

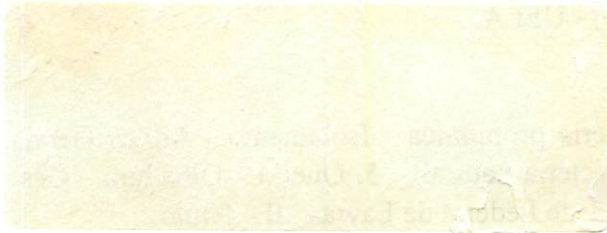
00757
M 027172

ANA CLÁUDIA MOCHEL DE SOUZA NETTO

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS NATURAIS PRODUTORAS DE GÁS EM
REGIÕES DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador
Luiz Ronaldo de Abreu**



**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA**

Netto, Ana Cláudia Mochel de Souza.

Isolamento de bactérias naturais produtoras de gás em regiões de Minas Gerais / Ana Cláudia Mochel de Souza Netto. -- Lavras : UFLA, 1997.

46 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Bactéria. 2. Bactéria propiônica - Isolamento - Minas Gerais. 3. *Propionibacterium*. 4. Bactéria natural. 5. Queijo - Olhadura - Gás. 6. Bactéria láctica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-637.1277

-637.3

ANA CLÁUDIA MOCHEL DE SOUZA NETTO

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS NATURAIS PRODUTORAS DE GÁS EM
REGIÕES DE MINAS GERAIS**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Pós Graduação
em Ciência dos Alimentos, para obtenção
do título de “Mestre”.**

APROVADA em 06/06/97


Profa. Eliana Pinheiro de Carvalho


Prof. Otacilio Lopes Vargas


Prof. Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

A todos que de alguma forma
acreditaram em mim e apoiaram

OFEREÇO

Aos meus pais, Manoel e Ercilia,
a minha irmã Angela e a minha
pequena sobrinha Brianne pelo
incentivo constante, amor e
apoio incondicional

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, pois sem eles nada seria possível.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras e todos seus professores e funcionários, pela oportunidade e ajuda.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Luiz Ronaldo de Abreu, Eliana Pinheiro de Carvalho e Múcio Mansur Furtado, pela orientação, amizade, apoio, incentivo, críticas construtivas e capacidade intelectual para apontar e resolver problemas.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em especial aos professores Otacílio Lopes Vargas, Aduino e Heloisa.

Ao amigo Marcos Elias pela paciência e disponibilidade.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos e de todos os outros laboratórios que na concessão de equipamentos ou em auxílio prático, foram essenciais à realização deste trabalho.

Ao Chefe do Departamento professor Paulo Clemente; a coordenadora do Curso, profesoorra Eliana Pinheiro de Carvalho e a secretária Gicelda, pelas informações e orientações indispensáveis à realização deste.

Às minhas amigas Anna Christina, Cíntia e Clarice pela amizade incondicional, paciência e carinho nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos: Celso, Ivana, Daise, Flávia, Josane, Regina e aos outros colegas da pós-graduação que de alguma forma contribuíram, mas sobretudo, pela amizade sincera e excelente convívio.

Aos meus monitores Lucimeire e Leonardo que me auxiliaram na fase experimental.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Números de fabricações de queijos no Brasil.....	4
2.2. Queijos tipo Suíço.....	4
2.2.1. Histórico: Emmenthal e Gruyère.....	4
2.2.2. Definição no Brasil.....	6
2.3. O leite para fabricação do Emmenthal.....	7
2.4. Bactérias propiônicas.....	8
2.4.1. Classificação.....	10
2.4.2. Características gerais.....	12
2.5. Fermentação propiônica.....	17
2.6. Formação de olhaduras.....	18
2.7. Pontos críticos da fermentação propiônica.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Isolamento, caracterização, identificação e seleção de bactérias propiônicas.....	21
3.1.1. Coleta e preparo das amostras.....	21
3.1.2. Meios de culturas empregados no isolamento.....	22
3.1.2.1. Meio Agar Lactato.....	22
3.1.2.2. Meio Pal Probiobac.....	22
3.1.3. Técnicas usadas durante o isolamento.....	23
3.1.3.1. Preparo da cepa comercial.....	23
3.1.3.2. Preparo do Queijo e Inoculação.....	24

3.1.3.3. Caracterização dos isolados.....	25
3.1.4. Identificação dos isolados.....	26
3.1.5. Tratamento térmico dos isolados.....	26
3.1.6. Fabricação dos queijos.....	27
3.1.6.1. Preparo do inóculo.....	27
3.1.6.2. Contagem das células.....	27
3.1.6.3. Fabricação.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 Isolamento de bactérias do gênero <i>Propionibacterium</i>	30
4.1.1. Primeira purificação.....	32
4.1.2. Purificação em agar com antibiótico seletivo.....	33
4.2. Caracterização e identificação dos isolados.....	34
4.2.1. Produção de esporo.....	34
4.3. Inoculação no meio de cultura Pal Propiobac.....	35
4.3.1. Inoculação direta do queijo no Pal Propiobac.....	37
4.3.2. Fabricação dos queijos com as cepas finalistas.....	39
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Evolução do gênero <i>Propionibacterium</i> , descrita por diferentes autores, no Bergey's Manual (extraído de Carvalho, 1994).....	10
2	Ação da temperatura sobre 17 espécies de bactérias propiônicas.....	15
3	Número de colônias características de propiônicas em diferentes tipos de queijos.....	30
4	Número de colônias inoculadas em aerobiose e em anaerobiose em meio agar lactato com antibiótico seletivo.....	33
5	Características gerais das cepas e situação na purificação.....	34
6	Número de colônias formadoras de esporos isoladas de diferentes tipos de queijos.....	35
7	Características das colônias inoculadas em meio de cultura Pal Propiobac.....	35
8	Caracterização morfológica, crescimento no meio Pal Propiobac, prova de Gram e catalase do queijo Prato do Laticínios Boa Nata/Curral Novo.....	37
9	Provas bioquímicas das cepas provenientes da inoculação direta em Pal Propiobac.....	38
10	Provas bioquímicas das cepas provenientes da purificação em agar lactato.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de reativação da cultura comercial.....	24
2	Esquema de preparo e plaqueamento das amostras de queijo.....	25
3	Curva padrão para determinação da concentração de <i>Propionibacterium</i> no inóculo.....	28
4	Placa de agar lactato de sódio com colônias da cepa PS1 da Chr Hansen.....	31
5	Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Curral Novo.....	31
6	Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Juiz de Fora.....	31
7	Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Lima Duarte.....	31
8	A- Placa do meio Pal Propiobac com cepa PS1 da Chr Hansen com mudança de cor em 24 horas; B- Placa do meio Pal Propiobac com cepa proveniente de Lavras com mudança de cor em 24 horas; C- Placa do meio Pal Propiobac com cepa proveniente de Barbacena com mudança de cor em 6 dias; D- Placa do meio Pal Propiobac sem cepa incubada (coloração original).....	36
9	Placa do meio Pal Propiobac com cepas provenientes de Juiz de Fora com mudança de cor em 8 dias.....	36
10	Placa do meio Pal Propiobac com inoculação direta do queijos proveniente de Curral Novo.....	37

11	Placa do meio Pal Propiobac com inoculação direta do queijos proveniente de Curral Novo.....	37
12	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	39
13	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	39
14	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	39
15	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	39
16	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	40
17	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.....	40
18	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.....	40
19	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.....	40
20	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.....	40
21	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Lavras.....	40
22	Queijo fabricado com a cepa proveniente de Barbacena.....	40

RESUMO

NETTO, Ana Cláudia Mochel de Souza. **Isolamento de bactérias naturais produtoras de gás em regiões de Minas Gerais.** Lavras: UFLA, 1997. 46p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos).

Com a finalidade de isolar bactérias produtoras de CO₂, naturalmente presentes em leites da região do Sul de Minas, Campo das Vertentes e Zona da Mata, coletou-se queijos em fábricas onde ocorrem a presença de olhaduras nos queijos, mesmo quando se utiliza fermento tipo O. As amostras foram coletados de oito fábricas assim distribuídas: 3 da Zona da Mata, 2 do Sul de Minas e 3 da região dos Campos das Vertentes. No isolamento dessas bactérias, empregou-se o meio agar lactato suplementado com cloxacilina e o meio Pal-propionbac. Foram inicialmente isoladas dos 8 queijos, 145 cepas, sendo: 58 da região Zona da Mata, 32 da região do Sul de Minas e 55 da região dos Campos das Vertentes. Dessas 145 cepas, 123 apresentaram características típicas de bactérias propiônicas., sendo as demais descartadas. Essas cepas, foram então purificadas em agar lactato e submetidas a um “strick”, sendo que 56 cepas apresentaram crescimento. Finalmente essas cepas foram submetidas ao meio Pal-Propionbac sendo que apenas 6 apresentaram comportamento típico de *Propionibacterium*. Paralelamente a esse isolamento, uma amostra de queijo foi inoculada diretamente no meio Pal-Propionbac, de onde foram isoladas 6 colônias típicas de *Propionibacterium*, indicando que essa técnica além de menos trabalhosa é bem mais eficiente. Para comprovar a produção de gás pelas cepas isoladas, as mesmas foram

*Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu. Membros da banca: Eliana Pinheiro de Carvalho e Otacílio Lopes Vargas.

utilizadas individualmente na fabricação de queijos, sendo que todas foram capazes de produzir uma grande quantidade de olhaduras, indicando que as mesmas possuem potencialidades industriais.

ABSTRACT

Isolation of gas-producing bacteria naturally occurring in regions of Minas Gerais.

With the objective of isolating CO₂-producing bacteria naturally occurring in milk from the “Sul, Campos das Vertentes and Zona da Mata” in the state of Minas Gerais, cheese samples were collected from those plants where cheeses presented eyes, even when type “O” starter culture were utilized. Samples were collected from eight selected plants: three in “Zona da Mata”, two in the South of Minas and three in the “Campos das Vertentes”. These samples were subjected to isolation procedures. In the isolation process both the ágar lactate supplemented with cloxacilin and the Pal-Propiobac media were utilized. Initially, 145 strains were isolated from eight sources of the cheese, 58 from “Zona da Mata”, 32 from the south and 55 from “Campos das Vertentes” regions. Among these 145 strains, 123 presented typical characteristics of *Propionibacterium*; and the rest were discarded. The useful strains were purified in ágar lactate and submitted to a streak plate method; 56 of the strains were able to develop in the cloxacilin medium. Finally, these strains were submitted to the Pal-Propiobac medium in which only six strains displayed typical behavior of *Propionibacterium*. In parallel the cheese samples were inoculated directly in the Pal-Propiobac, from which six typical colonies of *Propionibacterium* were isolated, indicating that this technique was much more efficient, besides being a less work consuming method. To confirm the gas production by the isolated strains, these strains were utilized individually in cheese manufacturing and all of them were able to produce a great amount of eyes in the cheeses, indicating that they are industrially potential.

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um produto fresco ou maturado em diversos graus, preparado a partir da coagulação enzimática da caseína do leite. A preparação dos diferentes tipos é muito variada, havendo etapas comuns e aplicações especiais (tempo de maturação e microrganismos inoculados), que dependem do tipo de queijo que se quer produzir.

A produção industrial de queijos no Brasil teve início no final do século, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses e holandeses em Minas Gerais. A fabricação caseira porém, é mais antiga.

Os queijos Pratos, Mussarela e Minas ocupam os primeiros lugares na produção nacional. Os queijos finos, como Gorgonzola, Suíço, do Reino e Provolone representavam uma menor fatia no mercado brasileiro; entretanto quase todas as variedades têm tido sua produção aumentada a cada ano. Sob a denominação Suíço, incluem-se principalmente as variedades Emmental e Gruyère, fabricadas predominantemente na região do sul de Minas Gerais (Furtado, 1991).

No Brasil, sob a denominação genérica de queijo tipo Suíço, fabrica-se um queijo duro ou semi duro com olhaduras de número e tamanho variados. Não há ainda padronização dos queijos que se abrigam sob esta denominação e que são muitas vezes feitos sem adição de culturas propiônicas, em regiões favorecidas por sua presença natural nas pastagens e no leite. Há ainda queijos feitos com massa cozida (50°C) e outros com massa semi cozida (42-44°C), o que

leva a produtos com textura e consistência variadas. Há uma mistura de Gruyère (queijo de aproximadamente 45kg, com olhaduras menores e menos numerosas, sabor mais forte e casca mais escura e enrugada) com o Emmental (queijo de mais de 80kg, com olhaduras maiores e numerosas, casca amarelada e sabor mais suave, adocicado), queijos estes de origem Suíça.

