culturas A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>, respectivamente, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ). Houve redução desta população em períodos próximos aos 60 dias de maturação, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ).

A menor população de lactobacilos termófilos foi observada para o Parmesão fabricado com a cultura E<sub>5</sub> (6,84 Log UFC.g<sup>-1</sup>). Aos 90 dias, é nítida a ascensão desta microbiota, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), sendo os maiores valores médios observados quando se utilizou as culturas Cc<sub>1</sub> e D<sub>1</sub>, 8,37 Log UFC.g<sup>-1</sup> e 8,52 Log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Possivelmente, liberação de aminoácidos ou peptídeos decorrentes da ação de enzimas proteolíticas naturais do leite e coalho, estimularam o acréscimo desta população. As necessidades nutricionais também podem ter sido supridas pelo catabolismo de cofatores oxidados, os quais estão intimamente associados ao sabor e aroma do queijo (SMIT et al., 2005).

Houve decréscimo da população de lactobacilos termófilos nos queijos maturados por

**Tabela 2** - População\* de lactobacilos termófilos no leite pasteurizado, pH e viabilidade de *Lactobacillus helveticus* na cultura (LDR<sub>12%</sub>) incubada a 42 °C por 16 horas, utilizada para fabricação do queijo Parmesão.

Culturas	Lactobacilos termófilos no leite (Log UFC.mL <sup>-1</sup> )	pH do LDR <sub>12%</sub> LDR <sub>12%</sub>	<i>L.helveticus</i> no LDR <sub>12%</sub> (Log UFC.mL <sup>-1</sup> )
A	2,51 <sup>ab</sup>	4,79 <sup>a</sup>	8,02 <sup>a</sup>
Cc <sub>1</sub>	2,47 <sup>b</sup>	4,81 <sup>b</sup>	10,47 <sup>b</sup>
D <sub>1</sub>	2,60 <sup>a</sup>	4,60 <sup>c</sup>	9,08 <sup>c</sup>
E <sub>5</sub>	2,60 <sup>a</sup>	4,74 <sup>d</sup>	7,76 <sup>d</sup>

\*Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

<sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

LDR<sub>12%</sub>: Leite desnatado reconstituído a 12%.

180 dias. Foram observados 7,42 Log UFC.g<sup>-1</sup> no queijo fabricado com a cultura A, 6,73 Log UFC.g<sup>-1</sup> para Cc<sub>1</sub>, 6,40 Log UFC.g<sup>-1</sup> para D<sub>1</sub> e 6,75 Log UFC.g<sup>-1</sup> para E<sub>5</sub> (p<0,05) ao término da maturação. Estes valores são similares aos encontrados por Coppola et al. (2000), que detectaram contagens de 6,88 Log UFC.g<sup>-1</sup> e 6,44 Log UFC.g<sup>-1</sup> em Reggiano Argentino maturado por 30 dias e 150 dias, respectivamente. Candioti et al. (2002) verificaram contagens médias iguais a 10<sup>8</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis em queijo Reggiano Argentino maturado por 30 e 180 dias, respectivamente.

Barros et al. (2007), ao analisarem diferentes lotes de queijo Parmesão, também detectaram oscilações no crescimento dos lactobacilos termófilos, com 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> até 90 dias de maturação, seguido de um decréscimo médio para 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> a partir de 150 dias, ou seja, uma redução de aproximadamente 1 ciclo log.

De acordo com Salaün et al. (2005), a faixa de pH ótimo ao desenvolvimento da espécie *Lactobacillus helveticus* é de 5,5 a 6,5, uma vez que a atividade e estabilidade das suas proteases podem ser afetadas, consideravelmente, em pH 4,5. Embora Vorob'eva (2004) explique que *Lactobacillus* auxiliam no decréscimo do pH intracelular simultaneamente à redução do pH extracelular impedindo o choque osmótico, provavelmente isto não foi observado nos períodos iniciais de maturação. O baixo valor de pH pode ter inviabilizado as culturas ou aumentado sua fase de adaptação à matriz do queijo até 60 dias de maturação. Após este período, possivelmente, o efeito tamponante desenvolvido no Parmesão decorrente da ação das endopeptidases, com conseqüente liberação de aminoácidos

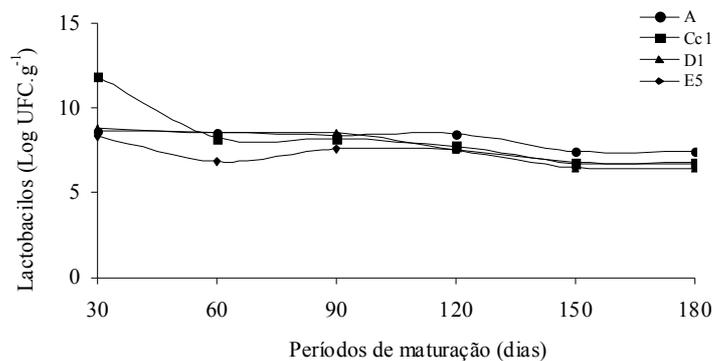
hidrofóbicos, favoreceu o caráter auxotrófico dos lactobacilos (McSWEENEY, 2004), os quais podem ter assimilado os aminoácidos livres como fontes energéticas adicionais (MADIGAN et al., 2004). Esta microbiota na presença de baixa concentração de íons hidrogênio dissolvidos no queijo, mantiveram sua homeostasia (LEROY & VUYST, 2004) atingindo a fase logarítmica em estágios que antecedem os 90 dias de maturação.

