



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PAULA CAROLINA DE MOURA GUIMARÃES

# **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CULTURAS LÁCTICAS OBTIDAS DO QUEIJO MARAJOARA**

Belém

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PAULA CAROLINA DE MOURA GUIMARÃES

## **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CULTURAS LÁCTICAS OBTIDAS DO QUEIJO MARAJOARA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Pará  
como parte das Exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração: Microbiologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo

Belém

2011

PAULA CAROLINA DE MOURA GUIMARÃES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CULTURAS LÁCTICAS  
OBTIDAS DO QUEIJO MARAJOARA

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal do Pará  
como parte das Exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, para obtenção do Título  
de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

Área de Concentração: Microbiologia de Alimentos

DATA DA AVALIAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo  
(Orientador)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço  
(FEA/ITEC/UFPA)

---

Dr<sup>a</sup>. Vanessa Albres Botelho da Cunha  
(Membro)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luiza Helena Meller da Silva  
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente)

Belém  
2011

Dedico este trabalho à minha  
família, de quem recebi apoio  
incondicional.

## Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, que me motivou e torce pela minha felicidade sempre.

Aos meus pais e meu irmão, que com todo amor me apoiaram em todos os momentos, e que sempre estiveram ao meu lado tanto nos momentos bons, quanto nos momentos ruins.

Aos meus avós (paternos e maternos), que até hoje são meu sustento, independente de onde estejam. Obrigada por vocês existirem...

Aos meus padrinhos de batismo e de crisma: Obrigada por todos os incentivos e conselhos.

Às pessoas que eu amo incondicionalmente, amigos que visitam minha casa, se fazendo presentes em minha vida e tendo paciência comigo. Obrigada Dy, Dani Xú, Renato, Carol, Andreza, Didi, Bele, Marcel, Thays, Danilo e Renan.

À ACAS que me leva a buscar o Céu todos os dias. Amo vocês com amor eterno.

Aos meus amigos da UFPa, este trabalho também é para vocês que tanto me ajudaram! Obrigada Wellington, Fábio, Milla, Priscilla Andrade, Priscilla Maia, Hellen, Liana e Josilene.

Ao apoio dos funcionários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPa, que me proporcionaram ótimos momentos!

Às minhas primas Milla Moura e Letícia Moura, pela ajuda na Análise Sensorial e no Inglês (respectivamente)

Às pessoas que me ajudaram a realizar este trabalho, muitas vezes perdendo até hora de sair do laboratório! Obrigada imensamente Cleidiane (FEA) e Josilene (POGAL).

Ao meu orientador Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo, que sem o apoio e o direcionamento, não teria conseguido. Muito me alegra ter um orientador tão bom e eficiente! Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lúcia Lourenço que foi fundamental na execução deste trabalho, me auxiliando em momentos de dificuldades.

Não poderia deixar de agradecer às pessoas que me deram muito mais do que um suporte para a realização deste trabalho, mas um lar. Muito obrigada de coração à Família Falcão Cecim (Tia Eliana, Rodrigo, Renato, Rodolfo, Meirinha e a risonha

Melina), que me acolheram no Marajó, me incentivaram e me fizeram amar tanto aquela ilha que hoje me sinto uma marajoara. Não há nada que pague o que vocês fizeram por mim, meus amigos.

Aos Marajoaras Carlos Augusto, Beto e Haroldo por fornecerem a matéria-prima deste trabalho.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos e financiamento da pesquisa.

A todos que tornaram este trabalho possível. Obrigada pela colaboração fundamental.

*“Dias inteiros de calma, noites de ardência, dedos no leme e olhos no horizonte, descobri a alegria de transformar distâncias em tempo. Um tempo em que aprendi a entender as coisas do mar, a conversar com as grandes ondas e não discutir com o mau tempo. A transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.*

*(Amyr Klink)*

## Resumo

Bactérias Ácido Lácticas (BAL) ou culturas lácticas são as principais responsáveis pelo processo fermentativo de alguns produtos lácteos. No processo de maturação do queijo, estas bactérias contribuem desenvolvendo características sensoriais específicas portanto, o conhecimento da microbiota dos queijos é essencial na conservação destas características. O objetivo do presente estudo foi isolar e caracterizar bactérias lácticas do Queijo Marajoara, fabricado de maneira artesanal e sem adição de cultura láctica. Após o plaqueamento obteve-se 283 colônias características de bactérias lácticas que foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação e diferenciação de espécies. Das 283 colônias submetidas aos testes somente 64% apresentaram características de Gram positivos e catalase negativa. Constatou-se ainda a influencia da época do ano no isolamento de bactérias lácticas já que do total de isolados somente 6,9% foram obtidos no período de seca, enquanto que 93,8% foram obtidos no período de alagado. Após a produção do queijo com bactérias endógenas (cultura experimental), observou-se que as contagens para bactérias mesófilas e bactérias lácticas apresentaram-se semelhantes, sem diferença significativa ( $\alpha=0,05$ ) entre o queijo adicionado de cultura experimental e o queijo tradicional. Na avaliação sensorial, foi comprovado que nos atributos avaliação global e maciez não houve diferença significativa entre as amostras, mas com relação ao sabor e cor, apresentaram diferença significativa entre si ( $\alpha=0,05$ ). Apesar da significativa entre os atributos, os dois produtos obtiveram aceitação de 78,60% para a amostra de queijo experimental e 77,40% para a amostra de queijo tradicional Marajoara pelos provadores.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) or lactic cultures are primarily responsible for the fermentation of some dairy products. In the process of cheese ripening, these bacteria contribute developing specific sensory characteristics, therefore the knowledge of the microflora of the cheese is essential in preserving these features. The objective of this study was to isolate and to characterize lactic acid bacteria in Marajoara cheese, this artisanal manufacture and without addition of lactic culture. After plating 283 colonies were obtained characteristics of lactic acid bacteria, that were subjected to biochemical tests for confirmation and differentiation of species. Of the 283 colonies subjected to the tests, only 64% presented characteristics of Gram positive and catalase negative. It was proved also the influence of time of the year in the isolation of lactic acid bacteria, since of the total isolates only 6.9% were obtained during the drought, while 93.8% were obtained during the waterlogged period. After the production of cheese with endogenous bacteria (experimental culture), it was observed that the counts for mesophilic and lactic acid bacteria were similar, without significant difference ( $\alpha = 0.05$ ) between the cheese traditional and cheese with culture experimental. In sensory evaluation, it was proven that the overall and texture evaluation of showed no significant difference between samples, but with respect to the flavor and color, these samples showed significant differences between them ( $\alpha = 0.05$ ). Despite the significant difference between the attributes, the two products obtained acceptance of 78.60% for the sample of experimental cheese and 77.40% for the sample of traditional cheese Marajoara, by the panelists.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 - Efetivo Bovino e Bubalino na Ilha do Marajó em 2007.....	16
Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção do Queijo Marajoara tipo creme. ...	21
Figura 3. Perfil Sensorial do Queijo Marajoara.....	25
Figura 4. Fluxograma da Produção do Queijo Marajoara.....	43
Figura 5. Ficha aplicada durante a Análise Sensorial. ....	46
Figura 6. Coloração de Gram da amostra, mostrando a morfologia de coccus.....	49
Figura 7. Resultado positivo - violeta turvo - para Hidrólise de Arginina (a) e Fermentação de carboidratos - amarelo turvo - (b) .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores Médios da composição do leite bovino e bubalino .....	17
Tabela 2. Média dos resultados de análise físico-químicas do Queijo Marajoara Tipo Creme .....	23
Tabela 3. Taxonomia e algumas características específicas de Bactérias Ácido Lácticas encontradas em culturas <i>starters</i> . .....	29
Tabela 4. Algumas características do gênero <i>Lactobacillus</i> .....	35
Tabela 5. Identificação, Tipo de amostras, Localização e Período de Coleta .....	36
Tabela 6. Características Diferenciais de Bactérias Ácido Lácticas em forma de coccus .....	38
Tabela 7. Contagem Microbiana Logarítmica (log UFC/g ou mL) da média de duas replicatas e Desvios Padrões .....	48
Tabela 8. Resultado dos testes bioquímicos .....	52
Tabela 9. Contagem Microbiana Logarítmica (log UFC/g) da média de duas replicatas e Desvios Padrões .....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVO	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
2.1	REBANHO BOVINO E BUBALINO NO ARQUIPÉLAGO DO MARAJÓ	16
2.2	LEITE DE BÚFALA	17
2.3	QUEIJO MARAJOARA	19
2.3.1	Aspectos da Produção de Queijo Marajoara	19
2.3.2	Características Físico-Químicas do Queijo Marajoara	23
2.3.3	Características Microbiológicas do Queijo Marajoara	24
2.3.4	Características Sensoriais do Queijo Marajoara	25
2.4	CULTURA LÁCTICA E A MICROBIOTA LÁCTICA DE QUEIJOS	26
2.5	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS	30
2.5.1	<i>Lactococcus</i>	31
2.5.2	<i>Leuconostoc</i>	31
2.5.3	<i>Streptococcus</i>	32
2.5.4	<i>Enterococcus</i>	33
2.5.5	<i>Lactobacillus</i>	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
3.1	SELEÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS	36
3.2	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS	37
3.3	TESTES BIOQUÍMICOS	39
3.3.1	Coloração de Gram	39
3.3.2	Teste de Catalase	39
3.3.3	Produção de Gás	39
3.3.4	Hidrólise da Arginina	40
3.3.5	Crescimento a 2,5; 4,0 e 6,5 % NaCl;	40
3.3.6	Crescimento a pH 9,2 e 9,6	40
3.3.7	Crescimento a 10, 30, 40 e 45 °C	41
3.3.8	Fermentação dos carboidratos glicose, maltose, manitol e sorbitol	41

3.4 SELEÇÃO DE DOIS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS PARA A CONSTITUIÇÃO DA CULTURA EXPERIMENTAL.....	41
<b>3.4.1 Preparo da Cultura Experimental .....</b>	<b>42</b>
3.5 UTILIZAÇÃO DA CULTURA EXPERIMENTAL DO QUEIJO MARAJOARA .....	42
<b>3.5.1 Fabricação do Queijo Marajoara de Estudo .....</b>	<b>42</b>
3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS DE ESTUDO PRODUZIDOS NA AGROINDÚSTRIA .....	44
<b>3.6.1 Contagem de Bactérias Mesófilas.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.2 Contagem de Bactérias Lácticas .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.3 Coliformes Termotolerantes .....</b>	<b>45</b>
3.7 ANÁLISE SENSORIAL .....	45
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>48</b>
4.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS .....	48
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA .....	49
<b>4.2.1 Coloração de Gram e Teste de Catalase.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Diferenciação Bioquímica.....</b>	<b>50</b>
4.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO QUEIJO MARAJOARA PRODUZIDO COM A CULTURA EXPERIMENTAL.....	55
<b>4.3.1 Contagem Total de Bactérias.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.2 Contagem de Bactérias Lácticas.....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.3 Coliformes Termotolerantes .....</b>	<b>56</b>
4.4 ANÁLISE SENSORIAL .....	57
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
Sugestões para trabalhos futuros .....	59
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Queijos são produtos à base de leite fermentado desenvolvidos há aproximadamente 8000 anos, por povos nômades que armazenavam o leite para consumir durante suas viagens. Esse leite armazenado sofria fermentação produzindo a coalhada, de maneira em que, o balanço da movimentação dos animais causava a separação do soro, sendo este aproveitado como bebida e à coalhada era acrescentado um pouco de sal, produzindo um alimento complementar no período de escassez de carne. Por causa das constantes mudanças dos povos nômades, os queijos começaram a apresentar muitas variedades.

