

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O
PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE LEITE DE OVELHA**

CÁSSIA REGINA NESPOLO

PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O
PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE LEITE DE OVELHA**

CÁSSIA REGINA NESPOLO

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente,
Área de concentração em Microbiologia Agrícola,
Linha de Pesquisa Microbiologia de Alimentos Processados e "in Natura".

ORIENTADOR: DR. ADRIANO BRANDELLI

PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.

AGOSTO DE 2009.

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

N462c Nespolo, Cássia Regina

Características microbiológicas e físico-químicas durante o processamento de queijo de leite de ovelha/ Cássia Regina Nespolo. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof. Adriano Brandelli

1. Microbiologia dos alimentos 2. Leite - ovelha 3. Queijo - microbiologia 4. Lactobacillus rhamnosus 5. Lactobacillus plantarum I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

CDU 579.67 (043)

*Ao Gustavo, por tudo que
representa estarmos juntos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Adriano Brandelli, pelo apoio e por ter possibilitado a realização dos projetos com queijo de leite de ovelha e CDBA/CAPES.

À Prof. Patricia Risso, pela acolhida fraternal e por todo o empenho durante o estágio de doutorando na UNR.

Ao Márcio Aginsky, por ter viabilizado a execução do projeto e disponibilizado a equipe de trabalho na indústria de laticínios.

À equipe do Laboratório de Bioquímica (ICTA/UFRGS), pela descontração e pelos “testes sensoriais espontâneos” a que foram submetidos durante a realização do projeto. Em especial, agradeço à Ana Paula Folmer Corrêa, Jaslin Taffarel, Nísia Cé e Ana Carolina Ritter pelo auxílio durante a execução do projeto.

Aos colegas do Laboratório “PROFEP” (UNR), por toda a colaboração e momentos divertidos que passamos, especialmente à equipe envolvida nos projetos realizados: Prof. Estela Alvarez, Maria Eugénia Hidalgo, Anselmo Reggiardo, Nicolás Fortuna e Manuel Mancilla Canales.

Aos professores e bolsistas da Área Físicoquímica, Departamento de Química-Física (FCBF/UNR), pela recepção, mates e aulas de tradições argentinas.

Aos professores Eduardo Tondo, Marisa Cardoso e Amanda de Souza Motta, pelo contribuição durante o exame de qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, por proporcionar o aperfeiçoamento científico e profissional.

À CAPES, pela oportunidade da participação pioneira no programa CDBA.

Aos colegas de trabalho com os quais convivi durante o período do doutorado, pelas experiências e crescimento.

Aos amigos muito especiais, por toda energia e companheirismo.

À minha família, pela força e união.

Ao Gustavo, pelo amor, carinho e incentivo.

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE LEITE DE OVELHA¹

Autor: Cássia Regina Nespolo

Orientador: Adriano Brandelli

RESUMO

A produção de leite e queijo de ovelha pode ser considerada recente no Brasil, por isso a necessidade de estudar a composição e o processamento destes alimentos. As bactérias lácticas presentes no leite são empregadas como culturas iniciadoras em queijos e influenciam nas características de qualidade do produto. A qualidade microbiológica e físico-química do leite de ovelha da raça Lacaune e do queijo Fascal produzidos no RS foi avaliada, durante a produção e maturação do queijo. As bactérias lácticas *Lactobacillus plantarum* LCN 17 e *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 foram isoladas a partir das amostras e o potencial antimicrobiano, proteolítico e lipolítico destes isolados foi investigado. Com base nos resultados, foi testada a utilização das bactérias lácticas autóctones como culturas iniciadoras para a produção de queijo de ovelha. A combinação entre *Lactobacillus plantarum* LCN 28 e *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 demonstrou ser adequada na fabricação de queijo Fascal, em condições experimentais. A caseína precipitada a partir do leite de ovelha foi usada na preparação de caseinatos de sódio e de cálcio. O processo de agregação e formação de géis de caseinato ovino por acidificação e as modificações que estes géis sofreram na presença de açúcares e/ou pequenos co-solutos foi estudada. A concentração de cálcio afetou a solubilidade do caseinato ovino, o grau de compactação e a dureza dos géis. A adição de sacarose e lactose ao caseinato ovino acarretou a formação de partículas coloidais com estrutura mais compacta e menor hidrofobicidade superficial. Em ambos os casos, o caseinato ovino e bovino apresentaram comportamento um pouco distinto.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Linha de Pesquisa Microbiologia de Alimentos Processados e "in Natura", Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (200 p.) Agosto, 2009.

MICROBIOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS DURING MANUFACTURING OF EWE MILK CHEESE¹

Author: Cássia Regina Nespolo

Adviser: Adriano Brandelli

ABSTRACT

The production of sheep milk and cheese may be considered a recent activity in Brazil; hence the need to study the composition and processing of these foods. Lactic acid bacteria present in milk are used as starter cultures in cheese production, and influence product quality characteristics. The microbiological and physicochemical quality of milk of the Lacaune sheep breed and of Fascal cheese produced in the state of Rio Grande do Sul, RS, Brazil, was assessed during cheese production and ripening. The lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* LCN 17 and *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 were isolated from samples to investigate the antimicrobial, proteolytic and lipolytic potentials of each microorganism. The results were used to test the applicability of these autochthonous bacteria as starter cultures in the production of ewe cheese. The mixed culture of *Lactobacillus plantarum* LCN 28 and *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 was shown to be appropriate in the production of Fascal cheese, under experimental conditions. The casein precipitated from sheep milk was used in the preparation of sodium and calcium caseinates. The aggregation process and formation of ovine caseinate gels by acidification and the changes these gels undergo in the presence of sugars and/or small cosolutes were investigated. Calcium concentration affected the solubility of ovine caseinate, compactation degree and hardness of gels. The addition of saccharose and lactose to ovine caseinate led to the formation of colloidal particles presenting a more structured and lesser surface hydrophobicity. In both cases, ovine and bovine caseinate presented fairly distinct behaviors.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (200 p.) August, 2009.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 OVINOCULTURA E PRODUÇÃO LEITEIRA NO BRASIL E NO MUNDO	4
2.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE OVINO.....	6
2.2.1 <i>Caseínas e Caseinatos</i>	10
2.2.1.1 Propriedades e Estabilidade de Caseínas e Caseinatos.....	14
2.2.1.2 Agregação, Gelificação e Hidrólise de Caseínas e Caseinatos ..	15
2.3 PRODUÇÃO DE LEITE OVINO	22
2.3.1 <i>Fatores Relacionados à Produção de Leite</i>	22
2.3.2 <i>Parâmetros Microbiológicos em Leite de Ovelha</i>	23
2.3.3 <i>Parâmetros Físico-Químicos em Leite de Ovelha</i>	26
2.4 PRODUÇÃO DE QUEIJO DE LEITE DE OVELHA	28
2.4.1 <i>Etapas do Processamento do Queijo</i>	31
2.4.1.1 Ordenha	32
2.4.1.2 Resfriamento	33
2.4.1.3 Aquecimento	34
2.4.1.4 Coagulação	35
2.4.1.5 Corte da Coalhada	37
2.4.1.6 Dessoramento	37
2.4.1.7 Adição de Sal	38
2.4.1.8 Enformagem e Prensagem	38
2.4.1.9 Maturação	39
2.4.1.10 Corte e Embalagem	42
2.4.1.11 Distribuição	42

2.4.2	<i>Parâmetros Microbiológicos em Queijos</i>	42
2.4.3	<i>Parâmetros Físico-Químicos em Queijos</i>	50
2.5	LEGISLAÇÃO PARA LEITE E QUEIJO.....	54
2.6	BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	57
2.6.1	<i>Bactérias Lácticas em Queijos</i>	60
2.6.2	<i>Culturas Iniciadoras e não Iniciadoras em Queijos</i>	62
2.6.3	<i>Bacteriocinas produzidas por Bactérias Lácticas</i>	67
2.6.3.1	Fatores que afetam as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas.....	70
2.6.3.2	Fatores que influenciam a eficácia da bacteriocina no alimento .	71
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1	ARTIGO 1.....	76
3.1.1	<i>Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal produzido com leite de ovelha</i>	76
3.1.2	<i>Resumo</i>	76
3.1.3	<i>Abstract</i>	77
3.1.4	<i>Introdução</i>	77
3.1.5	<i>Materiais e Métodos</i>	78
3.1.5.1	<i>Material</i>	78
3.1.5.2	<i>Análises microbiológicas</i>	79
3.1.5.3	<i>Análises físico-químicas</i>	79
3.1.5.4	<i>Análise estatística</i>	79
3.1.6	<i>Resultados</i>	80
3.1.6.1	<i>Análises microbiológicas</i>	80
3.1.6.2	<i>Análises físico-químicas</i>	81
3.1.7	<i>Discussão</i>	82
3.1.8	<i>Conclusões</i>	85
3.1.9	<i>Referências</i>	86
3.2	ARTIGO 2.....	87
3.2.1	<i>Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese</i>	87
3.2.2	<i>Abstract</i>	87
3.2.3	<i>Resumo</i>	88
3.2.4	<i>Introduction</i>	88
3.2.5	<i>Materials and Methods</i>	90
3.2.5.1	<i>Samples</i>	90
3.2.5.2	<i>Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB)</i>	90
3.2.5.3	<i>Proteolytic and Lipolytic Activities</i>	91
3.2.5.4	<i>Antibacterial Activity</i>	91
3.2.5.5	<i>Identification of Selected LAB</i>	92
3.2.5.6	<i>Production of Crude BLS</i>	92