## CONCLUSÕES

A qualidade higiênico-sanitária do leite pasteurizado e do Parmesão nos diferentes períodos de maturação apresentou conformidade aos padrões legais quanto aos biondicadores investigados. No decorrer da maturação foi registrada redução da população de lactobacilos termófilos a partir de 90 dias.

## SUMMARY

In dairy products, such as Parmesan, the presence of bacteria from the coliform group and *Staphylococcus* genre damage the hygienic-sanitary qualities of the product. This research aimed to evaluate the sanitary quality and viability of lactic acid bacteria in the milk and in Parmesan cheeses during the ripening period. The cheeses were produced with the addition of different cultures, *Lactobacillus helveticus* (A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub>), aged at 18°C for 180 days, and were evaluated to the total lactic bacteria, bacteria from the coliform group and coagulase positive *Staphylococcus*. Milk used in each processing was analyzed by the incidence of these same bioindicators, including the assessment of



**Figura 2** - Comportamento das culturas de lactobacilos termófilos nos queijos Parmesão A, Cc<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> e E<sub>5</sub> maturados a 18 °C durante 180 dias.

mesophiles and *Salmonella* sp. All milk and Parmesan cheese samples were in accordance to legal standards regarding contamination bioindicators. Cheeses exhibited an adequate sanitary quality and the presence of lactic bacteria, which population reduced from 90<sup>th</sup> days of ripening.

**Keywords:** lactic bacteria; contamination bioindicators; Parmesan; ripening.

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro -fermento natural - perspectivas à manufatura do Parmesão.** Lavras: UFLA, 2005. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, 2005.
- BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; PENNA, A. L. B. Lactato desidrogenase como marcador da lise de culturas lácticas durante o período de maturação do queijo Parmesão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: SBM, 2007. CD-ROM.
- BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A.; ABREU, L. R. Caráter lipolítico em *Lactobacillus helveticus* autóctones. In: SYMPOSIUM ON FOOD SAFETY, 1., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: SBM, 2008a. CD-ROM.
- BARROS, J. J. C.; AZEVEDO, A. C.; FALEIROS JR., L. R.; TABOGA, S. R.; PENNA, A. L. B. Microestrutura e evolução dos componentes químicos na matriz do queijo Parmesão durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (enviado)**, 2008b.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BONADÈ, A.; MURELLI, F.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 153-158, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 46-53.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.
- CANDIOTI, M.C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S.B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C.A. Reggiano Argentinian cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 1, p. 923-931, 2002.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.
- COLOMBARI, G.; ALLEGRETTI, A.; MELANI, D.; BETTONI, B.; PECORARI, M. Sviluppo di spore di clostridi nel terreno, negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in área Parmigiano-Reggiano. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 56, n. 5, p. 309-344. 2005.
- COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. **Le Lait - Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 80, n. 1, p. 479-490, 2000.
- FURTADO, M. M. **A Arte e Ciência do Queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297p.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos - causas e prevenção**. São Paulo: Metha, 2005. 200p.
- GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; LAZZI, C.; MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. Peptidase activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 223-229, 2004.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.
- JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

- JORGE, A. O. C.; VEIRA, S.; HOFLING, J. F.; ALMEIDA, O. P. Determinação da dose letal 50% para *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530) em camundongos portadores de tumor de Erlich. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 3, n.21, p.228-231, 1990.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4. ed., São Paulo: Sarvier, 2006. 1232p.
- LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Food Science & Technology**, Brussels, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.
- LIN, W.; HWANG, C.; CHEN, L.; TSEN, H. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 1, p. 74-81. 2006.
- LORTAL, S.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 857-871, 2005.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed.; São Paulo: Hall Person, 2004. 624 p.
- MARILLEY, L.; CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. Review article. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 139-159, 2004.
- McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p.127-144, 2004.
- ÖKSÜZTEPE, G.; PATIR, B.; ÇALICIOĞLU, M. Identification and distribution of lactic acid bacteria during the ripening of "avak Tulum cheese. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 29, n. 3 p. 873-879. 2005.
- PEROTTI, M. C.; BERNAL, S. M.; MEINARDI, C. A.; CANDIOTI, M. C.; ZALAZAR, C. A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentino cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3. ed., São Paulo: Atheneu, 2005. 455p.
- ROSSI, D. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, A. F.; DUARTE, G. C.; BARROS, J. J. C.; SILVA, V. A. Utilização de provas bioquímicas e do perfil de hidrolases de peptidoglicanas para identificação de *Lactobacillus helveticus* e outros lactobacilos termófilos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 392, p. 3-11, 2002.
- SALÄUN, F.; MIETTONB, B.; GAUCHERON, F. Buffering capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 22, p. 95-109, 2005.
- SHEEHAN J. J.; FENELON, M. A.; WILKINSON M. G.; McSWEENEY, P. L. H. Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. **International Dairy Journal**. Barking, v. 17, n. 6, p. 704-716, 2007.
- SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Varela, 6 ed., 2005. 623 p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S., GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela: 3 ed., 2007. 544p.
- SKEIE, S. Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jablonna, v. 16, n. 1, p. 130-142, 2007.
- SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n.3, p. 591-610, 2005.
- SOOMRO, A. H.; MASUD T.; ANWAAR K. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health - A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.
- STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.
- VOROB'EVA, L.I.; Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 40, n. 3, p. 217-224, 2004.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Pelotas: UFPEL, 1996. 109p.