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite, ou do leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Nos queijos são encontrados vários micro-organismos que podem ser provenientes de muitas fontes, como do leite utilizado, da ordenha em condições higiênicas inapropriadas, da flora microbiana do ambiente durante e após o processamento do queijo. Todos estes micro-organismos contribuem para a variedade do queijo, influenciando no sabor, na textura, na coloração, na maciez entre outras características.

Segundo Fox et al (2004), em muitos países são utilizadas culturas (fermentos) artesanais. Estas são obtidas principalmente a partir da prática de "back-slopping", que consiste em utilizar algum dos lotes anteriores de queijo como inóculo para o novo lote. Com base nesta prática, isolamentos de culturas lácticas são realizados em queijos, principalmente artesanais, para a obtenção de culturas puras que são responsáveis pelas características originais do queijo utilizado, e ao serem reinoculadas ao leite, promovem um produto final com qualidade e segurança, sem alterações em suas características.

O isolamento de culturas do Queijo do Marajó, ou Queijo Marajoara, visa a melhoria de sua cadeia produtiva, que atualmente ainda é artesanal.

O Queijo Marajoara é produzido por fermentação espontânea sem adição de cultura láctica. A fermentação ocorre em temperatura ambiente e em recipientes abertos, o que propicia também a multiplicação micro-organismos patogênicos, uma vez que o leite de búfala não é tratado termicamente. Assim, o conhecimento de bactérias lácticas fermentadoras – e de suas características – presentes no Queijo Marajoara, contribuem para um melhor processo fermentativo.

## **1.1 OBJETIVO**

No contexto apresentado, esta pesquisa teve como objetivo principal selecionar e caracterizar culturas endógenas que contribuem com a fermentação do leite durante o processo de fabricação do Queijo Marajoara, visando sua utilização na melhoria da cadeia produtiva do queijo, reduzindo o tempo de fermentação e/ou o *flavor* assim contribuir para o avanço tecnológico da sua produção no que diz respeito à segurança alimentar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 REBANHO BOVINO E BUBALINO NO ARQUIPÉLAGO DO MARAJÓ

Segundo Brasil (2007), o Arquipélago do Marajó é formado por um conjunto de ilhas que constitui a maior ilha fluvial do mundo, com 49.606 Km<sup>2</sup> e está integralmente situado no Estado do Pará, constituindo-se como uma das mais ricas regiões do País em termos de recursos hídricos e biológicos.

De acordo com o Perfil de Pecuária Municipal realizado pelo IBGE em 2007, o Pará é o estado em que se encontram o maior efetivo bubalino do Brasil, cerca de 435.735 mil registrados em 2007, representando 38,5 % do nacional, e a Ilha do Marajó representa 62,5 % do efetivo bubalino estadual com a maior população bufalina concentrada no município de Chaves (32,56 %).

Quanto ao rebanho bovino, o Pará tem o quinto maior efetivo do Brasil, com contribuição de 7,7 % do total (IBGE, 2009). Em 2007 o IBGE registrou pouco mais de 286.098 mil cabeças na área do Marajó, equivalente a 1,8% do rebanho do estado do Pará.

No arquipélago, tanto o efetivo bubalino quanto o bovino tem maior concentração nos municípios de Chaves, Cachoeira do Arari, Soure, Ponta de Pedras, Muaná e Santa Cruz do Arari, como mostra a Figura 1.

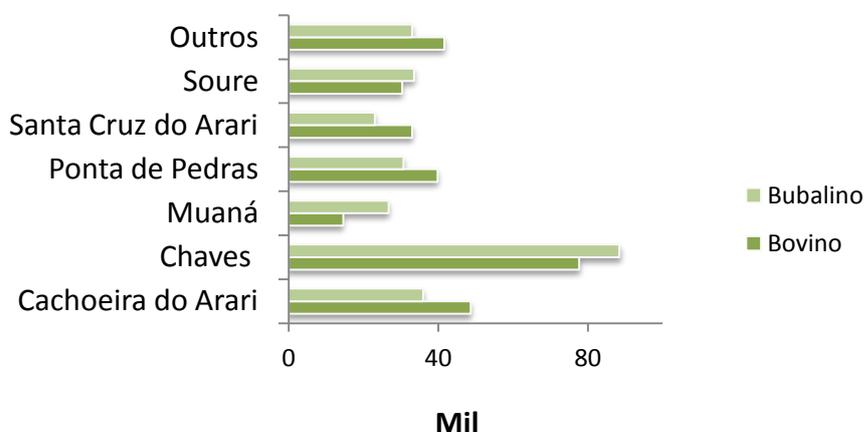


Figura 1 - Efetivo Bovino e Bubalino na Ilha do Marajó em 2007

Segundo o IBGE (2009) no ano de 2007 as contribuições leiteiras dos dois rebanhos marajoaras, bubalino e bovino, foram de 1,74 % do total estadual.

Esta produção diária poderia aumentar se o rebanho recebesse manejo nutricional e sanitário adequados. Barbosa (2005) cita um exemplo prático de avaliação da atividade leiteira de um rebanho bubalino marajoara, antes e após os tratamentos nutricionais e sanitários adequados, observando um aumento de 5 Kg/dia em sua produção leiteira, antes do manejo adequado, para até 18 Kg/dia, após o manejo.

## 2.2 LEITE DE BÚFALA

O leite de búfala apresenta coloração branca opaca provocada pela ausência de pigmentos carotenóides, precursores da vitamina A, presente no leite da vaca. (BRASIL, 1984). A composição química do leite de búfala é influenciada por diversos fatores como raça, estágio de lactação, idade, manejo, sanidade, condições climáticas e alimentação. Figueiredo (2006) pesquisou a composição química do leite bubalino marajoara. A tabela 1 mostra a comparação entre a composição química do leite de búfala obtido (FIGUEIREDO, 2006) e a composição do leite bovino (ORDOÑEZ, 2005).

**Tabela 1 - Valores Médios da composição do leite bovino e bubalino**

Variável	Raça Bovina <sup>1</sup>	Raça Bubalina <sup>2</sup>
Acidez (°Dornic)	-	17,89
Umidade (%)	86,7	81,99
Gordura (%)	4,0	8,14
Proteína (%)	3,6	4,44
Carboidrato (%)	5,0	4,55
Resíduo Mineral Fixo (%)	0,7	0,95
pH	6,7	6,48

Fonte: 1 – Ordoñez, 2005; 2 – Figueiredo, 2006.

Como pode ser observado na tabela 1, o leite procedente da raça bubalina apresenta resultados superiores ao leite da raça bovina para todos os componentes, justificando o valor nutricional do leite de búfala.

O rendimento de produtos derivados do leite de búfala é maior que o de derivados de leite bovino, justamente pelo teor de extrato seco total, teor de proteínas e teor de resíduo mineral fixo (RMF) ser maior que o do leite bovino.

Quanto ao valor nutricional o leite de búfala, apresenta um valor energético maior do que o leite bovino, pois mesmo sendo mais pobre em fosfolipídios, o leite de búfala é mais rico em colesterol e ácidos graxos saturados (BRASIL, 1984).

Verruma & Salgado (1994) demonstraram que o leite de búfala possui maior teor protéico total, superando em 25,5 % o teor de aminoácidos essenciais, quando comparado ao leite de vaca.

As caseínas representam mais de 80 % das proteínas totais do leite e encontram-se principalmente em forma micelar, sendo as encontradas no leite bubalino maiores que as micelas encontradas no leite de vaca (HÜHN, 1983).

Durante a produção de queijos, a alta quantidade de caseínas no leite bubalino interfere na coagulação deste – que ocorre pela precipitação das proteínas no ponto isoelétrico ou na desestabilização das proteínas por enzima proteolítica e em presença de  $\text{Ca}^{2+}$  – fazendo com que a coagulação ocorra de forma mais rápida e a sinerese do coágulo seja maior.

Os glóbulos de gordura no leite de búfala são maiores que os do leite de vaca, mais resistente às alterações oxidantes e mais ricos em ácido butírico e ácidos graxos de cadeias longas, como o ácido palmítico e esteárico (HÜHN, 1983).

Segundo Finotelo (1981) os percentuais mais elevados de gordura no leite de búfala criadas no Marajó são encontrados no período de alagado<sup>1</sup> e os menores no período de seca<sup>2</sup>. Além disso, este apresenta maior densidade, temperatura de fusão mais elevada (32-43,5°C) e índice de iodo igual a 29,43, valor este inferior ao da gordura do leite bovino (HÜHN, 1986).

---

<sup>1</sup> Período de alagado: Período de chuvas intensas na Ilha do Marajó - Dezembro a Maio.

<sup>2</sup> Período de seca: Período de Junho a Novembro.

## 2.3 QUEIJO MARAJOARA

### 2.3.1 Aspectos da Produção de Queijo Marajoara

Estima-se que o Arquipélago do Marajó possui sessenta queijarias, sendo que somente o município de Soure possui 30 (trinta) produtores de queijos, com uma produção média de 500 (quinhentos) quilos de queijo/mês, movimentando 50% da renda mensal em produção de queijo da ilha do Marajó (OLIVEIRA & SILVA, 2003).

A produção do queijo marajoara ainda é realizada de forma artesanal, em sua maior parte, e somente em 2001 foi implantada no município de Soure, a primeira queijaria semi-industrial do arquipélago (OLIVEIRA & SILVA, 2003).

Bendelak (2004) avaliou três queijarias no arquipélago do Marajó, em diferentes épocas do ano. Suas conclusões confirmam pesquisas antes realizadas, mostrando que o produto não tem controle de qualidade, apresentando-se fora da conformidade. Ainda segundo esse pesquisador a ausência de padronização do processo produtivo e de padrões mínimos de qualidade (físico-químicos e microbiológicos) contribui para que o queijo marajoara seja um produto passível de problemas à saúde pública.

Alguns laticínios do Marajó têm tentado melhorar o padrão de qualidade da produção do queijo, implantando as Boas Práticas, aplicando o processo de pasteurização no leite de búfala e a adição de cultura láctica comercial na preparação do produto, porém as culturas comerciais utilizadas causam certa descaracterização sensorial em relação ao produto padrão.

Segundo Finotelo (1981), o queijo marajoara apresenta duas variedades: Queijo tipo “creme” e Queijo tipo “manteiga”.

O Queijo tipo “creme” é obtido quando a fritura, ou terceiro cozimento da massa, é feito adicionando-se o creme que foi separado do leite fresco da manhã, Este queijo apresenta um teor de umidade em torno de 50% e teor médio de gordura de 22% e seu sabor difere muito do tipo “manteiga”.

O Queijo tipo “manteiga” é obtido quando a fritura, ou terceiro cozimento da massa, é feito adicionando-se a manteiga propriamente dita, ou o óleo da manteiga,

extraído do creme de dias anteriores. Este queijo apresenta umidade em torno de 35% e elevado teor de gordura, média de 42%.

O processo de elaboração do queijo marajoara tipo creme é apresentada na Figura 2, em um fluxograma adaptado de Bendelak (2004) e Finotelo (1981).