Esses queijos têm como característica comum a presença de grandes olhaduras, bem formadas e brilhantes, produzidas pela fermentação do lactato por bactérias denominadas comumente de bactérias propiônicas.

∨ As estirpes de maior importância industrial da flora propiônica e relacionada com a fabricação dos queijos tipo Suíço pertencem a espécie *Propionibacterium freundenreichii* (subespécies *shermanii* e *freundenreichii*) segundo Lourenço Neto (1984). As bactérias propiônicas transformam o lactato produzido pelas bactérias do ácido láctico envolvidas no processo de produção dos queijos (*Lactobacillus* sp, *Lactococcus* sp e *Streptococcus* sp) principalmente em propionato, acetato e CO₂. Estes produtos metabólicos, aliados à outros resultantes de sua atividade proteolítica e biossintética, como por exemplo a prolina, são responsáveis pelas modificações físico-químicas e pelo flavor característico apresentado pelos queijos que envolvem esse tipo de fermentação.

No Brasil não há produção de culturas propiônicas, essas são importadas e muitas vezes não apresentam boa adaptação nos queijos (queijo “cego”, sem sabor). As causas desses problemas não estão completamente elucidadas, podendo estar relacionadas ao processo de fabricação do queijo, sua composição e talvez a própria cultura. Entretanto, em certas regiões de Minas Gerais (Barbacena, Carrancas, Caxambu, Lima Duarte, São Vicente, etc) os queijos apresentam olhaduras mesmo sem adição de fermentos produtores de gás; estas características nos queijos podem ser consequência da presença de culturas naturais encontradas no solo,

pastagens, silagens e trato intestinal dos animais, que por diversas vias contaminam o leite. Segundo Furtado (1993) algumas dessas cepas sobrevivem à pasteurização do leite nas usinas e encontram ambiente favorável ao seu crescimento; isto é explicado por já estarem adaptadas ao leite e ao ambiente dessas regiões. Fermentando lactato, glicose, glicerol ou certos aminoácidos, essas cepas proporcionam o aparecimento de olhaduras e aroma típicos de queijos Suíços (Ferreira, 1987; Furtado, 1991).

A importância do isolamento dessas culturas naturais, para a indústria proporcionaria um grande benefício econômico, podendo assim evitar a importação das culturas já existentes no mercado, ou mesmo ter uma opção que melhor se adapte a situação. ↓ Assim sendo, esse trabalho tem como objetivo isolar bactérias propiônicas naturais para sua utilização na fabricação de queijos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Números de fabricações de queijos no Brasil

De acordo com os dados da ABIQ- Associação Brasileira de Indústrias de Queijo e do Ministério da Agricultura, citados por Furtado (1992), em 1975 a produção de leite foi cerca de 8 bilhões de litros e a produção de queijos foi aproximadamente 97.000 toneladas. Em 1985, dez anos depois, a produção de leite aumentou cerca de 52% e a de queijos 75%. Dos 14 bilhões de leite produzidos em 1980, 25% foram destinados à fabricação de queijos. Neste mesmo ano, a produção de queijos, em estabelecimentos inspecionados pelo SIF (Serviço de Inspeção Federal), foi de 350.000 toneladas, tendo os queijos Prato e similares, Mussarela e Minas Frescal representado 26, 24 e 13% do total, respectivamente.

Os maiores produtores de queijos no país são os estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná. O setor se expandiu consideravelmente nos últimos anos e muitos tipos novos de queijos foram introduzidos no mercado. Porém, devido à baixa renda da maioria da população brasileira o consumo “*per capita*” anual está em torno de 2,5 Kg, inferior ao da Argentina que é de 8,0 Kg.

2.2. Queijos tipo Suíço

2.2.1. Histórico: Emmenthal e Gruyère

Os queijos Emmenthal e Gruyère têm sido preparados desde o século XV a partir do leite produzido por vacas que pastavam nos Alpes e nas Montanhas Jura.

As características a respeito do peso e qualidade durante meses a um ano ou mais, representam uma adaptação da técnica de produção de queijos às condições presentes há muito tempo nas regiões montanhosas. As poucas estradas existentes naquela época e o frio rigoroso dificultavam o transporte. Além disso, as cooperativas pequenas com vinte a trinta camponeses em uma vila favoreciam a produção deste tipo de queijo com a quantidade de leite disponível.

Embora o transporte e as estruturas sociais tenham mudado, os queijos Emmenthal e Gruyère são feitos nessas regiões basicamente da mesma maneira que no passado. Os fazendeiros nos Alpes ainda entregam o leite diretamente na fábrica de queijo situada na vila próxima às fazendas, imediatamente após cada ordenha. Esse leite fresco e uma boa qualidade bacteriológica são considerados pré-requisitos essenciais para uma boa qualidade do queijo. Outro fator importante na qualidade desses queijos é o período relativamente longo de maturação a que são normalmente submetidos na região alpina (Mocquot, 1979).

O uso de silagem na alimentação de vacas leiteiras envolve o risco de contaminação do leite principalmente por *Clostridium tyrobutyricum*, proporcionando uma fermentação butírica que se inicia um ou dois meses depois da fabricação do queijo, causando o aparecimento de olhaduras irregulares ou verdadeiros buracos de aspecto anormal e um inaceitável sabor rancido. Devido a isto a utilização de silagem nas fazendas é proibida na maior parte dos Alpes.

Dentre os queijos denominados tipo suíço, o Emmenthal é provavelmente o mais conhecido, mais fino e o melhor queijo de massa dura. A partir da coagulação predominantemente enzimática do leite, produz-se um queijo de massa cozida, prensada e maturada. O produto contém no mínimo 45% de gordura no extrato seco e no mínimo 40% de umidade quando maturado. De forma redonda, possui dimensões variadas, com peso de 50 a 130 Kg, diâmetro de 70 a 100 cm e altura de 12 a 30 cm. Pode apresentar diversas olhaduras arredondadas, lisas, brilhantes, distribuídas em todo o queijo, com diâmetro de 1 a 4 cm. Sua

casca é seca e dura, de coloração amarelada ou ligeiramente amarronzada. De sabor suave, ligeiramente adocicado, torna-se mais aromático com a maturação (Sherman, 1921; Mocquot, 1979; Lourenço Neto, 1982; Furtado, 1991).

O Gruyère, também originário da Suíça, possui dimensões diferentes das do Emmenthal, com peso de 20 a 50 Kg, diâmetro entre 40 e 65 cm e altura de 9 a 13 cm. Apresenta olhaduras menores, 0,5 a 1,5 cm de diâmetro, e os mesmos teores de umidade e gordura no extrato seco. Possui uma casca levemente mais escura e menos lisa devido ao tratamento com bactérias proteolíticas (principalmente *Brevibacterium linens*) durante a cura, o que possibilita cor e textura diferentes à casca e um sabor mais pronunciado ao queijo (Furtado, 1991).

Hoje as variedades tipo Suíço são produzidas em muitos países por métodos diferentes do Suíço tradicional. Verificar se as características e a qualidade do produto estão sendo mantidas não é tarefa fácil, apesar da existência de padrões nacionais e internacionais. Como orientação, o que se faz é verificar se a duração do período de maturação, sua temperatura e a composição do queijo (umidade e conteúdo de gordura) são os mesmos do tradicional. Assim, há uma razoável probabilidade do queijo ter uma qualidade similar, embora não necessariamente idêntica, principalmente quanto ao sabor. Mudanças mais ou menos súbitas na umidade e no conteúdo de gordura podem modificar claramente a qualidade do queijo (Mocquot, 1979).

2.2.2. Definição no Brasil

No Brasil são produzidos queijo duro e semi-duro, com olhaduras de número e tamanho variados, denominados genericamente de queijos do tipo Suíço. Não há padrões para os queijos incluídos nesta denominação e, muitas vezes, estes são fabricados sem a adição de culturas propiônicas, em regiões favorecidas pela presença da bactéria no ambiente e no leite.

Em geral o queijo produzido apresenta características mistas de Emmenthal e Gruyère, mas possui um sabor mais aproximado ao do Emmenthal. Isto porque a casca não é tratada com culturas. O queijo é geralmente pequeno, com peso variando entre 20 a 30 kg. O rendimento médio esperado na produção é da ordem de 10,5 a 11,5 litros de leite por kg para massa cozida. A composição média esperada no queijo fresco é 39 a 41% de umidade, 26 a 28% de gordura, 0,6 a 0,8% de sal e pH variando entre 5,25 e 5,35.

Na França e na Suíça é comum a utilização de leite cru para fabricação de Emmenthal e Gruyère a partir da flora natural do leite. No Brasil, o leite é pasteurizado com inoculação de culturas termofílicas e bactérias propiônicas.

Devido à qualidade bacteriológica do leite utilizado para fabricação do queijo não ser tão boa, a maior parte do queijo tipo Emmenthal brasileiro é de baixa qualidade, possuindo uma textura irregular e um sabor atípico (Furtado, 1993).

2.3. O leite para fabricação do Emmenthal

Por muitos anos já se reconhece que a fabricação de queijo de alta qualidade requer leite de alta qualidade, produzido com o máximo de cuidado com flora e composição próprias. Na fabricação do Emmenthal não é diferente. Portanto, faz-se necessária a assistência ao produtor de leite com técnicas que proporcionem a manutenção dos animais em perfeitas condições de saúde, principalmente com respeito à higidez de glândulas mamárias.

Uma alimentação adequada e cuidados racionais durante a ordenha evitam possíveis contaminações por microrganismos indesejáveis a fermentação do queijo, tais como os clostrídios (Lourenço Neto, 1982; Mocquot, 1979). De acordo com Bergere et al. (1972), citado por Lourenço Neto (1982), pesquisadores franceses constataram que a contaminação do leite com

clostrídios não deve ser superior a 200 esporos por litro, para que se tenha uma perda de apenas 10% dos queijos por estufamento butírico. Uma contaminação igual a 1000 esporos por litro provoca estufamento butírico em 70% dos queijos fabricados.

O regulamento Suíço para entrega de leite trata de todos os aspectos práticos da produção de leite e seu processamento, começando pelo uso de fertilizantes e produção de forragem, indo até a saúde do gado, higiene na ordenha e teste do leite. O teste de redutase tem sido usado por décadas para avaliar a qualidade do leite para o queijo Emmenthal. A presença de resíduos de antibióticos também deve ser verificada, pois são substâncias inibitórias. O sucesso da fabricação do queijo Emmenthal depende principalmente do nível de contaminação inicial do leite com esporulados butíricos, que através de estímulos das indústrias aos produtores de leite no uso diário de padrões sanitários de produção, poderá ser diminuída ou evitada (Mocquot, 1979; Lourenço Neto, 1982).

É necessário que as regras de produção de leite sejam aplicadas por todos os produtores, para que faltas cometidas por um só produtor não comprometam gravemente o trabalho dos demais.

2.4. Bactérias propiônicas

Os efeitos benéficos de bactérias lácticas nas desordens gastrointestinais são conhecidos assim como seu uso como probiótico para alimentação humana e animal (Kim e Gilliland, 1983; Klaenhammer, 1982; Speck, 1981; Kyriakis, 1983). A importância da manutenção de uma microbiota balanceada é enfatizada por Coates (1975), existindo evidência de que a ingestão de certos micorganismos é efetiva na manutenção deste balanceamento (Rettger e Cheplin, 1921; Portis e Albuns, 1931; Fernandes, Shanani e Amer, 1988).

Entre os microrganismos indicadores para exercer esta função são citados o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* e mais recentemente a literatura tem enfatizado a presença de *Propionibacterium* (Conway, Gorbach e Goldin, 1987; Mantere-Alhonen e Makinen, 1987).

O efeito benéfico advindo da ingestão destes microrganismos é conhecido, mas os mecanismos de ação estão completamente elucidados. No caso de lactobacilos e bactérias bífidas um resultado positivo pode ser devido à capacidade destes microrganismos de produzir antibióticos, ácidos orgânicos, antagonismo competitivo, abaixamento de pH e do potencial de oxi-redução estabelecido pela presença destes ácidos. Além disso, tem capacidade de desconjugar sais biliares, produzir enzimas e suprir carcinógenos (Gilliand e Speck, 1977; Sandine, 1979; Goldin et al. 1980; Ayebo, Angelo e Shahani, 1980). Um grande número destas características também se aplica às bactérias propiônicas de origem láctea.