3.2.5.7 BLS Activity Assay	92
3.2.5.8 Growth Determination	93
3.2.5.9 Susceptibility to pH, temperature, and enzymes	93
3.2.6 <i>Results and Discussion</i>	93
3.2.7 <i>References</i>	101
3.3 ARTIGO 3.....	103
3.3.1 <i>Characterization of ovine Fascal cheese produced with autochthonous cultures</i>	103
3.3.2 <i>Abstract</i>	103
3.3.3 <i>Introduction</i>	104
3.3.4 <i>Materials and Methods</i>	105
3.3.4.1 Isolation and Selection of Lactic Acid Bacteria (LAB).....	105
3.3.4.2 Manufacture of Experimental Cheeses	107
3.3.4.3 Cheese Sampling.....	108
3.3.4.4 <i>Microbiological Analyses</i>	108
3.3.4.5 <i>Physicochemical Analyses</i>	109
3.3.4.6 Assessment of proteolysis.....	109
3.3.4.7 Statistical analysis	110
3.3.5 <i>Results and discussion</i>	110
3.3.5.1 Microbiological characterization of Fascal cheese	110
3.3.5.2 Chemical characterization of Fascal cheese	114
3.3.5.3 Soluble nitrogen and proteolysis	116
3.3.6 <i>Conclusions</i>	119
3.3.7 <i>References</i>	119
3.4 ARTIGO 4.....	122
3.4.1 <i>Effect of calcium on ovine caseinate functional properties</i>	122
3.4.2 <i>Abstract</i>	122
3.4.3 <i>Introduction</i>	123
3.4.4 <i>Materials and methods</i>	125
3.4.4.1 Precipitation of ovine casein.....	125
3.4.4.2 Colloidal stability test.....	126
3.4.4.3 Precipitation of casein by Ca ²⁺	126
3.4.4.4 Urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Urea-SDS-PAGE)	127
3.4.4.5 Composition of the precipitates	128
3.4.4.6 Size variations of the CCA	128
3.4.4.7 Casein determination	129
3.4.4.8 Effect of calcium in acid aggregation of casein	129
3.4.4.9 Analysis of conformational changes of Ca-Cas.....	130
3.4.4.10 Surface hydrophobicity (S ₀).....	130
3.4.4.11 Size distribution of Ca-Cas particles.....	130

3.4.4.12 Rheological properties of acid gels of Ca-Cas	131
3.4.4.13 Statistical Analysis.....	132
3.4.5 <i>Results and discussion</i>	132
3.4.5.1 Colloidal stability test.....	132
3.4.5.2 Analysis of conformational changes and surface hydrophobicity	137
3.4.5.3 Acid aggregation and gelation of ovine caseinate: effect of calcium	138
3.4.6 <i>Conclusions</i>	144
3.4.7 <i>References</i>	146
3.5 ARTIGO 5.....	149
3.5.1 <i>Acid Aggregation and Gelation of Ovine Caseinate. Effect of Sucrose and Lactose</i>	149
3.5.2 <i>Abstract</i>	149
3.5.2 <i>Introduction</i>	149
3.5.3 <i>Materials and Methods</i>	152
3.5.3.1 <i>Materials</i>	152
3.5.3.2 <i>Preparation of Caseinate Solutions</i>	153
3.5.3.3 <i>Acid Aggregation of Casein</i>	153
3.5.3.4 <i>Surface Hydrophobicity (S₀)</i>	155
3.5.3.5 <i>Size Distribution of Caseinate Particles</i>	156
3.5.3.6 <i>Rheological Properties of Acid Gels of Caseinates</i>	156
3.5.3.7 <i>Statistical Analysis</i>	157
3.5.4 <i>Results and Discussion</i>	157
3.5.4.1 <i>Acid Aggregation of Ovine Caseinate</i>	157
3.5.4.2 <i>Effect of sucrose or lactose on caseinate solutions and acid aggregation</i>	163
3.5.4.3 <i>Rheological Properties of Acid Gels of Caseinates</i>	173
3.5.5 <i>Literature Cited</i>	175
4. CONCLUSÕES	178
5. PERSPECTIVAS	180
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Fascal.	31
Figura 1 (2). Viable counts of Lactic Acid Bacteria in ovine milk and during the ripening of Brazilian ovine cheese. Selection and isolating of Lactic Acid Bacteria, in ovine milk and during the ripening of Brazilian ovine cheese	94
Figura 2 (3). Viable counts of Lactic Acid Bacteria and pH monitoring during the BLS production.....	99
Figure 1 (4). Viable counts of proteolytic microorganisms on Milk Agar and lipolytic microorganisms on Tributyrin Agar in Fascal cheeses	113
Figure 2 (5). Evolution of soluble nitrogen at pH 4.6 and trichloroacetic acid, in relation to total nitrogen, in Fascal cheeses	117
Figure 1 (6). Remnant caseinate concentration in the supernatants of ovine or bovine sodium caseinate with Ca^{2+}	133
Figure 2 (7). S_{app} fractional change, turbidity as absorbance at 650 nm and parameter β , in ovine and bovine sodium caseinate with Ca^{2+}	135
Figure 3 (8). Protein composition and protein solubility of CCA versus TCC for ovine and bovine caseinate.....	136
Figure 4 (9). Fluorescence intensity vs. wavelength in sodium caseinate with or without Ca.....	137
Figure 5 (10). Parameter β variations as a function of the time and the pH, after the addition of GDL and variations of pH as a function of time during the acid aggregation of sodium caseinate solutions	139
Figure 6 (11). Variations of turbidity as a function of time, after the addition of GDL, using different methods.....	141
Figure 7 (12). Laser diffraction derived size frequency distribution of particles during the acidified aggregation of sodium caseinate solutions in absence and in presence of different calcium concentrations.....	142