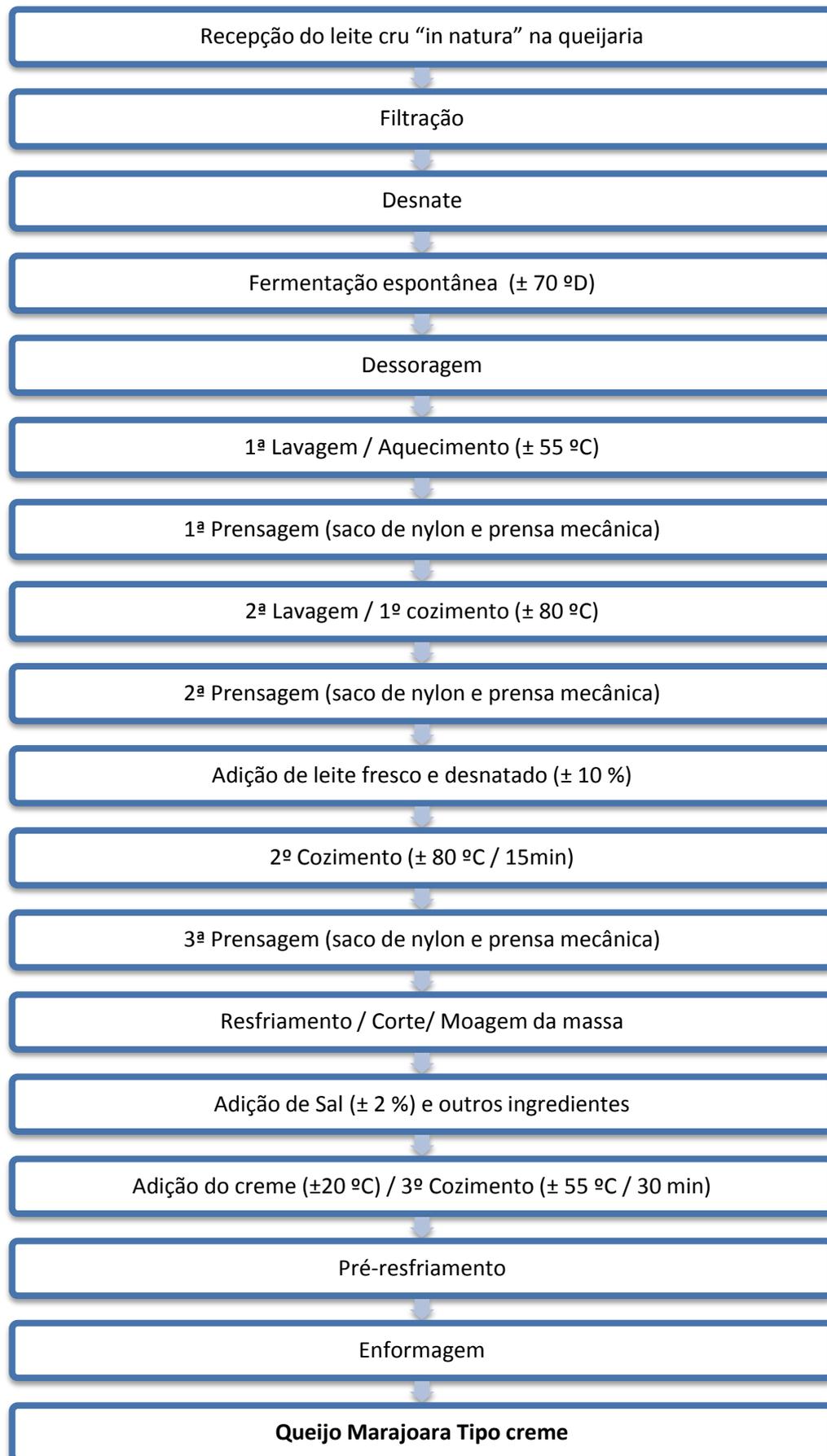


Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção do Queijo Marajoara tipo creme.

Observa-se na figura 2 que o leite ordenhado pela manhã é recebido na queijaria, passa pelo processo de filtração, para remoção das impurezas grosseiras. Em seguida, sofre desnatado para separação do soro da gordura e do creme. O soro é deixado em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente, para fermentação espontânea. A massa resultante é colocada em sacos de nylon para dessorar, através de uma pré-prensagem (manual ou mecânica). É feita uma primeira lavagem da massa com água, em tachos de aço inoxidável, e posteriormente a massa é levada ao aquecimento de  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ .

A massa é prensada e submetida a uma segunda lavagem com água, e cozida a  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Em seguida ocorre nova dessoragem sendo então submetida a uma terceira lavagem, desta vez com leite desnatado no lugar da água e passa por um segundo cozimento à  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Segundo Finotelo (1981), a adição do leite tem por finalidade reduzir a acidez da massa para  $\pm 13^{\circ}\text{D}$ . Adicionam-se os ingredientes (sal) e cerca de 20% do peso total da massa, em creme fresco retirado do leite da manhã, passando em seguida para um terceiro cozimento ou “fritura” em que a massa permanece sob agitação contínua por aproximadamente 30 minutos. Deixa-se a massa esfriar por alguns minutos e procede-se o envase. Bendelak (2004) constatou que algumas queijarias comercializam o produto logo após o processamento.

Um dos diferenciais do queijo marajoara é o processo de intenso cozimento da massa. Segundo Scott (1991), o cozimento da massa provoca a contração da matriz protéica com a subsequente eliminação de uma nova fração de soro e o aumento da temperatura acelera o metabolismo das bactérias ácido lácticas, tendo como consequência a produção de ácido láctico e diminuição do pH. Esta acidez facilita a retração das partículas, provocando uma nova expulsão do soro.

A salga deste queijo, segundo Bendelak (2004), é realizada adicionando o cloreto de sódio diretamente à massa, sendo que não há controle da quantidade de cloreto de sódio utilizado, nem de sua procedência. A importância da salga é que ela fornece sabor, reforça a sinerese e contribui para a preservação da maioria dos queijos. O sal tem uma influência importante no controle microbiano e atividade enzimática na maturação do queijo (HUTKINS, 2006).

Devido a falta de padronização do queijo marajoara, não há controle de fatores importantes durante a produção, como o binômio tempo x temperatura

durante o processo de cocção, além de não existir uma quantidade padrão de ingrediente e controle de pH durante a fermentação espontânea.

### 2.3.2 Características Físico-Químicas do Queijo Marajoara

O Queijo Marajoara não apresenta uniformidade nas características físico-químicas do produto em função basicamente da falta de padronização de seu processamento. Na tabela 2 é apresentada a caracterização do queijo marajoara obtida por diferentes autores.

**Tabela 2. Média dos resultados de análise físico-químicas do Queijo Marajoara Tipo Creme**

Determinação	Finotelo* (1981)	Gouvêa & Dias* (2004)	Bendelak* (2004)	Figueiredo* (2006)
Umidade (%)	51,05	41,37	42,13	37,77
EST (%)	48,95	-	-	55,27
Gordura (%)	22,5	28,78	30,99	34,4
pH	5,17	5,05	-	-
Proteína (%)	24,24	21,85	-	19,25
RMF (%)	-	2,28	2,72	3,99
Acidez (°D)	-	-	0,07	18,06 °D

\*Média dos resultados encontrados pelos autores.

Gouvêa e Dias (2004) encontraram diferenças entre as determinações físico-químicas quando avaliadas em búfalas no início e no fim da lactação. As diferenças acentuadas são atribuídas à alteração da composição da matéria-prima em circunstância da época de lactação.

De acordo com o teor de umidade, o queijo marajoara pode ser classificado como “queijo de média umidade”, pois apresenta umidade entre 36,0% e 45,9%, segundo a Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996 (BRASIL, 1996). Ainda de acordo com essa legislação e levando em consideração os resultados encontrados por Finotelo (1981) e Figueiredo (2006), esse queijo pode ser classificado como “queijo gordo”, pois apresenta teor de matéria gorda no extrato seco entre 45,0% e 59,9%.

### 2.3.3 Características Microbiológicas do Queijo Marajoara

Brasil (1996) estabelece que o leite deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico para garantir a inocuidade do produto e de seus derivados, exceção para os queijos maturados por um período superior a 60 dias. A ausência de tratamento térmico no queijo artesanal marajoara implica na presença de bactérias ácido lácticas, mas também, na possibilidade de presença de micro-organismos patogênicos, daí a importância de maturação por mais de 60 dias.

Bendelak (2004) constatou que houve incidência de coliformes termotolerantes (45 °C) acima do permitido pela RDC nº 12 (ANVISA, 2001) em 26,66% das amostras de Queijo Marajoara estudadas. A contaminação por coliformes termotolerantes indica falha no procedimento de higienização e nas boas práticas de produção podendo inclusive resultar do contato do produto diretamente com fezes.

Diversos pesquisadores obtiveram em seus experimentos ausência de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp* nas amostras, apresentando-se dentro dos padrões exigidos na legislação para queijos de média umidade (GOUVÊA & DIAS, 2004; LOURENÇO *et al.*, 2002; BENDELAK, 2004).

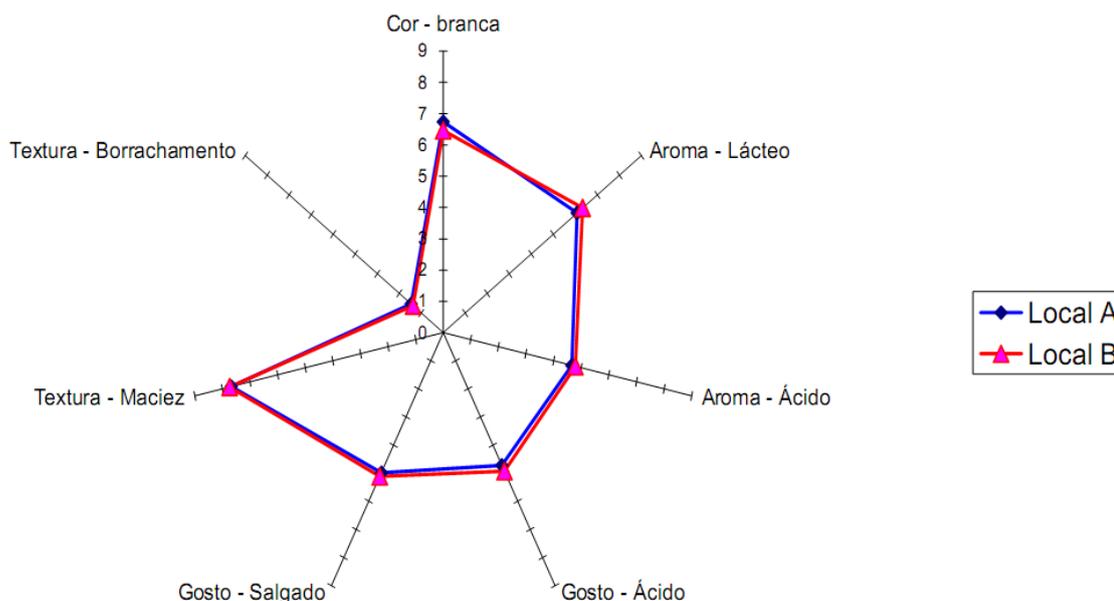
Figueiredo (2003) estudou a estabilidade microbiológica do queijo marajoara e observou que em relação a bactérias mesófilas, o produto apresentou ausência até 14 dias após sua fabricação.