A capacidade de bactérias propiônicas sintetizarem vitaminas B₁₂ a partir de CO₂ constitui um meio de enriquecimento biológico de produtos lácteos fermentados como os que contêm *Lactobacillus acidophilus*.

As primeiras investigações sistemáticas sobre os microrganismos responsáveis pela formação de olhaduras em queijos foram realizadas por Von Freudenreich e Orla-Jensen em 1906, embora trabalhos anteriores realizados por (Fritz, 1878/1879) citado por (Von Freudenreich e Orla-Jensen, 1906) demonstraram que alguns microrganismos isolados de queijos eram capazes de fermentar o lactato com a produção de ácido acético e ácido propiônico com a liberação de dióxido de carbono durante o processo.

Devido à característica desses microrganismos de produzirem grande quantidade de ácido propiônico durante a fermentação acima citada, (Orla-Jensen, 1909) sugeriu o "Taxon" *Propionibacterium*, nome esse que permanece até os dias atuais.

2.4.1. Classificação

Segundo Carvalho (1994), a classificação do gênero *Propionibacterium* foi descrito da seguinte forma:

TABELA 1. Evolução do gênero *Propionibacterium*, descrita por diferentes autores, no Bergey's Manual (extraído de Carvalho, 1994)

"Bergey's Manual" 1930 (1)	"Bergey's Manual" 1934 (2)	"Bergey's Manual" 1939, 1948 et 1957 (3,4,5)	"Bergey's Manual" 1974 (6)	"Bergey's Manual" 1986 (7)
<i>P. Freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> subsp. <i>globosum</i>	<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>
" <i>P.Shermanii</i> "	" <i>P.shermanii</i> "	" <i>P.shermanii</i> "	-	-
<i>P. Thönii</i> " <i>P. rubrum</i> "	<i>P. thönii</i> " <i>P. rubrum</i> "	<i>P. thoenii</i> " <i>P. rubrum</i> "	<i>P. thoenii</i> "	<i>P. thoenii</i> "
<i>P. Jensenii</i> " <i>P. Jensenii</i> var. <i>raffinosaecum</i> " <i>P. technicum</i> " <i>P.Peterssonii</i> "	<i>P. jensenii</i> " <i>P. raffinosaecum</i> " " <i>P. technicum</i> " " <i>P. peterssonii</i> "	<i>P. jensenii</i> " <i>P. raffinosaecum</i> " " <i>P. technicum</i> " " <i>P. peterssonii</i> " " <i>P. zeae</i> "	<i>P. jensenii</i> - - - -	<i>P. jensenii</i> - - - -
" <i>P. pentosaecum</i> "	" <i>P. pentosaecum</i> "	" <i>P. pentosaecum</i> " " <i>P. arabinosum</i> "	<i>P. acidi-propionici</i> "	<i>P. acidi-propionici</i> "
			<i>P. acnes</i>	<i>P. acnes</i>
			<i>P. avidum</i>	<i>P. avidum</i>
			<i>P.lymphophilum</i>	<i>P.lymphophilum</i>
			<i>P. granulosum</i>	<i>P. granulosum</i>

1- Bergey, D.H., 1930. Bergey's manual of determinative bacteriology. 3rd ed.

2- Bergey, D.H., 1934. Bergey's manual of determinative bacteriology. 4th ed.

3- Bergey, D.H.; Breed, R.S.; Murray, E.G.D.; Hitchens, A.P. 1939. Bergey's manual of determinative bacteriology. 5th ed.

4- Bergey, D.H.; Breed, R.S.; Murray, E.G.D.; Hitchens, A.P. 1948. Bergey's manual of determinative bacteriology. 6th ed.

5- van Niel, C.B., 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed.

6- Moore, W.E.C.; Holdeman, L.V., 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed.

7- Cummins, C.S.; Johnson, J.L., 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. 1st ed.

Em 1906 Von Freudenreich e Orla-Jensen trabalhando em um experimento conseguiram isolar cinco espécies de bactérias do queijo Emmenthal e Limburger (*Bacterium acidi-propionici*-a (*Propionibacterium Freudenreichii*), *Bacterium acidi-propionici*-b (*Propionibacterium Jensenii*), *Bacterium acid-propionici*-c (*Propionibacterium Peterssonii*), *Bacterium acidi-*

propionici-d (Propionibacterium shermanii) e *Bacillus acidi-propionici (Propionibacterium pentosaceum)* dos queijos Emmenthal e Limburger.

As bactérias propiônicas foram isoladas em outros queijos, mas somente em queijos tipo Suíço foram encontradas em maiores proporções. As *Propionibacterium* já foram isoladas do leite, solo e silagem por Hitchner e têm sido encontradas em salivas e fezes de vaca e de porco. Embora o gênero *Propionibacterium* tenha sido proposto por (Orla-Jensen, 1909), somente em 1930, depois do trabalho clássico de Van Neil - 'The Propionic Acid Bacteria' - publicado em 1928, essas bactérias foram aceitas como um gênero da família *Lactobacilaceae*; entretanto não existem trabalhos sobre sua origem definitiva. Nos dias de hoje o grande grupo é descrito como Actinomicetes; é mais correto considerar a família como *Propionibacteriaceae*, visto que várias espécies patogênicas de interesse odontológico apresentam características próximas.

Além de serem componentes de produtos lácteos, as bactérias propiônicas de interesse industrial são encontradas em outros habitats como a saliva, solo, pastagens e silagens (Cummins e Jonhson, 1991). Algumas estirpes pertencentes a este gênero são também responsáveis por defeitos em queijos tipo Gouda (Britz e Jordaan, 1976) e Mussarela (Champagne e Lange, 1990). Estirpes pigmentadas podem ser isoladas de queijos tipo Suíço que apresentam defeitos conhecidos como "red-spotting" (Baer e Ryba, 1992). Bactérias propiônicas são também isoladas em indústrias de azeitonas, onde causam problemas na fermentação (Vaughn, 1981).

Estudos posteriores mostraram que, por algumas espécies estarem fortemente relacionadas com : *P. shermanii*, *P. freudenreichii* e *P. jensenii*, seria necessária uma reavaliação do gênero *Propionibacterium* e uma redução do número de espécies (Langsrud e Reinbold, 1973b).

De acordo com "Approved List of Bacterial Names" (More e More, 1989) citada por (Carvalho, 1994) as bactérias propiônicas do leite comportam atualmente quatro espécies, dentre onze descritas na 7ª edição do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Van Niel, 1957)

(tabela 1): *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* e subsp. *shermanii*; *P. jensenii*; *P. thoenii* e *P. acidipropionici*. Elas se distinguem por seus perfis de fermentação, assim como por suas características morfológicas e fisiológicas (Cummins e Johnson, 1986). As estas quatro espécies clássicas foram associadas *Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* e *P. lymphophilum*, que têm como habitat a saliva, a pele humana e de animais.

2.4.2. Características gerais

As bactérias propiônicas têm por muito tempo desempenhado um importante papel na formação de olhaduras e desenvolvimento de “flavor” de queijos tipo Suíço. Segundo Carvalho (1994), o aroma dos queijos é devido a um equilíbrio entre diferentes compostos. A contribuição do ácido propiônico e do ácido acético oriundos da fermentação propiônica a este equilíbrio aromático foi demonstrada.

As bactérias propiônicas também participam na produção de diacetil no queijo. Algumas estirpes são capazes de produzir grande quantidade de compostos sulfurosos como o sulfato de metil (Dykstra et al. 1971). Por outro lado a prolina livre intervém no “flavor” dos queijos tipo suíço por seu sabor adocicado. Os teores elevados (134 a 253mg/100g) no queijo Emmenthal segundo Langsrud e Reinbold (1973a) são consequência da degradação das proteínas. As bactérias propiônicas devido ao potencial enzimático em enzimas agindo sobre os peptídeos contendo prolina (Sahlstrom et al. 1989; Panon, 1990), estão envolvidas na produção destes ácidos aminados.

Originalmente presentes nos queijos, elas se desenvolvem em câmara de maturação com temperaturas elevadas de 18 a 22°C, atingindo uma população de 10^9 UFC/g de queijo. O desenvolvimento desses microrganismos podem entretanto resultar em defeitos em certas variedades de queijos onde a fermentação propiônica é indesejável (Thierry e Madec, 1995).

Há muito tempo um melhor conhecimento de bactérias propiônicas em leite e o seu desenvolvimento em queijos tem sido enfatizado por diversos pesquisadores na área de queijos, porém na área de leite existem poucos dados relativos à flora propiônica.

A maioria das bactérias propiônicas são resistentes ao tratamento térmico do leite e ao aquecimento da massa no tanque de fabricação. As estirpes de *Propionibacterium* presentes no leite, ou adicionadas no momento da fabricação do queijo, podem participar da maturação destes queijos. O crescimento destas se dá preferencialmente durante o período da maturação em câmara de incubação. Por outro lado, com a capacidade de se multiplicar a temperaturas de 2,8 e 7,2°C (Park et al. 1967), uma fermentação propiônica pode acontecer durante uma estocagem longa a baixas temperaturas, não havendo necessidade de maturação em temperaturas superiores a 22°C.

A taxonomia do gênero evoluiu desde 1928 quando Van Niel publicou “The propionic acid bacteria” classificando, pela primeira vez, as espécies segundo a nomenclatura binária.

A principal dificuldade encontrada na identificação das estirpes, se deve à grande variação de seus perfis fermentativos. As bactérias propiônicas apresentam também uma variação em relação as condições do meio, temperatura e tensão de oxigênio, dificultando ainda a sua identificação.

A fermentação do lactato e carboidrato residuais pelas bactérias propiônicas, que ocorre subsequente à fermentação láctica constitui-se no estágio vital da maturação do queijo (Chapman e Sharpe, 1981). Esta fermentação a propionato envolve um complexo ciclo duplo, via piruvato, quantidades catalíticas de metil-malonil-CoA e uma reação de transcarboxilação dependente da biotina. Este complexo de reações resulta em CO₂, ácido propiônico e ácido acético, que responderão por muitas das características do queijo. A produção de ácidos graxos não voláteis pelas propiônicas pode contribuir para o perfil sensorial do queijo (Law, 1982).

Segundo Cummins e Johnson (1991) elas são quimiorganotróficas, anaeróbias facultativas, Gram positivas, sob condições normais não esporulam, são imóveis, catalase positivas e produzem ácido propiônico como principal produto do metabolismo de carboidratos. A parede celular da espécie *P. freudenreichii* é constituída de ácido meso-diaminopimérico e das outras espécies de ácido L- diaminopimérico.

A morfologia é variável, de formas arredondadas, bastonetes mais ou menos alongados, de 0,5 a 0,8 μ m de comprimento. As colônias são geralmente circulares, convexas, semiopacas, de cor branca, creme, cinza, laranja e vermelha (Carvalho, 1994).

As bactérias propiônicas são imóveis, pleomórficas (muitas vezes sob a forma de pequenos bastões ovóides), se mostram isoladas, em pares, por cadeias ou aglomeradas em “escrita chinesa”. Elas são anaeróbicas até aerotolerantes, formando colônias redondas com coloração variando entre o branco, creme, amarelo-laranja e o vermelho.

O nome *Propionibacterium* foi sugerido por Orla-Jensen (1909) para bactérias presentes em queijos tipo Suíço de massa prensada e cozida, pela elevada produção de ácido propiônico durante o crescimento.

Segundo a classificação da 9ª edição do ‘Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’ (Holt et al. 1994), as bactérias propiônicas se dividem em dois grupos segundo o nicho ecológico: a) Bactérias propiônicas ligadas à pele e implicadas na patologia do acne; b) Bactérias propiônicas clássicas, conhecidas como de interesse industrial, principalmente na indústria de laticínios; c) Bactérias propiônicas de interesse odontológico. As bactérias propiônicas clássicas são hoje estudadas pelo seu papel na maturação dos queijos de massa prensada e cozida, tipo Suíço, sendo responsáveis pela textura típica apresentando olhaduras abundantes, lisas e regulares. Nos queijos as bactérias propiônicas produzem entre outros metabólitos os ácidos propiônico e acético, liberam prolina, CO₂ que contribuem para o “flavor” e para a formação das

olhaduras características. Outra importância industrial é a produção do ácido propiônico, metabólito antifúngico principalmente empregado na indústria de panificação e em silagens.