Figure 8 (13). Parameter $D_{4,3}$ as a function of time after the addition of GDL in mixtures of sodium caseinate in presence of absence of calcium.....	143
Figure 9 (14). Variations of elastic modulus G' and viscous modulus G'' during acidification process after addition of GDL.....	143
Figure 1 (15). 3D projection of curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation of ovine sodium caseinate solutions.....	159
Figure 2 (16). Variations of turbidity and pH of ovine caseinate solutions as a function of time after addition of GDL for different ovine caseinate concentrations, R and temperatures	161
Figure 3 (17). 3D projection of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation of sodium caseinate. Effect of temperature and effect of R for ovine caseinate solutions.....	163
Figure 4 (18). Fluorescence relative intensity vs. wavelength in mixtures of ovine sodium caseinate in the presence of sucrose or lactose at different concentrations.....	164
Figure 5 (19). 3D projection of the curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation of ovine sodium caseinate solutions with sucrose and lactose at different concentrations	166
Figure 6 (20). Relative viscosity of the medium as function of sugar concentration: sucrose or lactose.....	167
Figure 7 (21). 3D projection of the curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation of bovine sodium caseinate solutions with sucrose and lactose at different concentrations	169
Figure 8 (22). Parameters turbidity (obscuration) and $D_{4,3}$ as a function of time as a function of time after the addition of GDL in mixtures of ovine sodium caseinate, in presence of sucrose or lactose	171
Figure 9 (23). Laser diffraction derived size frequency distribution of particles during the acidified aggregation of ovine sodium caseinate solutions and in presence of sucrose or lactose.....	172

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição média de nutrientes básicos em leite de ovelha descrita por diferentes autores.	7
Tabela 2. Composição mineral em leite de ovelha.....	9
Tabela 3. Comparação de características estruturais das quatro caseínas em leite ovino e bovino.	12
Tabela 4. Propriedades das caseínas importantes na fabricação de queijos. .	14
Tabela 1 (5). Análises microbiológicas realizadas no queijo Fascal ao longo do período de maturação.	80
Tabela 2 (6). Análises físico-químicas realizadas no leite cru e no queijo Fascal, ao longo do período de maturação.	81
Table 1 (7). Antimicrobial spectrum of lactic acid bacteria isolated from Brazilian ovine cheese.....	96
Tabela 2 (8). Stability of BLS on different conditions.....	100
Table 1 (9). Microbiological counts in Fascal cheeses during ripening.	111
Table 2 (10). Chemical composition of Fascal cheeses during ripening.	115
Table 1 (11). Calcium binding parameters for sodium caseinates.....	133
Table 2 (12). Surface hydrophobicity in mixtures of sodium caseinate containing different calcium concentrations.....	138
Table 3 (13). The G^{\prime} - $G^{\prime\prime}$ crossover times and pH_g for formulations containing sodium caseinate with different calcium concentrations, after adding GDL ...	144
Table 1 (14). Surface hydrophobicity in mixtures of ovine sodium caseinate at different sucrose or lactose concentrations.....	165
Table 2 (15). Gel times, pH_g and maximum storage modulus (G') for formulations containing sodium caseinate at different concentrations, temperatures and amounts of adding GDL.	174