Gouvêa & Dias (2004) obtiveram valores para bolores e leveduras de  $7,9 \times 10^2$  UFC/g. Bendelak (2004) encontrou valores que variaram de  $<1,5 \times 10^1$ g até  $>1,5 \times 10^6$  UFC/g logo após a fabricação. Essas variações dependem do processamento utilizado e da formulação do produto e dos aditivos utilizados. Não há legislação vigente para estes tipos de micro-organismos – Bolores e leveduras – mas o controle deve ser realizado já que estes deterioram o produto.

É necessário levar em consideração que o processo de cocção, mesmo sem controle de tempo-temperatura, contribui com a eliminação de parte da flora microbiana.

### 2.3.4 Características Sensoriais do Queijo Marajoara

Figueiredo (2006) caracterizou o perfil sensorial do queijo marajoara processado em duas localidades diferentes no Arquipélago do Marajó, com provadores treinados. O perfil sensorial obtido encontra-se na figura 3.



**Figura 3. Perfil Sensorial do Queijo Marajoara**

Fonte: Figueiredo (2006)

O queijo apresentou coloração branca e aroma lácteo mais perceptível que o aroma ácido, caracterizando que o derivado possuía pouca acidificação. Seu gosto é levemente ácido e, apesar da elevada quantidade de sal utilizada na fabricação, o gosto salgado não foi perceptível pelos provadores. No atributo textura, o produto foi considerado como um derivado de grande maciez e borrachamento pouco perceptível. A aceitabilidade do produto também foi destacada, já que houve cerca de 85% de aceitação nos quesitos aroma, sabor, textura e cor (FIGUEIREDO, 2006).

Lourenço (1999) identificou compostos voláteis presentes no Queijo Marajoara. As substâncias identificadas em maior percentual foram o 2-4 Decadienal (24%), o 2-Nonenal (12,30%) e o 2-Hexenal (9,05%) indicando que os aldeídos encontrados comprovadamente contribuem para o “flavor” do Queijo Marajoara.

## 2.4 CULTURA LÁCTICA E A MICROBIOTA LÁCTICA DE QUEIJOS

A primeira produção de alimentos fermentados foi baseada em fermentação espontânea devido ao desenvolvimento de microflora naturalmente presente na matéria-prima do produto. Ao longo do tempo a fermentação espontânea foi otimizada através da prática de *back-slopping*, ou seja, a inoculação de uma pequena quantidade de matéria-prima obtida de uma fermentação bem sucedida (LEROY & VUYST, 2004).

A microflora do queijo pode ser dividida em dois grupos: Bactérias ácido lácticas e micro-organismos secundários.

As bactérias lácticas *starters*<sup>3</sup> estão envolvidas na produção de ácido durante a fabricação do queijo e contribuem no processo de maturação. Os micro-organismos secundários não contribuem para a produção de ácido, mas geralmente desempenham um papel significativo durante a maturação. A microflora secundária compreende bactérias que não produzem ácido, mas que crescem internamente em uma grande variedade de queijos, além de leveduras e/ou bolores, que crescem internamente ou externamente e são usualmente únicas para uma variedade de queijo específica ou tipos estreitamente relacionados (BERESFORD et al, 2001).

Na fabricação de queijos, cepas cuidadosamente selecionadas de diferentes bactérias ácido lácticas são adicionadas ao leite pouco antes da adição do coalho. Essas bactérias são chamadas de culturas lácticas, ou fermento láctico, tendo como função iniciar a produção de ácido láctico, sendo por isso também conhecidas como culturas *starters*, promovendo o coalho, auxiliando na dessora (reduzindo assim o teor de umidade) e inibindo o crescimento de bactérias não desejáveis (FOX, 2000).

A adição direta de culturas *starter* selecionadas na matéria-prima tem sido um avanço no processamento de alimentos fermentados, resultando em um alto grau de controle da fermentação e permitindo uma maior padronização do produto final (LEROY & VUYST, 2004).

Segundo Fox (2000) as culturas lácticas além de serem micro-organismos produtores de ácido láctico, são também fermentadoras de ácido cítrico e citratos,

---

<sup>3</sup> Bactérias ácido lácticas *starters*: Bactérias que iniciam a produção de ácido láctico.

responsáveis pelo sabor e aroma característicos dos queijos, contribuindo dessa forma na qualidade do produto final. Os micro-organismos responsáveis pela produção de ácido láctico multiplicam-se intensamente durante as etapas iniciais de fabricação do queijo, promovendo o abaixamento do pH e criando condições mais propícias ao desenvolvimento da flora aromatizante, cujo metabolismo resulta na formação de compostos voláteis.

Culturas lácticas em geral, são Gram-positivas, catalase negativa heterotrófica que metabolizam açúcares, por meio de metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo. A classificação das culturas varia no que diz respeito à tolerância de sal, osmotolerância<sup>4</sup>, aerobiose e outras condições ambientais, atribuindo esta última a diversidade de habitats com que são associados (HUTKINS, 2006).

Tais culturas podem consistir de uma única estirpe utilizada isoladamente ou em combinações ou em misturas de cepas indefinidas (culturas mistas). Podem ser mesofílicas ou termofílicas. Entre as culturas mesofílicas estão incluídas *Leuconostoc spp* e *Lactococcus*, enquanto que entre as culturas termofílicas estão desde *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus sp.*, até *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (HASSAN & FRANK, 2001).

Culturas *starters* mistas mesofílicas são classificadas por sua composição: tipo “O” são compostas por *Lactococcus*, culturas que não fermentam citrato; Culturas tipo “B” contêm *Leuconostoc spp.* e *Lactococcus* que não fermentam citrato; culturas tipo “D” contêm tanto *Lactococcus* citrato-fermentativo quanto *Lactococcus* citrato-não fermentativo, mas não contêm *Leuconostoc spp*; culturas tipo “BD” contêm *Leuconostoc spp* bem como *Lactococcus* encontrados em culturas tipo “D” (HASSAN & FRANK, 2001).

Culturas puras, isoladas de ecossistemas complexos de alimentos fermentados naturalmente, apresentam uma diversidade de atividades metabólicas que divergem fortemente quando comparáveis às cepas utilizadas como *starters* industriais a granel. Estes incluem diferenças na taxa de crescimento, comportamento competitivo em culturas mistas, adaptação a um determinado

---

<sup>4</sup> Osmotolerancia: A capacidade de resistir altas concentrações de soluto.

substrato ou matérias-primas, propriedades antimicrobianas e atributos de qualidade, como sabor e aroma. Cepas selvagens necessitam suportar a concorrência de outros micro-organismos para sobreviver no seu ambiente natural hostil, de modo que muitas vezes produzem antimicrobianos tais como bacteriocinas (LEROY & VUYST, 2004).

Beresford et al. (2001) mostram na tabela 3, algumas bactérias ácido lácticas presentes em culturas *starters* e as características bioquímicas que podem ser utilizadas para diferenciá-las.

**Tabela 3. Taxonomia e algumas características específicas de Bactérias Ácido Lácticas encontradas em culturas *starters*.**

Micro-organismo	Forma	Produção de ácido láctico no leite <sup>b</sup> (%)	Metabolismo de citrato	Crescimento			Fermentação <sup>c</sup>		
				10 °C	40 °C	45 °C	Glu	Gal	Lac
<i>Streptococcus thermophilus</i>	coccus	0,6	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	bacillus	2,0	-	-	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	bacillus	1,8	-	-	+	+	+	-	+
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Lactis</i>	bacillus	1,8	-	-	+	+	+	+/-	+
<i>Lactococcus lactis ssp. Cremoris</i>	coccus	0,8	-	+	-	-	+	+	+
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	coccus	0,8	+/-	+	+	-	+	+	+
<i>Leuconostoc lactis</i>	coccus	< 0,5	+	+	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>	coccus	0,2	+	+	-	-	+	+	+

Fonte: Cogan e Hill, 1993. In: Beresford et al., 2001<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> +/- , maioria das cepas positivas;

<sup>b</sup> Estes são valores aproximados; cepas isoladas variam.

<sup>c</sup> Glu, Glicose; Gal, Galactose; Lac, Lactose

Cogan et al (1997) obtiveram 4.379 bactérias isoladas e caracterizadas de 35 produtos, dos quais 24 eram queijos artesanais. Observou-se uma ampla variedade de bactérias, entre elas *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* mesofílicos, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* termofílicos, com capacidade de produção de ácido, exopolissacarídeos e bacteriocinas.

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Segundo Axelsson (2004), há 12 tipos de bactérias ácido lácticas: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*.

Durante a produção de queijo, somente cinco gêneros das bactérias citadas, são utilizadas como culturas lácticas *starters*: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (FOX et al, 2000).

Entre as culturas *starters* mesofílicas utilizadas na produção de queijo encontram-se *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (*L. lactis*) e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (*L. cremoris*). Estes *starters* são utilizados para os queijos com temperaturas moderadas de processamento (<40 °C), como queijo tipo Gouda e Edam. Para queijos que requerem altas temperaturas durante o processamento, são utilizadas culturas termofílicas como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Quando é desejável “olhaduras” no queijo, é utilizadas culturas formadoras de gás, como *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, ou *Propionibacterium shermanii* (HELLER et al, 2008).

### 2.5.1 *Lactococcus*

Os *Lactococcus* são os principais micro-organismos mesófilos utilizados para produção de ácido em fermentações de leite. São homofermentativos e quando cultivados em leite, mais de 95% do seu produto final é ácido láctico. Estão intimamente associados com produtos lácteos, mas das cinco espécies atualmente reconhecidas, apenas uma, *Lactococcus lactis*, é efetivamente utilizado em produtos lácteos. Três subespécies de *Lactococcus lactis* podem ser distinguidas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (HASSAN & FRANK, 2001; AXELSSON, 2004).

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* possui maior tolerância ao calor e ao sal, desenvolvendo-se a 40°C em presença de até 4% de NaCl, enquanto que o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, desenvolve-se com até 2% de NaCl. Uma variante do *Lactococcus lactis* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*) converte citrato em diacetil, dióxido de carbono e outros compostos que são responsáveis pelo sabor e aroma amanteigado do queijo. Acredita-se que o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* oferece um melhor sabor no queijo do que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (HASSAN & FRANK, 2001; FOX et al, 2000).

Os *Lactococcus* são utilizados na elaboração de queijos de massa cozida a baixas temperaturas, produzindo ácido láctico com muita rapidez e reduzindo seu tempo de utilização, já que ao longo do tempo algumas cepas podem produzir sabores estranhos no queijo (SCOTT, 1991).

### 2.5.2 *Leuconostoc*

*Leuconostoc* são bactérias mesófilas, com crescimento ótimo em temperaturas que variam 18°C a 25°C. Algumas espécies são capazes de crescer em temperaturas abaixo de 10°C, possuem forma de cocos e são heterofermentativas. Algumas também produzem exopolissacarídeos a partir da sacarose (HUTKINS, 2006; HASSAN & FRANK, 2001).

Além disso, embora *Leuconostocs* geralmente diminuam o pH do meio para 4,5 - 5,0, a produção de ácido de algumas espécies são relativamente modestas, principalmente quando comparadas aos *Lactobacillus* homofermentativos ou outras bactérias ácido lácticas (HUTKINS, 2006).