Entre as outras capacidades biossintéticas das propiônicas estão a produção de vitaminas B₁₂, bacteriocinas, pentoses, polissacarídeos e fermentação de certos vegetais. As bactérias propiônicas são também utilizadas como probióticas e têm atividade anticarcinogênicas comprovadas.

As linhagens classificadas originalmente neste gênero derivaram de queijos e outros produtos lácteos. As bactérias propiônicas formam um grupo importante não somente para indústria de alimentos mas também como membros da população bacteriana da pele humana e de animais, onde podem ser responsáveis por doenças. Johnson e Cummins (1972) demonstraram que certas linhagens de microrganismos corineiformes anaeróbicos, isolados da pele humana, tinham diversos pontos em comum com as linhagens isoladas na indústria de laticínios.

Algumas cepas são termoresistentes, mas a maioria parece ser destruída pela pasteurização. Um estudo da ação da temperatura sobre as dezessete espécies de bactérias propiônicas, realizado no Laboratoire de Recherches de Technologie Laitière, constatou que a 76°C durante 20 segundos nenhuma das espécies estudadas sobreviveu (tabela 2). A temperatura ótima de desenvolvimento está em torno de 30°C (com mínima de 15°C e máxima de 45°C). Algumas cepas podem se desenvolver a temperaturas por volta de 7°C.

TABELA 2- Ação da temperatura sobre 17 espécies de bactérias propiônicas.

Temperatura	tempo de aplicação	número de espécies sobreviventes
66°C	20"	17
68°C	20"	15
70°C	20"	12
72°C	20"	06
74°C	20"	02
76°C	20"	00

Os requerimentos nutricionais são complexos e elas crescem melhor em meio contendo extrato de levedura, triptona como fonte de nitrogênio, lactato ou um carboidrato simples como fonte de energia. Elas utilizam ácido láctico, carboidratos e polihidroxiálcoois a ácidos propiônico e acético e dióxido de carbono (CO₂) (Langsrud e Reinbold, 1973a).

Os metais têm ação sobre o desenvolvimento e a vida das bactérias propiônicas: o ferro estimula sua produção de CO₂; o manganês e o magnésio contribuem na fermentação propiônica; o cobalto favorece sua atividade enzimática e o cobre a certa concentração é um inibidor.

As bactérias são bastante sensíveis a concentrações elevadas de sal. Normalmente o teor de sal no queijo Emmenthal varia de 0,4 a 0,8%. Verifica-se que o efeito inibidor do sal é mais forte em pH mais baixo; em pH 7,0, uma concentração de sal de 6,0% na umidade não teria conseqüências sobre a flora propiônica. Valores da atividade de água (Aw) inferiores a 0,955 podem causar sua inibição.

A concentração de ácido no queijo também contribui na mudança de comportamento dessas bactérias e, pequenas variações no pH interferem no seu crescimento. O desenvolvimento ótimo ocorre quando o pH do meio varia de 6,5 a 7,0. O crescimento cessa a pH 5,0 e abaixo deste as bactérias morrem. No Emmenthal o pH no início da maturação fica em torno de 5,2, elevando-se para 5,4 até o final; o aparecimento de olhaduras ocorre gradualmente com pH 5,2 a 5,5.

O desenvolvimento da flora propiônica pode ser interferido com a adição de nitratos ao leite para prevenção de estufamento tardio. Acima de 7,0 gramas de nitrato por 100 litros de leite observa-se um efeito negativo na formação de olhaduras.

A presença de 0,1 UI de penicilina no leite já é capaz de inibir completamente o crescimento de *P. shermanii* (Furtado, 1991).

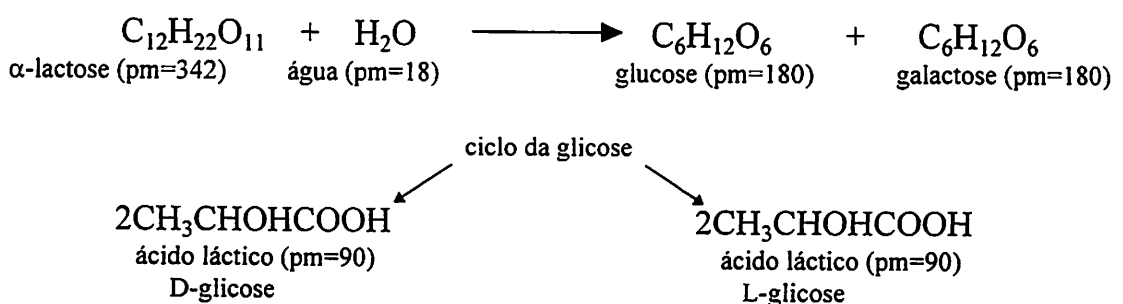
2.5. Fermentação propiônica

Durante a fabricação do queijo Emmenthal as bactérias propiônicas desempenham a função de produzir o sabor típico do queijo e o gás carbônico responsável pelas olhaduras. A fermentação pode se dar sobre a glucose, glicerol e certos aminoácidos, mas ocorre principalmente sobre o lactato. Desta fermentação formam-se principalmente os ácidos propiônico e acético e o CO₂. O sabor suave, adocicado, típico do queijo Emmenthal está associado com os ácidos propiônico e acético e diversos aminoácidos, destacando-se a hidróxiprolina e a prolina. Estudos demonstraram que teores mínimos de prolina e ácido propiônico da ordem de 2,0 e 5,0 mg/Kg, respectivamente, eram necessários para conferir ao queijo seu sabor típico (Furtado, 1991).

A fermentação propiônica é um processo complexo, envolvendo diversos fatores e fenômenos. Para que estes sejam apresentados, pode-se tomar como exemplo a fabricação de um queijo de 100 Kg com cerca de 1000 litros que tem 4,6% de lactose (46 Kg). Após a coagulação, corte e fabricação propriamente dita, tem-se 100 Kg de massa e 900 litros de soro. No final do processo, 3% da lactose fica no queijo e 97% se perde no soro, ou seja, dos 46 Kg anteriores, 1,38 Kg passa para o queijo (isto é, o queijo conterà 1,38% de lactose) (Furtado, 1991).

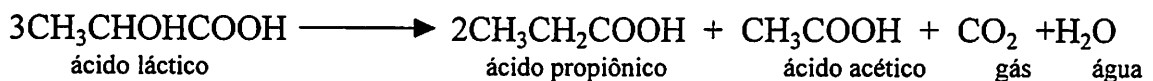
Logo nos dois a três primeiros dias de fabricação, toda a lactose é convertida pelas bactérias lácticas, por hidrólise em glucose e galactose e depois em ácido láctico. Conclui-se que cada molécula de lactose é convertida em quatro moléculas de ácido láctico (esquema da conversão da lactose a ácido láctico).

Esquema da conversão da lactose a ácido láctico.



A fermentação pode resultar tanto em ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) como em seu sal lactato de cálcio ($(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca}$) (esquema da fermentação do ácido láctico). Pelo balanço da fermentação observa-se que três unidades de ácido láctico com 270 g fornecem duas unidades de ácido propiônico com 148 g, uma unidade de ácido acético com 60 g, uma unidade de gás carbônico com 44 g e uma de água com 18 g, onde uma unidade equivale a um mol e um mol de CO_2 equivale a 22,4 litros (Furtado, 1991; Furtado, 1993).

Esquema da fermentação do ácido láctico.



2.6. Formação de olhaduras

A formação de olhaduras inicia-se quando o queijo apresenta de 20 a 40 dias de maturação e ocorre a uma temperatura de 18 a 22°C. São mais acentuadas no centro do queijo, onde o teor de sal na umidade do queijo é menor; com isso, durante a maturação do queijo Emmenthal o teor de lactato é menor no centro do que na periferia (Furtado, 1991).

A teoria de Clark citada por Furtado (1993) explica que as olhaduras se formam devido: à produção de CO_2 ; ao impedimento da casca na saída de gás; ao enriquecimento da massa em CO_2 (o gás formado vai se dissolvendo gradativamente na água do queijo formando ácido carbônico- H_2CO_3); à saturação de CO_2 na umidade (microolhaduras); à supersaturação e aumento de pressão e à distensão da massa sob a pressão do gás (formação da olhadura propriamente dita). Estima-se que em um Emmenthal de 80 Kg maturado por 4 a 5 meses forma-se 180 litros de CO_2 perdendo-se cerca de 80 litros no ar. Se o queijo é maturado em uma câmara cheia, a atmosfera tende a estar saturada com gás carbônico e os queijos apresentarão olhaduras

maiores e mais numerosas. Mas se o queijo está isolado na câmara, tenderá a ter menos olhaduras e de menor diâmetro.

O tamanho e a forma da olhadura vão depender basicamente da tensão na superfície do queijo (espessura e flexibilidade da casca) e elasticidade da massa. Esta está relacionada com o grau de mineralização (teor de cálcio) e índice de maturação (solubilização parcial da caseína). Não havendo condições mínimas de elasticidade, no lugar de olhadura, forma-se uma trinca. A elasticidade adequada se forma pela ação proteolítica da cultura láctica nas primeiras semanas de cura a frio, desde que o queijo apresente-se corretamente mineralizado (Furtado, 1993).

Observa-se que à medida que se aumenta a temperatura de maturação do queijo, há uma diminuição da capacidade de absorção do gás CO₂ na umidade, por exemplo, abaixando-se a temperatura de 25 para 10°C, a capacidade de absorção de gases na água é aumentada em cerca de 57%. Isto indica, que além dos fatos citados, a temperatura da câmara e o tempo de permanência nela também influenciam o tamanho e o número de olhaduras (Furtado, 1991). Uma observação interessante é quando se aquece a câmara de maturação em temperaturas acima de 22°C, a solubilidade de ácido carbônico diminui, a olhadura aumenta excessivamente e quando o queijo é resfriado, há um colapso da forma da olhadura.

2.7. Pontos críticos da fermentação propiônica

Alguns pontos são de fundamental importância para o sucesso da fermentação propiônica. São os chamados pontos críticos, que concedem ao queijo uma boa ou má qualidade.

O leite de alta qualidade, sem presença de esporulados anaeróbicos (gênero *Clostridium*) é ponto fundamental para se obter queijos de boa qualidade. Além disso, a cultura propiônica deve estar em plena atividade (mínimo de 10⁶UFC/g) e uma vantagem extra é a presença da flora natural do leite. As bactérias crescem em faixas variadas de temperatura, mas a melhor produção

de gás se dá por volta de 20°C (período de “câmara de incubação”), que é a temperatura recomendada para formação de olhaduras. Temperaturas acima de 22°C podem resultar em um colápsos da forma ideal de olhaduras, após o resfriamento de queijo.

O queijo não pode ser muito ácido, o ideal é que o pH esteja entre 5,2 e 5,3, pois a inibição da flora propiônica ocorre quando o pH está abaixo de 5,1. Não deve ter muito sal, com teores ideais entre 0,6 e 0,8% pois as bactérias propiônicas são muito sensíveis a altos teores de sal e baixa atividade de água ($A_w < 0,99$ começa a inibir o crescimento). Se o pH do queijo é mais elevado elas são mais resistentes ao sal. Além disso, o alto teor de sal pode descaracterizar o sabor levemente adocicado do queijo. O nitrato de sódio é outro inibidor, por isso não deve ser usado no leite.

Quanto à estrutura, é importante o “ponto” da massa e a prensagem adequada. Todos esses fatores devem ser observados com atenção para que seja obtido um queijo de alta qualidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo divididos em etapas principais:

- Isolamento, caracterização, identificação e seleção de bactérias propiônicas;
- Elaboração de queijo prato com as culturas isoladas e selecionadas para verificação de produção de olhaduras.

3.1. Isolamento, caracterização, identificação e seleção de bactérias propiônicas

3.1.1. Coleta e preparo das amostras

As amostras de queijos deste trabalho foram coletadas em oito laticínios das regiões Sul, Campos das Vertentes e Zona da Mata de Minas Gerais (Barbacena, Lavras, Cural Novo, Santos Dumont, Juiz de Fora, São Sebastião da Vitória e Lima Duarte) durante o mês de maio de 1996.