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
 a_w : atividade de Água
BPF: Boas Práticas de Fabricação
CCS: Contagem de Células Somáticas
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN: Caseína
ESD: Extrato Seco Desengordurado
EST: Extrato Seco Total
FAO: *Food and Agriculture Organization*
FCC: Fosfato de Cálcio Coloidal
FDA: *Food and Drug Administration*
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GDL: Glucono- δ -lactona
GRAS: *Generally recognized as safe*
LAB: Bactérias Lácticas
MAP: *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*
MC: Micelas de Caseína
OMS: Organização Mundial da Saúde
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PDO: Denominação de Origem Protegida
PGI: Indicação Geográfica Protegida
pH 4,6 SN: Nitrogênio Solúvel em pH 4,6
POP: Procedimentos Operacionais Padrão
PPHO: Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
PTA: Ácido Fosfotúngstico
STEC: toxina Shiga produzida por *Escherichia coli*
TCA: Ácido Tricloroacético
WSN: Nitrogênio Solúvel em Água

1. INTRODUÇÃO

A recente atividade de produção de leite de ovelha no Brasil e sua industrialização a queijos finos podem representar uma alternativa com grande potencial econômico para o produtor. A expansão desta atividade econômica está vinculada, entre outros aspectos, à matéria-prima empregada, à qualidade assegurada do produto que chega ao consumidor e ao fato deste possuir um caráter regional.

A fabricação de queijo de leite de ovelha no Rio Grande do Sul em escala industrial é restrita à Região Metropolitana e à Serra Gaúcha, sendo que a informação encontrada na literatura sobre os produtos e sobre o próprio leite produzido nestas regiões é escassa. O queijo Fascal pode ser considerado o primeiro queijo de leite de ovelha desenvolvido no Brasil, utilizando leite cru de ovelhas da raça Lacaune, culturas iniciadoras comerciais e com um tempo de maturação mínimo de noventa dias. A legislação brasileira prevê que o leite cru pode ser utilizado na produção de queijos, desde que o período de maturação não seja inferior a sessenta dias.

Apesar do caráter regional do queijo Fascal, a utilização de culturas iniciadoras selecionadas a partir da matéria-prima poderia fornecer características de tipicidade ao produto, tão valorizada em queijos tradicionais produzidos no continente europeu. A seleção de bactérias lácticas e sua utilização como culturas iniciadoras em queijos tem sido bastante investigada, especialmente em queijos italianos, portugueses e espanhóis, a maioria manufaturados com leite cru de ovelha e somente com culturas autóctones. A produção de bacteriocinas por estes isolados e a alteração dos parâmetros de proteólise durante sua maturação também tem sido tema de pesquisas.

As principais proteínas presentes no leite são as caseínas, sendo a de origem bovina a mais amplamente investigada. Com base nos dados apresentados nas referências consultadas, pode-se dizer que as propriedades físico-químicas da caseína ovina são conhecidas parcialmente. Este conhecimento é importante para determinar as condições adequadas para o processamento do caseinato ovino e favorecer o desenvolvimento de produtos alimentícios com características estruturais diferenciadas.

A coagulação das caseínas é o principal passo na produção de queijo e iogurte, processo que pode ser promovido por modificação do pH ou por hidrólise enzimática, conduzindo à agregação destas proteínas lácteas e posterior formação de um gel. A adição de outros componentes, tais como sacarose, lactose e cálcio, é comum em sistemas alimentícios lácteos e a presença destes compostos pode interferir positivamente ou negativamente na estrutura do alimento. A interação entre estes componentes tem sido objeto de estudos recentes, que utilizam o caseinato bovino como o componente protéico do sistema.

A escassez de dados na literatura sobre o leite e o queijo de ovelha produzidos no Brasil, bem como das bactérias lácticas isoladas a partir destes alimentos, aliado ao fato dos estudos com proteínas lácteas geralmente não utilizarem a caseína ovina, despertaram o interesse na realização deste estudo que tem como base a matéria-prima leite de ovelha. A partir disso, foi realizado um acompanhamento do leite cru de ovelha da raça Lacaune e das etapas de fabricação do queijo. A avaliação com as caseínas isoladas a partir do leite ovino foi realizada dentro do projeto “Caracterização de géis formados pela interação entre proteínas lácteas de origem ovina e polissacarídeos: propriedades físico-químicas, reológicas e estruturais”, na Universidad Nacional de Rosario, Argentina, sob orientação da Dra Patricia Hilda Risso, dentro do Programa CDBA/CAPES.