Os gêneros que são utilizados em fermentação láctica incluem *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis*, que produzem quantidades significativas de diacetil a partir do citrato presente no leite, sendo que o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, tem sido utilizado nos produtos lácteos industriais para este fim (HUTKINS, 2006; AXELSSON, 2004).

Em culturas *starters*, *Leuconostoc spp.* são combinados com *lactococcus* quando a produção de diacetil e dióxido de carbono são desejados além da acidificação (HASSAN & FRANK, 2001).

### 2.5.3 Streptococcus

Antigamente os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, e *Vagococcus* faziam parte de um único gênero: *Streptococcus*. O único tipo de *Streptococcus* sp utilizado em fermentações de leite é o *Streptococcus thermophilus* sendo diferenciado de outros *Streptococcus* e *Lactococcus*, pela resistência ao calor, a capacidade de crescer a 52°C e de fermentar um limitado número de carboidratos. A maioria dos produtos lácteos submetidos a altas temperaturas durante a fermentação (>40°C) é acidificados pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus spp.* O *Streptococcus thermophilus* tem capacidade proteolítica limitada, embora possuam muitos tipos de enzimas proteolíticas (AXELSSON, 2004; HASSAN & FRANK, 2001).

O *S. thermophilus*, tal como outras bactérias ácido lácticas, é responsável pela produção de ácido láctico, mas pode também sintetizar exopolissacarídeos, que normalmente transmitem uma desejável "pegajosidade" ou textura viscosa aos produtos lácteos fermentados. É altamente adaptado ao meio láctico convertendo, de forma rápida, lactose para ácido láctico (FOX et al, 2004; HUTKINS, 2006).

Estes micro-organismos possuem temperatura ótima mais elevada (40°C a 42°C), com temperatura máxima de crescimento a 52°C, e tolerância térmica acima de 60°C. São tolerantes ao sal e possuem uma diversidade metabólica limitada. Suas necessidades nutricionais são um pouco mais exigentes do que *Lactococcus* (HUTKINS, 2006).

#### 2.5.4 Enterococcus

*Enterococcus* são micro-organismos cujo habitat natural é o trato intestinal do homem e de animais. Eles são gram-positivos em forma de cocos, catalase-negativo, homofermentativos, produzindo ácido láctico a partir de glicose. São tolerantes ao sal e ao calor, crescendo geralmente em presença de até 6,5% de NaCl e até 45°C (HASSAN & FRANK, 2001; FOX et al, 2000).

Uma vez que a principal fonte de muitos deles é material fecal, são usados como indicadores da segurança alimentar, tendo um possível envolvimento com doenças de origem alimentar. São considerados culturas *starters* porque são comuns nas culturas artesanais e são considerados desejáveis para transmitir sabores aos queijos feitos com essas culturas. Algumas cepas de *enterococcus* podem produzir bacteriocinas inibitórias contra bactérias deterioradoras ou patogênicas, podendo assim, ser utilizadas como culturas protetoras na indústria leiteira (FOX et al, 2000; BHARDWAJ et al, 2008).

Ao contrário dos *Lactococcus*, os *Enterococcus* não são destruídos por pasteurização e podem ser encontrados em grandes números em muitos queijos. Sua população no final da maturação pode alcançar até  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> de acordo com o tipo queijo. As espécies isoladas mais frequentemente são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* (FOX et al, 2004).

Serio et al (2007) isolaram e identificaram 70 estirpes de *enterococcus* no queijo Pecorino Abruzzese, das quais 48,5% eram *Enterococcus faecium*, 40% eram *Enterococcus faecalis* e 11,5% *Enterococcus durans*. Suas pesquisas mostram resistência a antibióticos por parte de *E. faecium* e ausência de genes virulentos em *E. durans*. A comparação desses resultados com estudos anteriores indica que

enterococcus isolados de queijo Pecorino Abruzzese têm baixo potencial patogênico.

Altos níveis de contaminação de enterococcus poderiam levar à deterioração das propriedades sensoriais em alguns queijos, mas também desempenhar o papel benéfico na maturação do queijo e desenvolvimento do aroma (BHARDWAJ et al, 2008).

### 2.5.5 Lactobacillus

O gênero *Lactobacillus* é de longe o maior dos gêneros incluídos nas bactérias ácido lácticas. Possui grande variedade de propriedades fisiológicas, fenotípicas e bioquímicas devido à sua forma de bacillus. O gênero pode ser dividido em três grupos, com base na fermentação final: homofermentativos, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos (HASSAN & FRANK, 2001; AXELSSON, 2004).

*Lactobacillus* homofermentativos fermentam exclusivamente açúcares hexoses para produção de ácido láctico pela via glicolítica. Este grupo inclui todos os lactobacillus termófilos encontrados em fermentos (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*). Eles crescem em temperaturas (>45°C) mais altas do que nos outros grupos de lactobacilos além de serem termodúricos (HASSAN & FRANK, 2001; FOX et al, 2000).

*Lactobacillus* heterofermentativos facultativos fermentam homofermentativamente hexoses a lactato, e heterofermentativamente pentoses e gluconato a lactato e acetato. Este grupo inclui vários dos lactobacilos encontrados em culturas artesanais e queijos maturados, como *Lb. cavalete*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, e *Lb. curvatus* (FOX et al, 2000). Segundo Hassan & Frank (2001), *Lactobacillus casei* não é normalmente encontrado em fermentos, mas está associada com a fermentação secundária benéfica durante a maturação do queijo.

*Lactobacillus* heterofermentativos fermentam açúcares heterofermentativamente para concentrações equimolares de lactato, etanol e CO<sub>2</sub>.

Os únicos relatados na literatura em queijo são *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*, que são considerados bactérias não starters (FOX et al, 2000). De acordo com Hassan & Frank (2001), este grupo de *Lactobacillus* pode causar sabor indesejável e formação de gás durante a maturação do queijo. Na tabela 4 encontram-se algumas características dos *Lactobacillus* de acordo com cada grupo.

**Tabela 4. Algumas características do gênero *Lactobacillus*.**

Características	Bactérias Homofermentativas	Bactérias Heterofermentativas facultativas	Bactérias Heterofermentativas
Fermentação de Pentose	-	+	-
CO <sub>2</sub> a partir de glicose	-	-	+
CO <sub>2</sub> a partir de Gluconato	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrückii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. Sakei</i>	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. reuteri</i>

Fonte: AXELSSON (2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 SELEÇÃO E COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de soro de queijo (SA, SB e ST) e de queijo (A, B e C) foram coletadas durante o processamento do queijo marajoara nas unidades produtoras no município de Soure e identificadas conforme a tabela 5. Cada amostra do queijo foi composta de 6 porções coletadas ao final do processamento e cada amostra de soro, composta por 500 mL do soro obtido ao final da primeira dessoragem. As amostras de queijos eram frescas e sem maturação e as amostras de soro foram coletadas no mesmo dia da dessoragem.

**Tabela 5. Identificação, Tipo de amostras, Localização e Período de Coleta**

<b>Nome da amostra</b>	<b>Localização</b>	<b>Tipo</b>	<b>Período de Coleta (mês/ano)</b>
A	Agroindústria 1 (Seca)	Queijo	09/2009
B	Agroindustria 2 (Seca)	Queijo	09/2009
C	Agroindustria 3 (Seca)	Queijo	09/2009
SA	Agroindústria 1 (Seca)	Soro	09/2009
ST	Agroindústria 1 (Alagado)	Soro	02/2010
SB	Agroindústria 2 (Alagado)	Soro	02/2010

A coleta foi realizada em dois períodos de grande variação de clima na Ilha do Marajó (Tabela 5), no período de alagado, em que a produção de queijo é intensa, e no período de seca, em que a produção é escassa. Foram utilizados sacos de coleta estéreis para as amostras de queijo e recipientes de vidro esterilizados para as amostras de soro, seguido da identificação das amostras e do transporte em gelo para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, em um período de até 12 horas de sua produção.

### 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As 6 porções, de 25 gramas, de cada uma das amostra do Queijo Marajoara foram trituradas e misturadas. Após isso retirou-se uma amostra representativa de 25g para realização das análises. Em seguida foram homogeneizadas em Stomacher (Marca Seward) com 225ml de solução peptonada a 0,1% (Himedia)

As amostras de soro foram homogeneizadas para obtenção de amostras representativas de 25 mL de cada amostra. Sendo então realizado o plaqueamento sem diluição e com as diluições de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ .

As amostras diluídas foram semeadas, em profundidade, nos meios ágar M17 (Marca Himedia) e ágar MRS (Marca Himedia) com posterior incubação a 32°C, por 72 horas.

Após incubação, colônias características de bactérias lácticas (pequenas, arredondadas e opacas) foram selecionadas aleatoriamente das placas contendo entre 25 e 250 UFC e transferidas para tubos contendo caldo MRS (Marca Himedia) modificado pela adição de 50% de LDR - Leite Desnatado Reconstituído MOLICO® a 10% e incubadas a 30°C, por 48 horas, ou até coagulação do meio. Em seguida, avaliou-se a pureza dos isolados por microscopia sendo as colônias Gram-negativas descartadas.

Quando necessário, foi realizada a purificação das colônias através de estriamento da cepa em ágar MRS a 32°C por 48 horas.

Dos isolados que apresentaram características de coagulação no caldo MRS modificado com 50% de LDR, Gram-positivos e catalase negativa, foram escolhidas aleatoriamente 20 para serem submetidos aos testes bioquímicos.

Concluídas as análises bioquímicas as bactérias lácticas foram selecionadas de acordo com a chave de classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) e com as características apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6. Características Diferenciais de Bactérias Ácido Lácticas em forma de coccus**

<b>Características</b>	<b><i>L. lactis ssp. lactis</i></b>	<b><i>L. lactis ssp. diacetylactis</i></b>	<b><i>L. lactis ssp. cremoris</i></b>	<b><i>L. raffinolactis</i></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>	<b><i>E. avium</i></b>	<b><i>E. durans</i></b>	<b><i>S. thermophilus</i></b>
Crescimento a 10 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Crescimento a 40 °C	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Crescimento a 45 °C	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Crescimento em 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Crescimento em 4% NaCl	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Crescimento em 6.5% NaCl	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Hidrólise de Arginina	+	±	-	-	+	+	+	+	-
Ácido formado por									
Maltose	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Manitol	±	±	-	±	+	±	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	±	+	±	+	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fonte: Bulut (2003)

### 3.3 TESTES BIOQUÍMICOS

#### 3.3.1 Coloração de Gram

O teste é utilizado na diferenciação de bactérias por observação microscópica após coloração. A cor azul púrpura indica bactéria Gram-positiva, e a cor vermelha indica bactéria Gram-negativa.

#### 3.3.2 Teste de Catalase

Submeteu-se os isolados Gram-positivos ao teste de catalase<sup>5</sup> segundo Bulut (2003), que consiste na inoculação do isolado em Ágar MRS (Himedia) inclinado, seguido de incubação a 30 °C por 24 h. Após esse período adicionou-se três gotas de peróxido de hidrogênio (Vetec) (3,0%) sobre as colônias. O teste foi considerado positivo para bactérias lácticas com a observação da não efervescência durante a análise.