As amostras foram coletadas em suas embalagens originais de comercialização e transportadas sob refrigeração ao laboratório de microbiologia onde ficaram armazenadas na temperatura de 5°C até o dia das análises.



3.1.2. Meios de culturas empregados no isolamento

3.1.2.1. Meio Agar Lactato

Este meio, formulado a fim de propiciar um melhor crescimento do microrganismo do gênero *Propionibacterium*, sendo estes exigentes em lactato e magnésio, foi suplementado com o antibiótico Cloxacilina, para inibir as bactérias do fermento láctico presente no queijo, proporcionando assim um melhor desenvolvimento ao *Propionibacterium*.

A formulação adotada neste trabalho, teve os seguintes constituintes: (I) extrato de levedura, 5 gramas, (II) extrato de carne, 3 gramas, (III) peptona bacteriológica (hidrolisado de caseínas pelo suco-pancreático-total), 5 gramas, (IV) lactato de sódio obtido por reação ácido-básica, 16,8 ml, (V) agar puro, 1,5 gramas, (VI) água mineral magnesiana gaseificada naturalmente. Os constituintes foram dissolvidos de forma usual e após ajuste do pH para $7,0 \pm 0,2$, o meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos.

Em seguida, o meio foi resfriado e suplementado com o antibiótico Cloxacilina previamente esterilizado por filtração ($0,45\mu$), dando uma concentração final de 4g/litro, (Drinan e Cogan, 1992). O meio foi colocado em placas de Petri ($\pm 10\text{ml}$) e levado à estufa a $30^{\circ}\text{C}/24$ horas para secagem. Após a secagem, as placas foram utilizadas para inoculação.

3.1.2.2. Meio Pal Probiobac

Este meio foi usado para isolamento das bactérias suspeitas de pertencerem ao gênero *Propionibacterium* e que foram isoladas em meio contendo o antibiótico seletivo. Este meio é formado de componentes seletivos e um indicador púrpura de bromocresol para diferenciar as bactérias. O crescimento das colônias de células propiônicas mostra a formação de um anel amarelo em seus arredores em função das alterações do potencial de óxido-redução e do

abaixamento do pH em torno de 5,20, geralmente após 6 dias de incubação em anaerobiose à 30°C (Madec et al. 1994).

Neste trabalho foi adotada a formulação básica preparada no laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA; ou seja: (I) peptona bacteriológica (hidrolisado de caseínas pelo suco-pancreático-total), 10 gramas; (II) extrato de levedura, 10 gramas; (III) Lactato de lítio, 10 gramas; (IV) Sulfato de potássio, 0,25 gramas; (V) Sulfato de manganês, 0,05 gramas; (VI) Glicerol, 6 gramas; (VII) Púrpura de bromocresol, 0,05 gramas; (VIII) Agar, 15 gramas e (IX) Água, 1000ml. Os constituintes foram dissolvidos de forma usual e após o ajuste do pH para $7,0 \pm 0,2$ o meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Na hora da inoculação o meio foi aquecido a 48°C, 1 ml de cada cepa (devidamente já diluída) foi colocado em placas de Petri previamente identificadas. O meio pronto para uso (48°C), foi então adicionado às placas (cerca de 10 a 13 ml por placa). As placas foram, a seguir, agitadas suavemente sobre a mesa a fim de se incorporar a cepa ao meio e deixadas em repouso até que a solidificação do meio se completasse. As placas foram incubadas a 30°C em anaerobiose (jarra de Gás Pack) por 6 dias. Após este período a jarra foi aberta e, as placas cujo meio não sofrera mudança de cor (violeta para amarelo) foram novamente incubadas, porém em aerobiose, por mais 48 horas. Isso foi feito para permitir o crescimento de cepas lentas de *Propionibacterium*.

3.1.3. Técnicas usadas durante o isolamento

3.1.3.1. Preparo da cepa comercial

A cultura comercial utilizada neste trabalho que serviu como parâmetro de comparação, foi a PS1 (Chr. Hansen Ind. Com. Ltda.) que é comercializada na forma liofilizada. Para

reativação a mesma foi inoculada em caldo lactato 0,1%; seguido de incubação a 30°C por 3 dias. Após este período o crescimento se concretizava pela turvação do meio de cultivo. A partir desse caldo fizeram-se as diluições seriadas (nove diluições) e o plaqueamento em superfície no meio agar lactato. Essas placas foram incubadas em anaerobiose (30°C/6 dias) e aerobiose (30°C/48 horas) (figura 1).

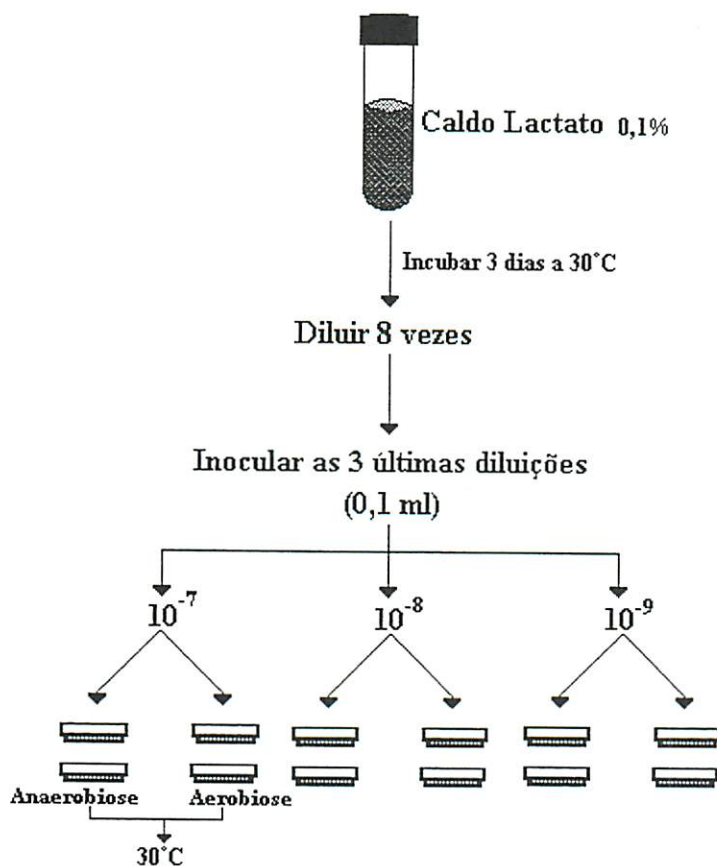


FIGURA 1: Esquema de reativação da cultura comercial.

3.1.3.2. Preparo da Amostra de Queijo e Inoculação

As oito amostras dos queijos (50g) foram homogeneizadas em liquidificador estéril com 450ml de citrato de sódio a 2%. A seguir fez-se mais uma diluição, retirando-se 1ml para um tubo contendo 9ml de água peptonada (diluição 10^{-2}), sendo que destas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) foram

retiradas alíquotas de 0,1ml, que foram inoculadas em agar lactato suplementado com antibiótico seletivo, Cloxacilina. (figura 2).

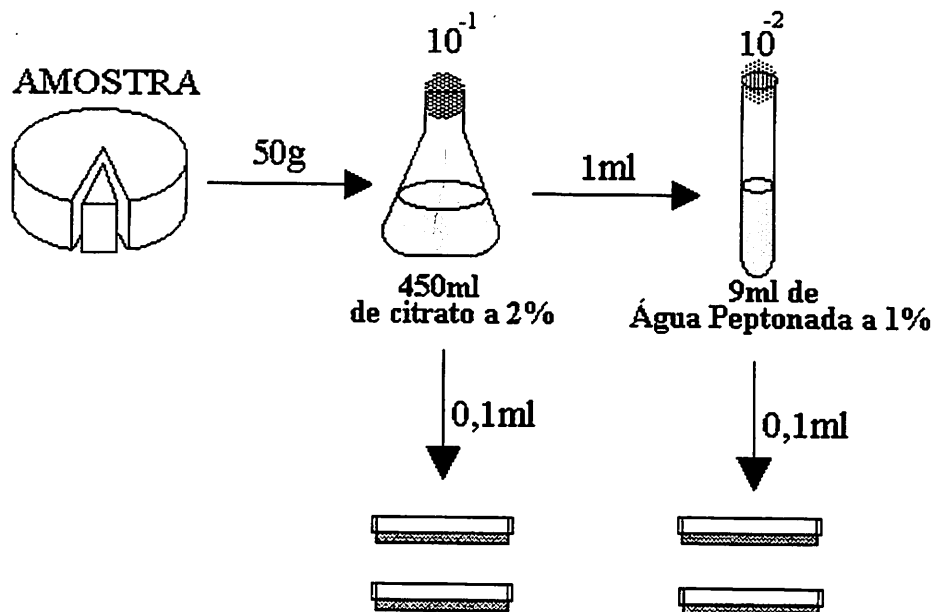


FIGURA 2: Esquema de preparo e plaqueamento das amostras de queijo.

Estas placas foram incubadas a 30°C , em anaerobiose em jarra de Gás Pack por 6 dias, visando o isolamento das bactérias do gênero *Propionibacterium*. Após os seis dias de incubação foram retiradas, com alça de platina, colônias típicas das placas que apresentaram crescimento. Todos os “isolados” foram inoculados em agar lactato inclinado, a 30°C , sem suplementação do antibiótico seletivo (Cloxacilina) em anaerobiose por 6 dias e em aerobiose por 2 dias.

3.1.3.3. Caracterização dos isolados

As culturas selecionadas foram submetidas a coloração de Gram e ao teste de catalase. Foram selecionados os bacilos ou cocos Gram positivos e catalase positivos, tendo sido

descartados os demais. Todas as cepas purificadas foram repicadas em duplicata e acondicionadas sob refrigeração em lactato inclinado com óleo mineral. Um tubo de cada isolado foi utilizado para a continuidade dos testes necessários à caracterização e identificação do mesmo.

3.1.4. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi feita de acordo com informações contidas no Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994. Foram utilizados os testes de catalase e motilidade além de outras provas bioquímicas (Mac Faddin, 1980).

3.1.5. Tratamento térmico dos isolados

Uma característica importante neste gênero é a não formação de esporos. Com o intuito de comprovar se os isolados seriam ou não formadores de esporo, o tratamento térmico foi realizado. Essa técnica visa a coloração de esporos; após um tratamento térmico nas células vegetativas dos isolados, foi tomado o seguinte procedimento: Os isolados foram inoculados em tubos de ensaio contendo caldo lactato, incubados por 24 horas em temperatura de 30°C; passado esse tempo, foram submetidos ao tratamento térmico, ou seja, os tubos de ensaio de cada isolado foi submerso em água quente (80°C) por 5 minutos, após esse tempo os tubos foram retirados da água quente e levados ao resfriamento em água a 25°C para o preparo das lâminas para a realização do método. Após o preparo das lâminas de cada isolado devidamente identificado, os isolados também foram inoculados em agar lactato inclinado para se verificar se houve crescimento após o tratamento térmico (30°C/24h). As lâminas passaram por uma coloração a quente de verde malaquita por 6 minutos (o tempo foi marcado após a formação de vapores, as lâminas foram aquecidas com a chama até se obter a emissão de vapores), após 6 minutos, as

lâminas foram lavadas suavemente em água corrente para se retirar o excesso de corante, em seguida as lâminas passaram por outra coloração, agora com solução aquosa de safranina por 30 segundos, foram novamente lavadas em água corrente para se tirar o excesso de corante, e numa etapa final, as lâminas foram deixadas ao ar para serem secas naturalmente; após todo esse processo, as lâminas foram examinadas em microscópio com lente objetiva de imersão. Este procedimento foi repetido para os outros dois tratamentos térmicos que foram realizados, ou seja, 90°C e 100°C/3 minutos.

3.1.6. Fabricação dos queijos

3.1.6.1. Preparo do inóculo

As 11 cepas isoladas neste trabalho foram repicadas e incubadas em caldo lactato 1% a uma temperatura de 30°C por 24 horas.

Para se chegar a uma uniformidade de 10^4 / ml no leite de *Propionibacterium*, foi feita uma curva medindo-se a absorbância e a contagem total. Antes da fabricação as cepas passavam por uma contagem no espectrofotômetro para se determinar sua concentração, estipulando-se assim o volume necessário para se obter a contagem final (Matias, Jaspe e Sanjose, 1994).