Os objetivos deste trabalho incluíram a avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite de ovelha da raça Lacaune e do queijo produzido com leite cru, e a geração de dados para a classificação do queijo

Fascal. Ainda, a caracterização das bactérias lácticas presentes no leite de ovelha e durante o processamento do queijo, investigando sua relação com as características microbiológicas e físico-químicas do produto final, a produção de bacteriocinas e o potencial de utilização como culturas iniciadoras para produção do queijo Pascal. As caseínas ovinas também foram foco desta investigação, através do estudo do processo de agregação e formação de géis de caseinato ovino por acidificação, avaliação das modificações que estes géis sofrem na presença de açúcares e/ou pequenos co-solutos, fornecendo assim informações sobre as proteínas lácteas de origem ovina e seu comportamento em diferentes sistemas alimentícios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ovinocultura e Produção Leiteira no Brasil e no Mundo

As ovelhas e cabras foram os primeiros animais a serem domesticados e a criação por humanos iniciou há cerca de 10.000 anos. A partir dos rebanhos ancestrais de ovelhas e cabras selvagens, nas regiões atualmente pertencentes ao Iraque, Irã, Síria e leste da Turquia, estes animais foram avançando ao redor do mundo, em centenas de diferentes raças, totalizando mais de 1 bilhão de ovelhas e 750 milhões de cabras (HAENLEIN, 2007; MARTH & STEELE, 2001).

A produção de leite de pequenos ruminantes perfaz em torno de 4% da produção leiteira mundial (EMBRAPA, 2005), sendo que a produção de leite de ovelha corresponde a 1,3% da produção mundial. Dentro deste panorama, o leite caprino e o leite ovino situam-se em terceiro e quarto lugares, respectivamente, depois do leite bovino e do bubalino. Em 2004, foram 8,2 milhões de toneladas de leite ovino produzidas e de 12,3 milhões de toneladas de leite caprino no mundo. O continente europeu destaca-se na produção de leite de pequenos ruminantes, ressaltando a tecnificação, a importância da atividade como exploração econômica, a seleção e o melhoramento animal, e a aceitação do produto, com mercado firme e crescente, principalmente para a produção de queijos finos (EMBRAPA, 2005; MARTH & STEELE, 2001; PRATA *et al.*, 1998).

No Brasil, as exportações de produtos lácteos aumentaram 57,1% entre 2003 e 2004, com um crescimento de 101,5% no mercado de queijos e requeijão (EMBRAPA, 2005). O Brasil detém o nono maior rebanho caprino mundial, sendo que a importância desta atividade produtiva, particularmente

voltada para a produção de leite, vem crescendo consideravelmente nas últimas décadas. Tem-se observado um aumento na procura e consumo do leite e seus derivados, em especial o queijo, em função de suas características nutricionais e sensoriais (PRATA *et al.*, 1998). Apesar de dispor de apenas 3,5% do efetivo caprino do Brasil, a região Sudeste destaca-se pela representatividade de seus estados no agronegócio caprino leiteiro, tanto pela produção comercial (21% do total produzido no país), quanto pela participação no mercado do leite de cabra e seus derivados. O destaque da região Sudeste neste segmento deve-se às iniciativas pioneiras de produtores e indústrias quanto à legislação sanitária e *marketing* do leite de cabra, coleta granelizada, produção de leite em pó, leite longa vida, leite achocolatado, leite *light*, queijos finos, sorvetes e cosméticos (BORGES, 2003).

A produção de leite em ovinos tem sido vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais (SOUZA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006; SUÁREZ & BUSETTI, 2006). Mais concentrado que o leite de vaca e cabra, o leite de ovelha está indicado para a fabricação de queijos com aromas e sabores especiais, de alto valor comercial, e pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor (SOUZA *et al.*, 2005; SUÁREZ & BUSETTI, 2006).

O rebanho ovino aparece como o quarto rebanho mais importante no Brasil, em número de cabeças, e o Rio Grande do Sul, como o maior efetivo do país (IBGE, 2006). Apesar disso, a produção de leite ovino ainda é uma atividade pouco conhecida, embora existam animais de raças com aptidão leiteira, como é o caso da Lacaune e da Bergamácia (BRITO *et al.*, 2006; SÁ *et al.*, 2005). No caso do Rio Grande do Sul, considera-se que a produção ovina está voltada principalmente para carne e lã. Nos últimos anos, tem-se observado o crescimento da produção de leite de ovelha em algumas cidades do RS, bem como sua industrialização até a obtenção de queijos. Mesmo não sendo expressiva, esta produção é considerada rentável, já que os produtos possuem um alto valor para comercialização.