#### 3.3.3 Produção de Gás

O teste diferencia isolados homofermentativos e heterofermentativos a partir da produção de CO<sub>2</sub>. Assim, os isolados foram incubados em caldo MRS (Himedia) com tubos de Durham invertidos por 5 dias a 30 °C. A presença de gás nos tubos de Durham evidencia a produção de CO<sub>2</sub> a partir de Glicose (BULUT, 2003).

---

<sup>5</sup> O teste consiste na observação da presença da enzima catalase. Quando em presença de peróxido de hidrogênio, a enzima quebra o composto produzindo água e oxigênio, gerando bolhas de gás durante a reação.

### **3.3.4 Hidrólise da Arginina**

Os isolados que se apresentaram característicos de bactérias ácido-lácticas, foram submetidos à avaliação de hidrólise de arginina. Seguindo a metodologia descrita em Silva (2007), cultivaram-se os isolados em caldo descarboxilase de Moeller com arginina (Himedia), para observação da mudança de coloração, seguido de incubação a 30 °C/24-48 h.

Os isolados inoculados que hidrolisam arginina, modificam a cor do caldo primeiramente para amarelo, devido a produção de ácido láctico e depois para violeta, por causa da produção de amônia. Por outro lado, os isolados que não hidrolisam arginina, modificam a coloração do caldo para um amarelo intenso devido à produção somente de ácido láctico.

### **3.3.5 Crescimento a 2,5; 4,0 e 6,5 % NaCl;**

Cultivaram-se os isolados em Caldo Bacto Lactose (Himedia) contendo 2,5; 4,0 e 6,5% de cloreto de sódio (Vetec). Seguiu-se a incubação a 30 °C por 48 h. Após esse período, o crescimento dos isolados foi avaliado de maneira visual através da observação da turbidez do meio (HOLT, et al. 1994).

### **3.3.6 Crescimento a pH 9,2 e 9,6**

Procedeu-se a avaliação dos isolados em relação a capacidade de crescimento em pH de 9,2 e 9,6 utilizando o meio Caldo Triptona de Soja (Himedia). O pH do caldo esterilizado foi ajustado para 9,2 e 9,6 com solução de NaOH a 1%, esterilizada através de filtração por membrana GS 0,22 µm, 25mm de diâmetro (Millipore). Alíquotas foram retiradas e o pH mensurado através de pHmetro (MARCA). Em seguida procedeu-se a inoculação do isolado em 5 mL do caldo,

seguido de incubação a 30 °C por 48 h. O crescimento do micro-organismo foi identificado pela turvação do meio (HOLT, et al. 1994).

### **3.3.7 Crescimento a 10, 30, 40 e 45 °C**

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em Leite Desnatado Reconstituído (12 %) nas temperaturas de 10 °C por 7-30 dias e 30, 40 e 45 °C por 48h. A coagulação do leite indicou resultado positivo (LEITE, 1993).

### **3.3.8 Fermentação dos carboidratos glicose, maltose, manitol e sorbitol**

Foi avaliada a capacidade de crescer em caldo base com púrpura de bromocresol (Himedia) adicionado de um açúcar específico. Inicialmente preparou-se uma solução dos carboidratos glicose (Nuclear), maltose (Himedia), manitol (Nuclear) e sorbitol (Vetec), a 10%, esterilizada por meio de filtração em membrana GS (Millipore, 0,22µ). Acrescentou-se a solução, de maneira asséptica, ao meio caldo base com púrpura de bromocresol já esterilizado, até atingir uma concentração final de 1 % no meio. As culturas foram inoculadas e incubadas a 30 °C por 48 h. O desenvolvimento de coloração amarela indicou resultado positivo para a fermentação dos carboidratos e coloração violeta resultado negativo (FURTADO, 1990).

## **3.4 SELEÇÃO DE DOIS MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS PARA A CONSTITUIÇÃO DA CULTURA EXPERIMENTAL**

Com base nos resultados de caracterização dos isolados, dois destes foram selecionados para compor a cultura experimental, nas seguintes proporções 50% de

*Lactococcus lactis* e 50% de *Streptococcus thermophilus*, e mantidos separadamente até o momento da produção dos queijos.

#### **3.4.1 Preparo da Cultura Experimental**

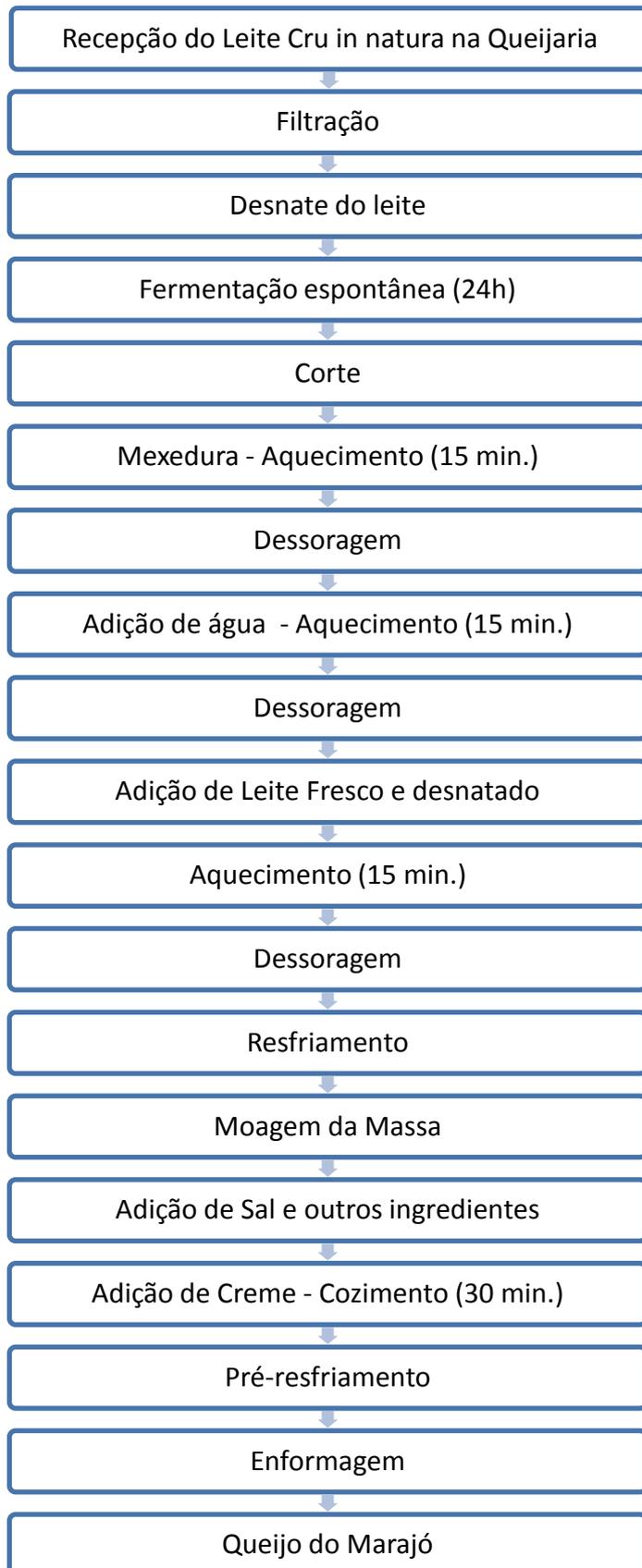
A cultura experimental foi obtida a partir de dois microrganismos isolados e caracterizados bioquimicamente, ativados separadamente em caldo MRS por 12 h, seguido de inoculação em caldo LDR 10% e posterior incubação a 30 °C por 24 h.

### **3.5 UTILIZAÇÃO DA CULTURA EXPERIMENTAL DO QUEIJO MARAJOARA**

Dois lotes de Queijo Marajoara foram fabricados, na própria Ilha do Marajó, sendo um lote fabricado de maneira tradicional e em outro lote empregado a cultura experimental, procurando-se manter neste último o processo de fabricação tradicional do queijo.

#### **3.5.1 Fabricação do Queijo Marajoara de Estudo**

O fluxograma da Fabricação do Queijo Marajoara utilizada é mostrado na Figura 4.



**Figura 4. Fluxograma da Produção do Queijo Marajoara**

Utilizou-se 20L de leite de búfala para cada lote. A cultura experimental foi adicionada ao leite no momento inicial da fermentação espontânea, logo após a etapa de desnate do leite de um dos lotes, na proporção de 1% (v/v). O Queijo tradicional Marajoara foi posteriormente codificado como QP e o Queijo adicionado de cultura foi codificado como QE.

### 3.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS QUEIJOS DE ESTUDO PRODUZIDOS NA AGROINDÚSTRIA

As análises microbiológicas foram realizadas para avaliação do desenvolvimento microbiano de bactérias mesófilas, bactérias lácticas e coliformes termotolerantes nos dois processos.

A preparação das amostras ocorreu conforme descrito anteriormente no tópico 3.2.

#### **3.6.1 Contagem de Bactérias Mesófilas**

Foram transferidas alíquotas de 1mL da amostra a partir de diluições decimais em duplicata, para placas de Petri contendo Ágar Padrão de Contagem (Marca Himedia), sendo estas incubadas a 37 °C por 48 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

#### **3.6.2 Contagem de Bactérias Lácticas**

Foram transferidas alíquotas de 1mL da amostra a partir de diluições decimais em duplicata, para placas de Petri contendo ágar MRS (Marca Himedia) com posterior incubação a 32 °C, por 48 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

### **3.6.3 Coliformes Termotolerantes**

As determinações de Coliformes termotolerantes foram realizadas a partir de diluições decimais, utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP). Para o teste presuntivo utilizou-se o caldo Lauril Triptose (Marca Himedia) com posterior incubação a 36°C por 48 horas. Em caso de resultado positivo – tubos com presença de gás – procedeu-se a repicagem para tubos contendo caldo EC (Marca Himedia) seguido de incubação em banho maria a 45,5°C por 24-48 horas.

## **3.7 ANÁLISE SENSORIAL**

Após um período de cinco dias de maturação procedeu-se a análise sensorial dos queijos. As amostras inicialmente foram submetidas a um teste de diferença Duo-Trio, para avaliar se existem diferenças ocasionadas com a adição da cultura isolada. Em seguida foram avaliadas aceitação de cor, sabor, maciez e aparência global, através de escala hedônica estruturada de nove pontos, conforme a Figura 5.

Amostra: Queijo Marajoara

Julgador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e duas amostras codificadas de Queijo do Marajó. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras, da esquerda para direita, e faça um círculo na amostra igual à amostra padrão (p).