3.1.6.2. Contagem das células

A determinação da concentração de células no caldo lactato 1% foi feita por uma contagem em placas, utilizando como meio de cultura o agar lactato, incubado por 48 horas a temperatura de 30°C. O inóculo foi também utilizado para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU640B) a 620 nanômetros, após lavagem a frio em caldo lactato e centrifugação, segundo técnica descrita por (Gobbetti e Rossi, 1992).

Aos resultados de contagem em placas e leitura ótica (absorbância), foi aplicada uma análise de regressão, que permitiu a determinação da equação (figura 3) para ser utilizada nas futuras inoculações do leite com 10^4 UFC/ml de *Propionibacterium*, utilizando-se a densidade ótica para determinação dessa concentração.

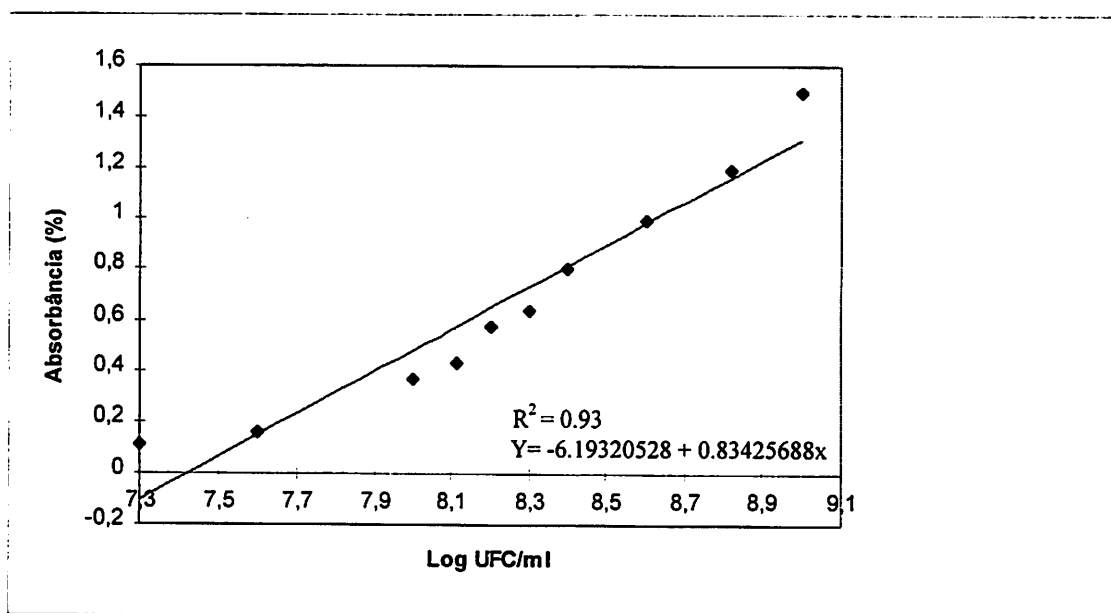


FIGURA 3: Curva padrão para determinação da concentração de *Propionibacterium* no inóculo.

3.1.6.3. Fabricação

Após preparação, em caldo lactato, de cepas suficientes para se atingir uma concentração final de 10^4 / ml de microrganismos *Propionibacterium* por ml de leite, foram fabricados 11 lotes de queijos (número equivalente de cepas finalistas).

Os queijos foram fabricados no laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) conforme técnica básica descrita por Furtado (1993) e Lourenço Neto (1984), o leite já pasteurizado, veio de uma fonte

presumivelmente isenta de microrganismo *Propionibacterium*; os queijos foram fabricados em tanque de aço inox, parede dupla, com capacidade para 12 litros, utilizando-se 10 litros de leite, aos quais foram adicionados fermento láctico à base de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, a cepa de *Propionibacterium* no volume pré determinado (10^4 / ml), cloreto de cálcio e coalho. Após fabricação e salga, os queijos foram curados conforme descrito na metodologia adotada.

Ao final da maturação os queijos foram cortados para se avaliar a textura e a presença eventual de olhaduras típicas, decorrentes da fermentação propiônica. Os queijos foram avaliados por professores da UFLA com experiência na área.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento de bactérias do gênero *Propionibacterium*

Com a finalidade de isolar bactérias naturais produtoras de CO₂, das oito cidades de Minas Gerais que foram selecionadas, apenas sete cidades apresentaram crescimento de microrganismos em cujas fabricações de queijos com culturas homofermentadoras ocorre a produção natural desse gás nos queijos. Na tabela 3, apresenta-se a listagem dessas regiões, bem como o tipo de queijo utilizado neste trabalho. Foram tomadas as devidas precauções para que os queijos selecionados tivessem sido fabricados com fermentos não produtores de gás (tipo “O”) e sem nenhuma contaminação por fermentos produtores de gás utilizados evidentemente para fabricação de outros tipos de queijos no mesmo local de trabalho.

TABELA 3: Número de colônias características de propiônicas em diferentes tipos de queijos.

Região	Tipo de queijo	Isolados*		N ^o de Colônias Características de <i>Propionibacterium</i> **	
		N ^o	%	Número	%
Lavras	Parmesão	21	14.5	19	15.5
Curral Novo	Prato	42	29.0	25	20.3
Juiz de Fora	Parmesão	46	31.7	31	25.2
S. Sebastião da Vitória	Prato	5	3.4	3	2.4
Lima Duarte	Reino	12	8.3	15	12.2
Lavras	Prato	11	7.6	16	13.0
Santos Dumont	Reino	-	-	-	-
Barbacena	Reino	8	5.5	14	11.4
Total		145	100	123	100

* Inoculação em placa, com antibiótico seletivo

** Inoculação em agar inclinado, das colônias típicas do 1^o isolamento.

4.1.1. Primeira purificação

Foram retiradas das placas 145 colônias típicas de *Propionibacterium*, isoladas de 8 queijos utilizados no experimento; estas colônias foram inoculadas em duplicata em meio agar lactato inclinado, sendo que uma destas foi cultivada em anaerobiose. Dos 145 isolados apenas 123 colônias resistiram à purificação mantendo as características típicas. O queijo tipo Reino proveniente de Santos Dumont, não obteve crescimento no meio, sendo descartado do experimento. (tabela 3).

Os isolados característicos de *Propionibacterium* indicam que existe a possibilidade da presença de várias cepas produtoras de gás, podendo inclusive, em um único queijo, haver a contaminação por mais de uma espécie ou subespécie.

Vários trabalhos objetivando o isolamento de bactérias naturais, vêm confirmar a dificuldade de se alcançar esses objetivos, principalmente devido ao fato de as exigências nutricionais dessas bactérias não serem ainda estabelecidas (Furtado, 1990). No caso particular de bactérias produtoras de CO₂, isso fica ainda mais evidente, pois é sabido que essas são muito exigentes quanto ao meio utilizado para seu isolamento (Cummins e Johnson, 1986), quer sejam nutricionais quer sejam de ordem física. Além disso competem com as bactérias lácticas, quer sejam selecionadas de cultivos lácticos ou da flora natural do leite. Embora seja fácil de se constatar a produção de gás, pelas olhaduras presentes no queijo, o isolamento e caracterização da bactéria responsável nem sempre é possível, pois a mesma pode ter morrido ou ter mudado sua morfologia para se adaptar ao meio. Além disso, outras bactérias não produtoras de gás, podem estar presentes no queijo e apresentar, nos primeiros isolamentos, características semelhantes àquelas de interesse.

Após crescimento em agar inclinado sem antibiótico seletivo as cepas foram incubadas em aerobiose e em anaerobiose conforme descrição da tabela 4. Com estas colônias foram feitas coloração de Gram e teste de catalase.

Feita a inoculação dos oito queijos no meio agar lactato suplementado com antibiótico cloxacilina, retirou-se colônias (*Propionibacterium* clássicas) típicas, ou seja, grandes colônias beges lenticulares, apresentando sempre um diâmetro maior que 1mm. A coloração bege assemelha-se à cor amarelada da lã natural. Algumas colônias podem se apresentar com coloração laranja-vermelho. Na superfície das colônias pode-se observar uma cor mais clara, brilhante, abaulada e com bordas lisas. Foram isoladas 145 colônias com estas características (tabela 3).

O comportamento de crescimento das colônias nas placas utilizadas para isolamento foi semelhante àquele observado na cultura comercial (figura 4). As placas apresentaram alguma diferença em relação ao número de colônias, sendo que os queijos provenientes de Curral Novo (figura 5), Juiz de Fora (figura 6) e Lima Duarte (figura 7) foram os que obtiveram um melhor crescimento nas placas, indicando assim que os queijos de onde foram retiradas as amostras continham um número mais elevado de microrganismos.

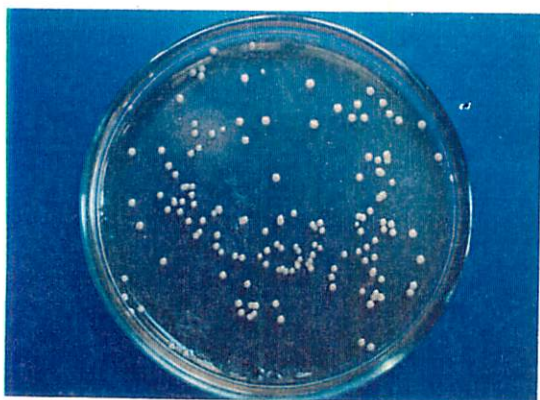


FIGURA 4: Placa de agar lactato de sódio com colônias da cepa PSI da Chr Hansen.

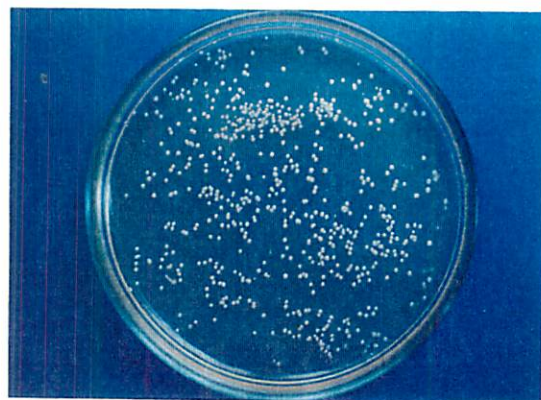


FIGURA 5: Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Curral Novo.



FIGURA 6: Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Juiz de Fora.



FIGURA 7: Placa de agar lactato de sódio com colônias do queijo proveniente de Lima Duarte.

TABELA 4: Número de colônias inoculadas em aerobiose e em anaerobiose em meio agar lactato com antibiótico seletivo.

Região	Tipo de queijo	Aerobiose	Dias	Anaerobiose	Dias
		Número		Número	
Lavras	Parmesão	8	3	13	6
Curral Novo	Prato	30	3	12	6
Juiz de Fora	Parmesão	36	3	10	6
S. Sebastião da Vitória	Prato	3	3	2	6
Lima Duarte	Reino	9	3	3	6
Lavras	Prato	9	3	2	6
Santos Dumont	Reino	-	3	-	6
Barbacena	Reino	5	3	3	6
Total		100		45	

4.1.2. Purificação em agar com antibiótico seletivo

Nesta fase os 123 isolados que foram recuperados em agar lactato inclinado e que apresentaram características típicas, foram submetidos a um “strick” na placa com o meio agar lactato suplementado com antibiótico seletivo, sendo desprezados aqueles que não apresentaram crescimento durante esta purificação.

Somente 56 isolados apresentaram crescimento durante a purificação e foram, assim, novamente submetidos à coloração de Gram e ao teste de catalase. Todos os isolados já purificados foram guardados em agar lactato inclinado com óleo mineral, para posterior identificação bioquímica. (tabela 5)

De todas estas colônias típicas de *Propionibacterium*, só foram eliminadas as cepas que ao serem purificadas não apresentaram crescimento no agar lactato com antibiótico seletivo.

TABELA 5: Características gerais das cepas e situação na purificação.