Os primeiros ovinos da raça Lacaune foram trazidos ao Brasil em 1992. Esta raça originária da França está atualmente bem adaptada às condições de clima e alimentação do sul do Brasil (BRITO *et al.*, 2006). A produção de leite ovino também é uma atividade considerada recente na Argentina, onde foram registrados 56 tambos em atividade em 2002, a maioria na província de Buenos Aires (50%) e em menor parte na Patagônia (38%). A raça leiteira mais utilizada é a Frisona del Este ou seus cruzamentos, o que inclui a raça Pampinta (SUÁREZ & BUSETTI, 2006). A produção de leite ovino em escala comercial iniciou na década de 1960, na Austrália. Estima-se que 45 estabelecimentos de produção de leite ovino tenham iniciado neste período, mas somente 8 estejam em funcionamento atualmente (STUBBS *et al.*, 2009).

Uma fêmea Lacaune pode produzir 4,5 litros de leite/dia no pico da lactação, que ocorre ao redor dos 30 dias pós-parto, durando o período de lactação de aproximadamente 150 dias. Os dados de um estudo realizado com ovelhas da raça Lacaune, no município de Bento Gonçalves/RS, indicaram que a duração média da lactação das ovelhas estudadas foi de 160 dias, com uma produção média de leite de $1,3 \text{ L ovelha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (BRITO *et al.*, 2006). A ovelha Lacaune na França apresentou produção média de $1,6 \text{ L ovelha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, com extensão de lactação por 165 dias (HAENLEIN, 2007). A produção máxima de leite obtida, em um estudo realizado com ovelhas na raça Bergamácia no Brasil, foi de $0,960 \text{ kg dia}^{-1}$ (SÁ *et al.*, 2005).

2.2 Composição do Leite Ovino

A utilização de leite de ovelha pressupõe uma matéria-prima com teor maior de extrato seco, em relação ao leite de vaca, sendo que os teores de proteína, gordura, umidade, cinzas e acidez são parâmetros de qualidade a serem observados (STUBBS *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2007). A composição média do leite de ovelha, segundo diferentes autores, é apresentada na Tabela 1. Estes valores são maiores, em comparação aos leites bovino, caprino e humano, sendo que o leite ovino apresenta ainda valores maiores de

densidade, viscosidade e ponto de congelamento, do que os leites caprino e bovino (PARK *et al.*, 2007).

Tabela 1. Composição média de nutrientes básicos em leite de ovelha descrita por diferentes autores.

Parâmetro	Park <i>et al.</i> (2007) ^a	Brito <i>et al.</i> (2006) ^b	Sá <i>et al.</i> (2005) ^c	Souza <i>et al.</i> (2005) ^d
Proteína (%)	6,2	4,46	4,92	-
Caseína (%)	4,2	-	-	-
Albumina, globulina (%)	1,0	-	-	-
Gordura (%)	7,9	5,79	5,39	3,5
ESD (%)	12,0	10,43	-	-
EST (%)	-	16,25	16,42	-
Lactose (%)	4,9	4,76	4,91	-
Cinzas (%)	0,9	-	-	-
Valor Calórico/100 mL	105	-	-	-
pH	6,51-6,85	6,53	-	6,7
Acidez (°D)	0,22-0,25% em ácido láctico	25,13°D	-	-
Densidade Média (g mL ⁻¹)	1,0347-1,0384	1,036	-	1,036
CCS (células mL ⁻¹)	-	171.750	-	-

^aValores médios de diferentes Raças na Europa; ^bRaça Lacaune, Bento Gonçalves/RS; ^cRaça Bergamácia, Botucatu/SP; ^dRaça Corriedale, Bagé/RS; ESD: Extrato Seco Desengordurado; EST: Extrato Seco Total; CCS: Contagem de Células Somáticas.

A composição de ácidos graxos no leite de ovelha demonstra que em torno de 28% destes são insaturados e que o conteúdo de colesterol é próximo a 290mg/100g de gordura láctea (PARK *et al.*, 2007). Os leites de ovelha e de cabra possuem grandes quantidades de triglicerídeos de cadeia média, compostos por ácidos graxos com 6 a 8 carbonos na cadeia. Os principais são o capríco (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0) (SANZ SAMPELAYO *et al.*, 2007). O teor de gordura está relacionado com o rendimento do queijo e sua textura, em geral com pasta mole naqueles que tiverem maiores concentrações de gordura (MORAND-FEHR *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Leitner *et*

al. (2004), os valores de composição de nutrientes em leite de ovelha de animais com mastite foram todos menores, em relação aos animais não infectados.