395                      783

Agora avalie as amostras codificadas, da esquerda para a direita, e diga o quanto gostou e desgostou de cada atributo do produto de acordo com a escala abaixo:

<p>9 - Gostei muitíssimo</p> <p>8 - Gostei muito</p> <p>7 - Gostei regularmente</p> <p>6 - Gostei ligeiramente</p> <p>5 - Não gostei, nem desgostei</p> <p>4 - Desgostei ligeiramente</p> <p>3 - Desgostei regularmente</p> <p>2 - Desgostei muito</p> <p>1 - Desgostei muitíssimo</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Amostra 395</th> <th style="text-align: left;">Nota</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sabor:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cor:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Maciez:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Aparência Global:</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Amostra 783</th> <th style="text-align: left;">Nota</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sabor:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cor:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Maciez:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Aparência Global:</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Amostra 395	Nota	Sabor:		Cor:		Maciez:		Aparência Global:		Amostra 783	Nota	Sabor:		Cor:		Maciez:		Aparência Global:	
Amostra 395	Nota																				
Sabor:																					
Cor:																					
Maciez:																					
Aparência Global:																					
Amostra 783	Nota																				
Sabor:																					
Cor:																					
Maciez:																					
Aparência Global:																					

**Figura 5. Ficha aplicada durante a Análise Sensorial.**

A equipe de provadores foi formada por cinquenta provadores não treinados de ambos os sexos, e a avaliação das amostras foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Cada amostra foi codificada com um número de três dígitos e apresentadas cortadas em retângulos de, aproximadamente, três centímetros de altura por um centímetro de base (3x1 cm).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise estatística através do teste de Análise de Variância – ANOVA – ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Statistica 7.0 (StatSoft).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS

Os resultados da inoculação das amostras de queijo e soro para obtenção dos isolados, em ágar MRS e ágar M17 estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7. Contagem Microbiana Logarítmica (log UFC/g ou mL) da média da duplicata e Desvios Padrões.**

Amostra	Ágar MRS	Ágar M17
A	$<1,00 \pm 0,000$	$<1,00 \pm 0,000$
B	$6,38 \pm 0,026$	$6,39 \pm 0,013$
C	$4,42 \pm 0,598$	$5,67 \pm 0,039$
SA	$5,69 \pm 0,013$	$4,95 \pm 0,069$
ST	$6,38 \pm 0,027$	$7,27 \pm 0,067$
SB	$8,20 \pm 0,038$	$>8,40 \pm 0,000$

A, B e C: amostras de queijo  
SA, ST e SB: soro de queijo

Observa-se que a amostra A não apresentou crescimento de bactérias a níveis representativos, nos dois meios de cultura, diferenciando-se das demais amostras de queijo e de soro. É possível que esse queijo tenha passado por um tratamento térmico mais severo durante o processamento, o que inviabilizou o isolamento de micro-organismos. Deve-se ressaltar que durante o processamento ocorrem dois cozimentos a aproximadamente 80°C. Observa-se também que as três amostras de soro apresentaram crescimento de micro-organismos que variaram de 4,95 a >8,40 ciclos logarítmicos, enquanto que para o queijo essa variação foi de <1,00 a 6,39 ciclos, portanto o soro do queijo apresentou maior contagem de bactérias do que o queijo marajoara.

O crescimento das bactérias para as amostras A, B, C, SA e ST foram semelhantes nos dois meios de cultura utilizados e não houve diferença significativa na contagem média entre os meios. Na amostra SB a contagem em ágar M17 foi

superior à contagem obtida em ágar MRS, o primeiro apresentando-se em quantidades incontáveis na maior diluição.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Após a contagem das placas, foram isoladas 283 colônias bem definidas e características de bactérias lácticas, sendo 83 isolados provenientes da coleta realizada no período de seca e 200 isolados da coleta realizada no período de alagado.

Todos os isolados apresentaram crescimento e coagulação do leite quando inoculados em caldo MRS modificado pela adição de 50 % de LDR. Assim, os isolados então foram submetidos aos testes de Coloração de Gram e Catalase.

### 4.2.1 Coloração de Gram e Teste de Catalase

As colônias isoladas foram submetidas à coloração para avaliação da forma e característica de Gram e à verificação da atividade de catalase. Dos 283 isolados, 246 se apresentaram Gram-positivos, todos possuindo forma de coccus, em arranjos de cadeia ou aglomerados, como pode ser visualizado na figura 6.

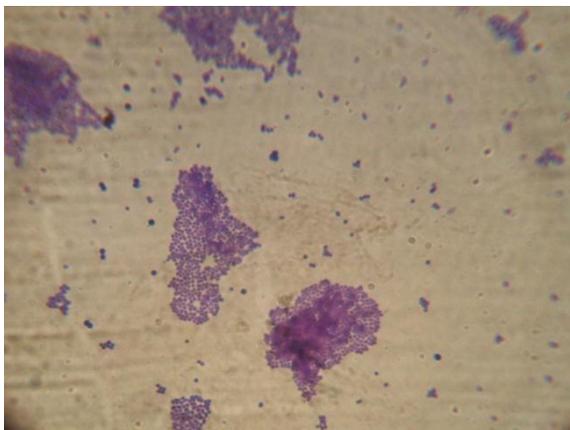


Figura 6. Coloração de Gram da amostra, mostrando a morfologia de coccus

Após este teste os 246 isolados Gram positivos foram submetidos ao teste de verificação de atividade de catalase. Destes, 159 isolados (64,63 % do total de isolados) apresentaram-se como catalase negativa. Veljovic *et al* (2007), obteve 253 bactérias Gram-positivas e catalase negativas, representando 82,68% do total inicial encontrado em meios ágar M17 e ágar MRS, em queijo Zlatar artesanal produzido sem adição de qualquer cultura *starter*.

A quantidade de isolados confirmados Gram-positivos e catalase negativos não apresentaram diferença significativa entre os meios, mas apresentaram diferença significativa entre os períodos de coleta. Dos 83 isolados obtidos somente no período de seca, 10 foram confirmados Gram-positivos e catalase negativos, sendo 12,05 % dos confirmados oriundos do ágar MRS e 1,20 % do ágar M17.

Para os 200 isolados obtidos somente no período de alagado, 148 foram confirmados Gram-positivos e catalase negativos, sendo 36,5 % dos confirmados oriundos do ágar MRS e 37,5 % oriundos do ágar M17. Do total de isolados obtidos tanto no período de seca quanto de alagado, 159 isolados foram confirmados Gram-positivos e catalase negativos, sendo destes 6,92 % obtidos no período de seca, enquanto que 93,08 % foram obtidos no período de alagado. Observou-se que na época de alagado, isolados com características de bactérias lácticas são significativamente mais perceptíveis do que isolados obtidos na época de seca. Isso pode ser atribuído as mudanças climáticas que afetam a qualidade do leite e sua composição química, podendo haver escassez de nutrientes às bactérias fastidiosas. Baseado neste fato, colônias características de bactérias ácido lácticas podem ser encontradas em maior número no período de alagado do que no período de seca. Após esses testes, as colônias Gram-positivas e catalase negativas foram submetidas aos demais testes bioquímicos para identificação preliminar.

#### **4.2.2 Diferenciação Bioquímica**

De um total de 159 isolados Gram-positivos e catalase negativos, vinte foram escolhidos aleatoriamente, para a identificação através das características

bioquímicas. As Figuras 7a e 7b mostram os resultados obtidos para os testes de hidrólise de arginina e fermentação de carboidratos respectivamente. Os resultados das provas bioquímicas são mostrados na tabela 8.



**Figura 7. Resultado positivo - violeta turvo - para Hidrólise de Arginina (a) e Fermentação de carboidratos - amarelo turvo - (b)**

Tabela 8. Resultado dos testes bioquímicos

Isolado	Gram	Forma	Catalase	Hidrólise de Arginina	Manitol	Sorbitol	Maltose	Glicose	10°C	30 °C	40°C	45°C	2,5% NaCl	4% NaCl	6,5% NaCl	pH 9,2	pH 9,6	Produção de Gás
1c10	+	Cocos	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1s14	+	Cocos	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1s3p	+	Cocos	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1SB13	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
1ST10	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
1ST11	+	Cocos	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1ST16	+	Cocos	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1ST2	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1ST22	+	Cocos	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1ST26	+	Cocos	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Código iniciando com 1 e 2 indica: 1= Isolado obtido a partir de ágar MRS; 2 = Isolado obtido a partir de ágar M17

Tabela 8. Resultado dos testes bioquímicos (cont.)

Isolado	Gram	Forma	Catalase	Hidrólise de Arginina	Manitol	Sorbitol	Maltose	Glicose	10°C	30 °C	40°C	45°C	2,5% NaCl	4% NaCl	6,5% NaCl	pH 9,2	pH 9,6	Produção de Gás
1ST7	+	Cocos	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2s6	+	Cocos	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2SB24	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2SB26	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2ST11	+	Cocos	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
2ST16	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2ST18	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
2ST2	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2ST26	+	Cocos	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
2ST8	+	Cocos	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Código iniciando com 1 e 2 indica: 1= Isolado obtido a partir de ágar MRS; 2 = Isolado obtido a partir de ágar M17

Os vinte isolados selecionados apresentaram produção de gás negativo, mostrando então que todos os isolados são homofermentativos, sendo este resultado compatível com a forma dos isolados observada. As bactérias lácticas homofermentativas pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* e alguns tipo de *Lactobacillus*.

Realizou-se a identificação dos isolados de acordo com as suas características, os isolados que apresentaram o maior número de características da espécie-tipo foram agrupados dentro daquela espécie.

De acordo com Bergey's Manual (1994), os crescimentos em 30° C, 45° C, 4% de NaCl e hidrólise de arginina positiva, foram denominados como gênero *Lactococcus lactis ssp lactis*. Dos 20 isolados caracterizados bioquimicamente, nove isolados foram considerados como pertencentes a esta espécie.

Bulut (2003) observou que bactérias consideradas da mesma espécie que *Lactococcus lactis ssp lactis*, apresentaram comportamentos diferentes pelos descritos no Bergey's Manual (1994), havendo crescimento em 45°C e em 6,5% de NaCl. A propriedade destas bactérias de crescerem em situações atípicas favorece o ramo industrial, que pode utilizá-las em um processamento diferente.

*Streptococcus* foram agrupados de acordo com as características de crescimento em 45 °C e hidrólise de arginina positiva. Dois isolados apresentaram características de *Streptococcus thermophilus*, e além destes três isolados apresentaram características de *Streptococcus* e *Enterococcus*, além de dois com características de *Streptococcus* e *Lactococcus*. Rossetti et al (2008) estudou as bactérias lácticas presentes no soro do queijo Grana Padano, identificando em 18 amostras – de um total de 24 amostras – as espécies *Streptococcus* e *Lactococcus*, que são as mais encontradas em queijos.

Isolados com crescimentos em 6,5% de NaCl, 45 °C, e pH 9,6 e hidrólise de arginina positivas foram agrupados na espécie *Enterococcus*. Dois isolados tais características, sendo considerados, portanto, *Enterococcus*.

Dois isolados não conseguiram ser identificados, devido a diferença dos resultados dos testes bioquímicos. As diferenças nos resultados dos testes podem ser atribuídas a inúmeros fatores, dentre eles: comportamento das bactérias, imprecisão dos equipamentos utilizados ou até mesmo novas espécies não identificadas.

Os gêneros de subespécies de *Enterococcus* não puderam ser identificados, devido a imprecisão dos resultados dos testes, já que o comportamento da atividade bacteriana pode mudar de acordo com as variáveis a elas aplicadas.

De acordo com os resultados obtidos, foi demonstrado que os métodos somente por caracterização bioquímica não são suficientes para realizar uma identificação adequada.

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DO QUEIJO MARAJOARA PRODUZIDO COM A CULTURA EXPERIMENTAL

Durante a fabricação do queijo realizada como mostra o fluxograma da figura 4, avaliou-se o tempo necessário para coagulação da massa sendo verificado que esse tempo foi semelhante para ambos os lotes, sendo aproximadamente vinte e quatro minutos. Ao ser adicionada ao leite não pasteurizado, a cultura se adapta ao meio e se multiplica em quantidade bem maior que os micro-organismos presente no leite, já que possui uma população inicial bem maior que estes últimos, utilizando uma quantidade maior de substrato durante a fermentação e limitando o crescimento de outros micro-organismos.