Região	Tipo de queijo	Gram				Catalase +		Crescimento c/ antibiótico	
		Aeróbicos		Anaeróbicos		Aeróbicos	Anaeróbicos	N ^o	%
		+	-	+	-				
Lavras	Parmesão	12	0	7	0	12	00	08	14.3
Curral Novo	Prato	20	0	5	0	20	00	17	30.3
Juiz de Fora	Parmesão	24	0	7	0	22	02	22	39.3
S. Sebastião da Vitória	Prato	01	0	2	0	01	00	01	1.8
Lima Duarte	Reino	13	0	2	0	13	00	04	7.1
Lavras	Prato	15	0	1	0	15	00	01	1.8
Barbacena	Reino	10	0	3	0	10	00	03	5.4
Total		95	0	27	0	93	02	56	100

4.2. Caracterização e identificação dos isolados

4.2.1. Produção de esporo

Com a ação drástica do calor sobre a célula esporulada há penetração do verde malaquita no cerne do esporo e não há descolorimento com a lavagem de água, quando se coloca a solução aquosa de safranina, ela cora as estruturas da célula vegetativa que não conseguiram reter o verde malaquita.

Os 56 isolados passaram também pelo tratamento térmico para se observar a formação de esporo. Este tratamento foi feito primeiramente a 80°C/5 minutos, após o qual foi feita a coloração de esporos e inoculação em agar lactato inclinado para se observar o crescimento eventual do microrganismo.

Todas as cepas cresceram e não formaram esporo; assim sendo foram novamente submetidas a outros tratamentos térmicos, sendo agora por 90°C/5 minutos e a 100°C/3 minutos; nas duas temperaturas houve crescimento em agar lactato inclinado, sendo que aos 100°C/3 minutos, sete cepas formaram esporos (tabela 6).

TABELA 6: Número de colônias formadoras de esporos isoladas de diferentes tipos de queijos.

Região	Tipo de queijo	Formação de esporos		
		80°C	90°C	100°C
Lavras	Parmesão	-	-	-
Curral Novo	Prato	-	-	2
Juiz de Fora	Parmesão	-	-	4
São Sebastião da Vitória	Prato	-	-	-
Lima Duarte	Reino	-	-	1
Lavras	Prato	-	-	-
Barbacena	Reino	-	-	-
Cepa comercial	-	-	-	-
Total		-	-	7

4.3. Inoculação no meio de cultura Pal Propiobac

Das 56 cepas isoladas na purificação anterior e inoculadas no meio Pal Propiobac, apenas 6 cepas chegaram a apresentar comportamento típico de *Propionibacterium* (tabela 7). Observa-se que dos 56 isolados, somente 06 (10,7%) apresentaram este comportamento típico; como o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias com características de *Propionibacterium*, as 50 cepas restantes foram descartadas.

TABELA 7: Características das colônias inoculadas em meio de cultura Pal Propiobac.

Região	Tipo de queijo	Redução do pH		
		Sim	Não	Dias gastos para reduzir
Lavras	Parmesão	-	08	-
Curral Novo	Prato	-	17	-
Juiz de Fora	Parmesão	04	18	8
São Sebastião da Vitória	Prato	-	01	-
Lima Duarte	Reino	-	04	-
Lavras	Prato	01	00	1
Barbacena	Reino	01	00	6
Cepa comercial	-	-	-	1
Total		06	50	

A mudança de coloração do meio de cultura Pal Propiobac, de violeta para amarelo (redução do pH) dos isolados, forneceu uma resposta importante, sendo que apenas a cepa proveniente do queijo Prato de Lavras mudou a coloração deste meio com 24 horas de incubação (figura 8B), apresentando o mesmo comportamento da cepa comercial PS1 utilizada como parâmetro comparativo (figura 8A); a cepa proveniente do queijo tipo Reino de Barbacena, mudou a coloração do meio com 6 dias de incubação (figura 8C) e as outras 4 cepas deram uma ligeira redução do pH, sendo mesmo assim consideradas como *Propionibacterium* (figura 9). Estes resultados apontam para a existência de diferenças entre as cepas em relação a seu desenvolvimento neste meio que poderiam estar relacionados a características regionais (pastagens, microclima, altitude, etc.). Outros estudos devem ser conduzidos para verificar se cepas de uma região apresentam o mesmo comportamento quando isoladas em outra região distinta.

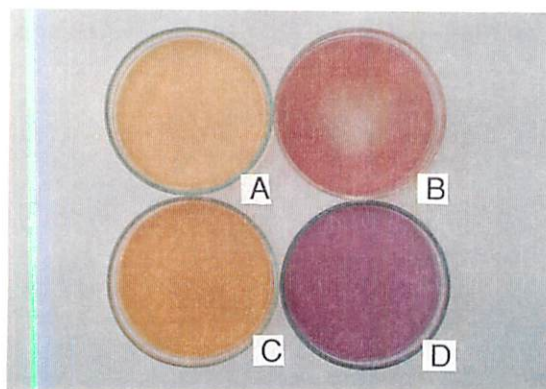


FIGURA 8: A- Placa do meio Pal Propiobac com cepa PS1 da Chr Hansen com mudança de cor em 24 horas; B- Placa do meio Pal Propiobac com cepa proveniente de Lavras com mudança de cor em 24 horas; C- Placa do meio Pal Propiobac com cepa proveniente de Barbacena com mudança de cor em 6 dias; D- Placa do meio Pal Propiobac sem cepa inoculada (coloração original).



FIGURA 9: Placas do meio Pal Propiobac com cepas provenientes de Juiz de Fora com mudança de cor em 8 dias.

4.3.1. Inoculação direta do queijo no Pal Propiobac

Paralelamente ao processo de isolamento e purificação acima descritos, um queijo elaborado com os necessários cuidados para evitar contaminações, proveniente da região de Curral Novo (região a 30km de Barbacena), foi analisado através de isolamento direto no meio Pal Propiobac (figura 10 e 11); desta inoculação foram retirados seis isolados característicos conforme técnica descrita por Madec et al. (1994); estes 6 isolados passaram novamente por provas de coloração de Gram, catalase, morfologia, e todas as provas bioquímicas anteriormente citadas.(tabela 8, 9 e 10). O tratamento térmico também foi efetuado.



FIGURA 10: Placa do meio Pal Propiobac com inoculação direta do queijo proveniente de Curral Novo



FIGURA 11: Placa do meio Pal Propiobac com inoculação direta do queijo proveniente de Curral Novo

TABELA 8: Caracterização morfológica, crescimento no meio Pal Propiobac, prova de Gram e catalase do queijo Prato do Laticínios Boa Nata/Curral Novo.

N ^o cepa	Característica	P.P.B.*	Gram	Catalase
1	cocos agrupados	+	+	+
2	cocos agrupados	+	+	+
3	micrococos	+	+	+
4	cocos agrupados	+	+	+
5	bacilo curto	+	+	+
6	bacilo curto	+	+	+

*PPB = Meio de cultura Pal Propiobac

TABELA 9: Provas bioquímicas das cepas provenientes da inoculação direta em Pal Propiobac.

Cepa	Provas Bioquímicas											Cor
	G.	C.	M	S	Ce	Gl	N.	Id	β -H	Gli.	Mot	
1	+	+	+	+	+	-	-	-	γ	+	-	amarela
2	+	+	+	+	+	-	-	-	γ	+	-	amarela
3	+	+	+	+	+	-	+	-	γ	+	-	branca
4	+	+	+	+	+	-	-	-	γ	+	-	amarela
5	+	+	+	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	cinza
6	+	+	+	+	+	w ⁺	-	-	γ	+	-	verde

G - Gram
C - Catalase
S - Sacarose

Gli - Glicose
M - Maltose
 β -H - Hemólise

Cel - Celobiose
Gl - Gelatina
Mot - Motilidade

N - Redução de nitrato
Id - Indol
w⁺ = positivo fraco

TABELA 10: Provas bioquímicas das cepas provenientes da purificação em agar lactato.

Local	Provas Bioquímicas											Cor
	G.	C.	M	S	Ce	Gl	N.	Id	β -H	Gli.	Mot	
Juiz de Fora	+	+	+	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	cinza
Juiz de Fora	+	+	-	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	cinza
Juiz de Fora	+	+	-	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	cinza
Lavras	+	+	-	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	branca
Barbacena	+	+	-	+	+	w ⁺	-	-	α	+	-	parda-cinza

G - Gram
C - Catalase
S - Sacarose

Gli - Glicose
M - Maltose
 β -H - Hemólise

Cel - Celobiose
Gl - Gelatina
Mot - Motilidade

N - Redução de nitrato
Id - Indol
w⁺ = positivo fraco

A observação dos resultados nas tabelas 8, 9 e 10 indicam que nenhuma cepa poderia ser eliminada, apesar das diferenças eventualmente constatadas entre elas.

O resultado do tratamento térmico de todos os isolados, foi negativo; as 11 cepas após serem submetidas ao tratamento térmico por 80°C/5 minutos, 90°C/3 minutos e 100°C/3 minutos, não apresentaram formação de esporo, as 11 cepas também não apresentaram crescimento após inoculação em agar lactato inclinado por 24 horas a uma temperatura de 30°C.

Das seis cepas inicialmente isoladas, todas mantiveram as características de *Propionibacterium* nas provas bioquímicas conduzidas. Como as provas bioquímicas forneceram subsídios para se concluir que as seis cepas produtoras de gás eram diferentes, estes resultados indicam que em uma região limitada várias cepas, ou mesmo várias espécies de bactérias

produtoras de gás podem estar presentes no leite e conseqüentemente no queijo elaborado nessa região.

4.3.2. Fabricação dos queijos com as cepas finalistas

Ao fim do experimento foram utilizadas onze cepas. Destas, cinco eram provenientes da purificação das 56 cepas em agar com antibiótico seletivo. As outras seis cepas restantes foram retiradas da inoculação direta do queijo de Curral Novo no meio Pal Propiobac (figuras 10 e 11), chegando assim ao um número de onze cepas utilizadas na fabricação dos queijos.

As onze cepas isoladas, foram utilizadas individualmente na fabricação de queijos, sendo que todos apresentaram olhaduras características de fermentação propiônica, confirmando os resultados anteriores de que as cepas são *Propionibacterium*.(figuras 12 a 22).

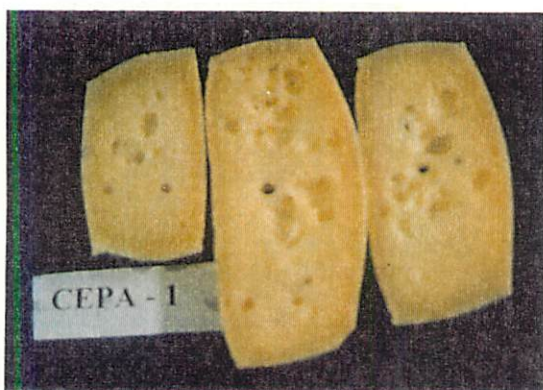


FIGURA 12: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.



FIGURA 13: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.



FIGURA 14: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.

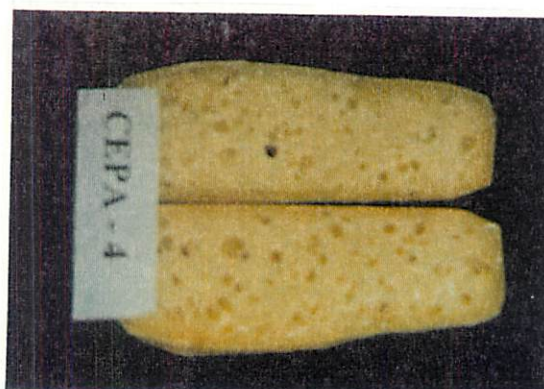


FIGURA 15: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.

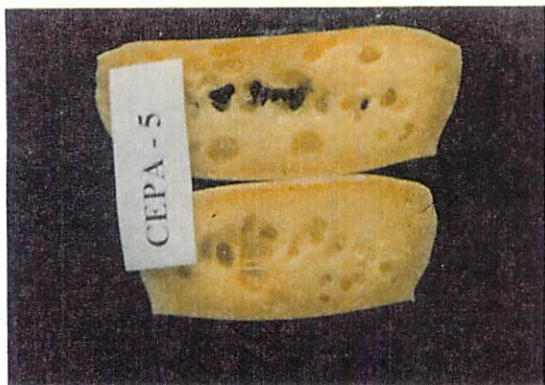


FIGURA 16: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.