##### 4.3.1 Contagem Total de Bactérias

Com base nos resultados apresentados na tabela 9, podemos observar que o crescimento de bactérias mesófilas em ágar PCA ocorreu de modo semelhante nas duas amostras não apresentando diferença significativa a ( $\alpha = 0,05$ ) entre os resultados, ambas permanecendo em torno de quatro ciclos logarítmicos, mas ainda apresentando maior contagem na amostra de queijo tradicional produzido sem a cultura experimental (QP).

**Tabela 9. Contagem Microbiana para bactérias mesófilas (log UFC/g). Média da duplicata e Desvios Padrões**

Amostras	Ágar PCA	Ágar MRS
QP	4,95 ± 0,244	3,63 ± 0,174
QE	4,40 ± 0,049	3,96 ± 0,036

QP: Queijo Tradicional; QE: Queijo adicionada de cultura experimental

#### **4.3.2 Contagem de Bactérias Lácticas**

Com base no crescimento de bactérias lácticas em ágar MRS, mostrado na tabela 9, observou-se que, após a produção do queijo, ambas as amostras apresentaram populações semelhantes, permanecendo em torno de três ciclos logarítmicos. Portanto não houve diferença significativa a 5% de significância entre os resultados, mas apresentando uma contagem maior de bactérias lácticas na amostra adicionada de cultura experimental. Deve-se ressaltar que não foi realizada a caracterização bioquímica dessas bactérias. Portanto considerou-se que todas as colônias eram de bactérias lácticas.

#### **4.3.3 Coliformes Termotolerantes**

Na avaliação de coliformes termotolerantes, os queijos produzidos apresentaram crescimento < 3NMP/g, encontrando-se menor do que o limite estabelecido pela RCD 12 para queijos de média umidade e demonstrando a boa qualidade do mesmo.

#### 4.4 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial avaliou possíveis diferenças percebidas pelos provadores entre o Queijo Marajoara tradicional e o Queijo Marajoara adicionado de cultura láctica. Avaliou-se também a aceitação para os atributos de sabor, cor, maciez e aparência global de cada lote de queijo. No teste Duo-Trio, os resultados mostraram que foi percebida diferença significativa ao nível de 5% de significância entre as duas amostras.

Quanto à avaliação de aceitação global dos queijos, houve boa aceitação de ambas as amostras, situando-se na escala hedônica em “Gostei muito”. As amostras não apresentaram diferença significativa na aceitação global dos queijos a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Com relação ao sabor foi observada diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância. As amostras de queijo tradicional receberam em média a classificação “Gostei regularmente”, enquanto que a amostra de queijo experimental recebeu em média “Gostei muito”.

Quanto à coloração dos queijos foi percebida uma diferença de cor significativa ao nível de 5% de significância, sendo atribuídos em média os quesitos “Gostei regularmente” para a amostra de queijo tradicional e “Gostei muito” para a amostra de queijo experimental.

O atributo maciez, não apresentou uma diferença significativa ao nível de 5% de significância, tendo o queijo tradicional e o queijo experimental recebido, em média, a mesma classificação “Gostei muito”.

Mesmo com a diferença significativa entre os atributos, os dois produtos foram muito bem aceitos, sendo o índice de aceitação de 78,60% para a amostra de queijo experimental e 77,40% para a amostra de queijo tradicional Marajoara.

## 5 CONCLUSÕES

- Não houve diferença significativa na contagem de bactérias lácticas nos diferentes meios de cultura (Ágar MRS e Ágar M17) utilizados, demonstrando boa adaptação em ambos os meios;
- A maior confirmação de isolados característicos de bactérias lácticas foi no período de alagado, representando 93,08% do total de isolados confirmados, comprovando assim a interferência climática na produção do Queijo do Marajoara;
- No Queijo Marajoara, todos os isolados característicos de bactérias ácido lácticas foram encontrados somente na forma de cocos;
- Não houve presença de bactérias heterofermentativas, confirmando assim que o principal produto fermentativo dos isolados é o ácido láctico;
- Com relação à contagem de bactérias mesófilas e lácticas entre os queijos, não houve diferença significativa, mas percebeu-se uma redução em ambas as contagens quando o queijo foi inoculado com a cultura experimental;
- Quanto à avaliação sensorial do queijo produzido com a cultura endógena, foi observada diferença significativa ao nível de 5% de significância, no teste duo-trio aplicado entre a amostra produzida sem adição de cultura e a amostra produzida com adição de cultura láctica;
- Observou-se também diferença significativa ao nível de 5% de significância para as características de sabor e cor;
- Os queijos produzidos com adição e sem adição de cultura tiveram boa aceitação pelos provadores na característica aceitação global e maciez, e sem diferença significativa entre os resultados.

## **Sugestões para trabalhos futuros**

Este estudo produziu dados originais sobre a microbiota láctica do Queijo Marajoara produzido artesanalmente e dos efeitos nas suas propriedades organolépticas. No entanto, os assuntos abordados neste estudo podem ter sequência e serem aprofundados em trabalhos futuros. Com o objetivo de contribuir para a continuidade das pesquisas são sugeridos a seguir:

- Caracterização genética das Bactérias Ácido Lácticas isoladas do Queijo do Marajoara, para determinação e confirmação das espécies e subespécies identificadas;
- Avaliação de atividades fermentativas das bactérias, a fim de visualizar a viabilidade como culturas *starter*;
- Ação destas bactérias como bacteriocina;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União. Brasília, 10 jan. 2001

AXELSSON, LARS. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3ª ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633 p.

BARBOSA, Natalia Guarino Souza. Bubalinocultura no Estado do Pará. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. V. 29, n.1, p.34-38, jan./mar. 2005.

BENDELAK, Michelle Russo. **Processo produtivo, características físico-químicas e microbiológicas e sugestão de implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na produção do queijo marajoara tipo creme**. Embrapa. Belém, 2004. 58p.

BERESFORD T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, 11, 259-274. 2001.

BHARDWAJ A.; MALIK, R. K.; CHAUHAN. P. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. **Indian Journal of Microbiology**. Vol. 48, 317-325, 2008.

BRASIL. Governo Federal, Grupo Executivo Interministerial. **Plano de Desenvolvimento Territorial Sustentável para o Arquipélago do Marajó: resumo executivo da versão preliminar para discussão nas consultas públicas**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007, 24 p.

\_\_\_\_\_. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. **Búfalo: Novas perspectivas para um animal mal aproveitado**. Florianópolis, SC, 1984.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Brasília, 1996.

BULUT, Çisem. **Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese**. 2003. 102 p. Dissertação (Mestrado em Ciência). İzmir Institute of Technology. Izmir, Turkey. Setembro, 2003.

CARVALHO, Juliane Döering Gasparin. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007. 154p.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E.; Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, 64, 409 – 421, 1997.

FIGUEIREDO, E. L. **Elaboração e caracterização do “queijo marajó”, tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2006. 103 p.

FINOTELO, Nemer Alfredo. **Melhoramento de tecnologia na produção e conservação do queijo marajoara**. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1981. 113 p.

FOSTER, W. C. *Microbiologia de La leche*. Zaragoza, Herrero, 1976. 481p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3ª ed. Ed: Elsevier, 2004. 466p.

FOX, P. F.; T.M.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. 3ª ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 638 p.

FURTADO, Mozart Mansur. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1990. 95 p

GOUVÊA, C. A. L.; DIAS, J. D. C. **Caracterização do queijo do Marajó e levantamento do pessoal envolvido no processamento para inserção social.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia Agroindustrial). Centro de Ciências Naturais e Tecnologia. Universidade do Estado do Pará. Belém, 2004.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2ª ed. New York: Marcel Dekker, 2001. 744 p.

HELLER, K. J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; DEVRESE, M. Cheese and Its Potential as a Probiotic Food. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2ª ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 581 p.

HENG, N. C. K; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: RILEY, M. A; CHAVAN, M. A. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**. Heidelberg: Springer, 2007. 150 p.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9. ed. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, Intern. Edition, 1994. ISBN 0-683-00603-7.

HÜHN, S. et al. **Aproveitamento do leite de búfala em produtos derivados.** In: SIMPÓSIO TRÓPICO ÚMIDO, I, 1984. Anais. Belém: Embrapa – CPATU, 1986, 428p.

HÜHN, S.; VIEIRA, L.C.; CARVALHO, J.S. **Tecnologia do leite.** Belém: Embrapa-CPATU, 1983. 52p.

HUTKINS, Robert W. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. 1ª ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2006. 473p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal – 2007**. Disponível em: [<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal\\_\[anual\]/2007/>](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal_[anual]/2007/). Acesso: 11 de março de 2009.

LEITE, M. O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo minas curado.** 1993. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1993. 64 p.

LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, 15, 67-78, 2004.

LOURENÇO, L. F. H. ; SIMÃO NETO, M ; HUHN, S. ; ALVES, S. M. ; SANTOS, A. S. ; LOURENÇO JÚNIOR, J. B. Physical and chemical analysis of the “Marajoara” cheese elaborated with milk of water buffalo and cattle. In: 1<sup>st</sup> Buffalo Symposium of the Americas, 2002, Belém - Brasil. Anais: Belém, 2002. p. 550-553.

LOURENÇO, L. F. H. **Análise da composição química, microbiológica, sensorial e dos aromas do requeijão marajoara**. 1999. 127f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Pará; Museu Paraense Emílio Goeldi; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém, 1999.

NASCIMENTO, Maristela da Silva do. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007. 184 p.

OLIVEIRA, V. L.; SILVA, V.R. **O Queijo do Marajó tipo derivado do leite de búfala: uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do agronegócio no município de Soure**. 2003. Monografia (Especialização em Empreendedorismo Rural e Desenvolvimento Sustentável). Universidade Estadual do Pará. Belém. 2003. 65 f.

ORDOÑEZ, J. A; Tecnologia de Alimentos – Alimentos de origem animal Vol.2; Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAPAGIANNI, Maria. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**. Vol 21 (6), 465-499. 2003.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde**. V.1, 9-15, 2002.

ROSSETTI, L., FORNASARI, M. E., GATTI, M., LAZZI, C., NEVIANI, E., & GIRAFFA, G. (2008). Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. **International Journal of Food Microbiology**. 127(1-2), 168-171. 2008.

SCOTT, R. **Fabricación de queso**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1991. 520 p.  
SEPOF. Secretaria de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças. Estatísticas Municipais por Mesorregiões. Disponível em:  
<<http://www.sepof.pa.gov.br/mesorregiao.html>>. Acesso em: 19 de março de 2009.

SERIO, A.; PAPARELLA, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Enterococcus populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. **Journal of Food Protection**, vol. 70 (7), 1561-1568, 2007.

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**. 3ª ed. Varela. São Paulo. 2007. 536p.

VELJOVIC, K.; TERZIC-VIDOJEVIC, A.; VUKASINOVIC, M.; STRAHINIC, I.; BEGOVIC, J.; LOZO, J.; OSTOJIC, M.; TOPISIROVIC, L. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. **Journal of Applied Microbiology**. 103, 2142–2152. 2007.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Avaliação química e nutricional do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 444-450, 1994.