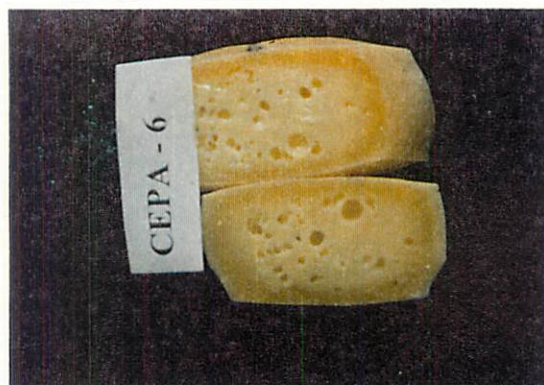


FIGURA 17: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Curral Novo.



FIGURA 18: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.

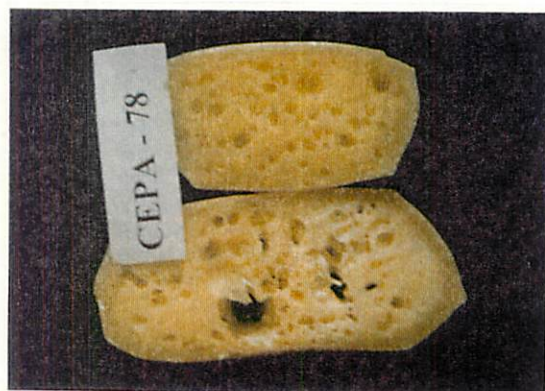


FIGURA 19: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.



FIGURA 20: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Juiz de Fora.

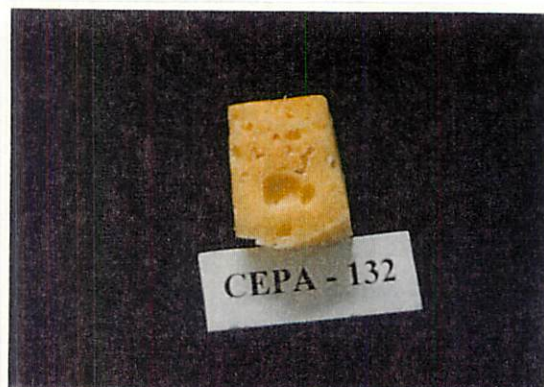


FIGURA 21: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Lavras.



FIGURA 22: Queijo fabricado com a cepa proveniente de Barbacena.

Todos os queijos apresentaram características sensoriais de aroma e sabor típicas de queijos elaborados com *Propionibacterium*.

A produção de olhaduras foi mais rápida e intensa em todos os queijos em comparação com o que se observa normalmente com o uso de culturas propiônicas comerciais. Provavelmente essas cepas iniciam o desenvolvimento mais cedo, em função de já estarem adaptadas ao leite da região, não necessitando assim de um maior período de adaptação ao meio.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, conclui-se que:

- 1 - Existe, nas regiões pesquisadas, a presença de bactérias propiônicas, as quais de alguma maneira podem contaminar o leite e, conseqüentemente permaneceram na massa dos queijos.
- 2 - Em um mesmo queijo, é possível isolar mais de uma espécie, indicando que existe em uma mesma região, uma variedade de espécies, que podem desenvolver-se simultaneamente.
- 3 - Dentre os meios de cultura empregados, o meio Pal-Propiobac foi o que se mostrou mais eficiente, isto é, mais restritivo para isolamento de *Propionibacterium*.
- 4 - As 11 cepas isoladas, provavelmente são diferentes entre si, por apresentarem características e resultados diferentes nas provas bioquímicas.
- 5 - Todas as cepas isoladas após o processo de purificação foram capazes de produzir gás, quando utilizadas na fabricação de queijos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYEBO, A.D.; ANGELO, A.A.; SHAHANI, K.M. Effect of ingesting *Lactobacillus acidophilus* milk in the fecal flora and enzyme activity in humans. **Milchwissenschaft**, Munich, v. 35, n. 12, p. 730-733, Dec. 1980.
- BAER, A.; RYBA, I. Serological identification of in milk and cheese samples. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 299-310, May 1992.
- BRITZ, T.J.; JORDAAN, H.F. The rapid presumptive detection of propionibacterias the causative organisms of defects in Gouda cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.8, n. 2, p. 79-83. Feb. 1976.
- CARVALHO, A. F. de. **Systematique des bactérias propioniques laitières: classification, nomenclature et identification**. Rennes: ENSA, 1994. 227p. (Tese-Doutorado).
- CHAMPAGNE, C.P.; LANGE, M. Analyses sur fromages Mozzarella de type américain ayant montré une production anormale de gaz. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 10, n. 1, p. 43-55, jan./feb. 1990.
- CHAPMAN, H.R.; SHARPE, M.E. Microbiology of cheese. In: ROBINSON, R.K. **The microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. v. 2, p. 157-243.
- COATES, M.E. The influence of the gut microflora on the nutrition of its host. **Bibliotheca Nutritio et Dieta**, Basel, v. 22, p. 101-108, 1975.
- CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v.70, n. 1, p. 1-12. Jan. 1987.
- CUMMINS; C.S.; JOHNSON, J.L. Genus I. *Propionibacterium* Orla-Jensen 1909. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. p.1346-1353.
- CUMMINS, C.S.; JOHNSON, J.L. The Genus *Propionibacterium*. In: BALOW, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The prokaryotes**. Heidelberg: Springer Verlag. 1991. p.834-848.



- DRINAN, F.D.; COGAN, T.M. Detection of propionic acid bacteria in cheese. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 59, n. 1, p.65-69. Feb. 1992.
- DYKSTRA, G.J.; DRERUP, D.L.; BRANEN, A.L.; KEENAN, T.W. Formation of dimethyl sulfide by *Propionibacterium shermanii* ATCC 9617. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v.54, n. 1, p. 168-172, Jan. 1971.
- FERNANDES, C.F.; SHANANI, K.M.; AMER, M.A. Control of Diarrhoea by *lactobacilli*. **Journal of Applied Nutrition**, Asheville, v. 10, n. 1, p. 32-43, Jan. 1988.
- FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados** - aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: UFV, 1987. p.20-22.
- FURTADO, M.M. **Queijo tipo suíço**. Valinhos: Chr. Hansen, 1990.(Programa Ha-La Biotec-6).
- FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297p.
- FURTADO, M.M. Fabricação de queijos no Brasil. **Informativo do Laticionista**, Valinhos, n.38, p.24-28, abr. 1992.
- FURTADO, M.M. Fermentação propiônica em queijo suíço. **Informativo Ha-la Biotec**, Valinhos, v. 3, n. 13, p. 3-6, jan. 1993.
- GILLIAND, S.E. ; SPECK, M.L. Desconjugation of bile acids by intestinal *lactobacilli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Reading, v. 33, n. 1, p. 15-18, Jan. 1977.
- GOBETTI, M.; ROSSI, J. Peptidases profiles of *Pseudomonas fluorescens* identification and properties. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 75, n. 4, p. 924-934. Apr. 1992.
- GOLDIN, B.R.; SWENSON, L.; DRUYER, J.; SEXTON, M.; GORBACH, S.L. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. **Journal National Chemistry and Immunology**, London, v. 64, n. 2, p. 255-261. 1980.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994. 787p.
- JOHNSON, J.L.; CUMMINS, C.S. Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic Coryneformes, classical propionibacteria and of *Arachnia propionica*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 109, n. 3, p. 1047-1066, May 1972.
- KIM, H.S.; GILLIAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk and lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v.66, n. 5, p. 959-966, May 1983.

- KLAENHAMMER, T.R. Microbial considerations in selection and preparation of *Lactobacillus* strains for use as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 65, n.7, p. 1339-1349, July 1982.
- KYRIAKIS, S.C. Post-weaning syndrome (PWDS) of piglets. A new therapeutic approach with the supporting therapy. **Pig news and Information**, New York, v.4, n. 1, p. 23-27, 1983.
- LANGSRUD, T.; REINBOLD, G.W. Flavor Development and Microbiology of Swiss Cheese - A Review - II. Starters, manufacturing processes and procedures. **Netherlands and Milk Dairy Journal**, Wageningen, v. 36, n. 11, p.531-534, Nov. 1973a.
- LANGSRUD, T.; REINBOLD, G.W. Flavor Development and Microbiology of Swiss Cheese - A Review - III. Ripening and flavor production. **Netherlands and Milk Dairy Journal**, Wageningen, v. 36, n. 11, p.593-609, Nov. 1973b.
- LAW, B.A. Cheese. In: ROSE, A.H. **Fermented food**. London: Academic Press, 1982. p. 148-198.
- LOURENÇO NETO, J.P. de M. Fermentação propiônica e formação de olhaduras. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Toste**, Juiz de Fora, v.39, n.234, p.23-29, jul./ago. 1984.
- LOURENÇO NETO, J.P. de M.; VIEIRA, S.D.A.; NEVES, B. dos S. Tecnologia da fabricação do queijo Emmental. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Toste**, Juiz de Fora, v. 37, n. 224, p.3-8, nov./dez. 1982.
- MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1980. 522p.
- MADEC, M.N.; ROUALT, A.; MAUBOIS, J.L.; THIERRY, A. **Milieu sélectif pour le dénombrement des bactéries propioniques**. PCT/FR9400082, FR9300823. 2700778. 27 jan 1993. Institut National de La Recherche Agronomique. France, 1994. 1-14p.
- MANTERE-ALHONEN, S.; MAKINEN, E. A new type of sour milk with propionibacteria. **Meijeritietellinen Aikakauskirja**, Finland, v. 45, n. 1, 49-61, Jan. 1987.
- MATIAS, P.; JASPE, A.; SANJOSE, C. Malato and glucose in milk incubated with psychrotrophic bacteria. **Journal of Food Microbiology**, London, v. 23, n. 2, p. 215-219, Feb. 1994.
- MOCQUOT, G. Reviews of the progress of dairy science: Swiss-type cheese. **Journal of Dairy Research**, New York, v.46, n. 1, p.133-160, Jan. 1979.
- ORLA-JENSEN, S. Die Hauptlinien des natürlichen bakteriensystems. **Zentralblatt Fuer Bakteriologie usw Abstract 2**, Stuttgart, n. 22, p. 305-346, 1909.

- PANON, G. Purification and characterization of a proline iminopeptidase from *Propionibacterium shermanii* 13673. **La Lait**, Paris, v. 70, n. 5, p. 439-452, Dec. 1990.
- PARK, H.S.; REINBOLD, G.W.; HAMMOND, E.G.; CLARK, W.S. Growth of propionibacteria at low temperatures. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v.50, n. 4, p. 589-591, Apr. 1967.
- PORTIS, M.M.; ALBUNS. A clinical and laboratory study of therapeutic value of *Lactobacillus acidophilus*. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 85-88, Jan. 1931.
- RETTGER, L.F.; CHEPLIN, H.A. **The intestinal flora**. New Haven: Yale Univ. Press. 1921. 321p.
- SAHLSTRÖM, S.; ESPINOSA, C.; LANGSRUD, T.; SORHAUG, T. Cell wall, membrane and intracellular peptidase activities of *Propionibacterium shermanii*. **Journal of Dairy Science**, Illinois, v. 72, n. 2, p. 342-350, Feb. 1989.
- SANDINE, W.E. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 42, n. 4, p. 259-262, Apr. 1979.
- SHERMAN, J.M. The cause of eyes and characteristic flavor in Emmental or Swiss cheese. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 6, n. 3, p. 379-392, Oct. 1921.
- SPECK, R.V. Thermophilic organisms in food spoilage: sulfid spoilage anaerobes. **Journal Food Protection**, Iowa, v. 44, n. 2, p. 149-153, Feb. 1981.
- THIERRY, A.; MADEC, M.N. Enumeration of propionibacteria in raw milk using a new selective medium. **Le Lait**, Paris, v.75, n. 4/5, p. 315-323, Nov. 1995.
- VAN NEIL, C.B. Genus I. *Propionibacterium* Orla-Jensen 1909. In: BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D.; SMITH, N.R. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. London: Tindall & Cox, 1957. p.569-577.
- VAUGHN, R.H. Lactic acid fermentation of cabbages, cucumbers, olives and other products. In: REED, G. **Industrial microbiology**. Saybrook: Prescott & Dunn's. 1981. p. 220-224.
- VON FREUDENREICH, E.; ORLA-JENSEN, S. Über die im Emmentalerkase stattfindene Propionsäuregärung. **Zentralblatt Fuer Bakteriologie usw Abstract**, Stuttgart, v. 17, n. 2, p.529-546, Feb. 1906.