O maior teor de extrato seco no leite de ovelha, em comparação ao leite de vaca, tem reflexo no rendimento de queijo (STUBBS *et al.*, 2009; CAVALLI *et al.*, 2008). Aproximadamente 5,5 L de leite de ovelha são necessários para produzir 1 kg de queijo, enquanto 11 L de leite de vaca são requeridos para produzir a mesma quantidade de queijo (CAVALLI *et al.*, 2008).

O teor de caseína no leite é importante para a formação do coágulo, já que atua como emulsificante do leite e sua estabilidade é afetada durante o processo de coagulação. A presença desta proteína está intimamente relacionada com o rendimento do leite para produção de queijo. A coagulação enzimática depende do teor de cálcio presente no leite, imprescindível para que ocorra a agregação de toda a caseína e, posteriormente, a uniformidade do queijo (PARK, 2007). As proteínas que permanecem em solução a pH 4,6 são chamadas proteínas do soro lácteo ou proteínas do soro de queijo. Estão compostas por β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas e peptídeos de baixo peso molecular procedentes da proteólise das caseínas (WONG *et al.*, 1996).

O teor elevado de lactose favorece o crescimento microbiano, principalmente por estar presente no soro que fica retido na massa, interferindo na maturação dos queijos. A concentração alta de umidade no leite diminuirá seu rendimento e elevará a atividade de água, favorecendo a contaminação e as reações de degradação (PARK, 2007).

Alterações nos valores de pH e de acidez da matéria-prima poderão afetar o processo de coagulação e também a capacidade de retenção de água da massa, afetando o processo de dessoramento e o tamanho dos grânulos de coágulo formados, com interferência direta sobre a textura e crescimento microbiano no queijo (PARK, 2007).

O leite de ovelha possui propriedades benéficas à saúde, devido aos níveis de vitamina e minerais em sua composição (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*,

2007a). Os principais cátions em leite são cálcio, magnésio, sódio e potássio e os principais ânions são fosfato inorgânico, citrato e cloreto. Estes íons podem estar mais ou menos associados entre eles e com as proteínas (GAUCHERON, 2005). Os valores de cálcio e fosfato inorgânico apresentam variações entre os leites ovino e caprino. O leite de cabra contém aproximadamente 1200 mg/kg de cálcio e 900 mg/kg de fosfato (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a), ambos os valores inferiores aos observados em leite de ovelha (Tabela 2).

Tabela 2. Composição mineral em leite de ovelha.

Mineral	Teor (kg ⁻¹)
Cálcio (mg)	1950-2000
Fósforo (mg)	1240-1580
Potássio (mg)	1360-1400
Sódio (mg)	440-580
Cloretos (mg)	1100-1120
Magnésio (mg)	180-210
Relação Ca/P (mg)	1,3-1,6
Zinco (µg)	5200-7470
Ferro (µg)	720-1222
Cobre (µg)	400-680
Manganês (µg)	53-90
Iodo (µg)	104
Selênio (µg)	31

(RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008).

O leite possui proteinases endógenas e a proteólise pode ocorrer no próprio leite (plasmina e catepsina D) (PEREIRA *et al.*, 2008; RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2001). A principal proteinase é a

plasmina, que está associada às micelas de caseína, e atua principalmente sobre a β -caseína. A hidrólise da gordura láctea por lipases bacterianas pode representar um problema para a indústria láctea, quando sua implicação é o sabor ranço no leite (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007).

2.2.1 Caseínas e Caseínatos

As caseínas são uma família de fosfoproteínas sintetizadas pelas glândulas mamárias e secretadas como agregados coloidais grandes chamados micelas (MC), que são responsáveis por muitas das propriedades únicas deste alimento e os principais compostos protéicos do leite (PITKOWSKI *et al.*, 2008; GINGER & GRIGOR, 1999), representando em torno de 80% do total das proteínas lácteas (FOX & BRODKORB, 2008; BRAGA *et al.*, 2006; WEST, 1986).

No leite, quase todas as caseínas (CN) presentes encontram-se formando parte de micelas mais ou menos esféricas, que compreendem de 20 a 150.000 moléculas de CN (peso molecular médio de $2,5 \times 10^8 \text{ g mol}^{-1}$) (PITKOWSKI *et al.*, 2008; MCGANN *et al.*, 1980). As MC possuem um alto conteúdo de material inorgânico (7g/100g CN) formado principalmente por íons cálcio e fosfato e estão altamente hidratadas (3,7g $\text{H}_2\text{O/g}$ CN), porém somente uma pequena parte desta água está unida às caseínas (0,5g $\text{H}_2\text{O/g}$ CN), o restante está encerrado dentro da micela (ALVAREZ *et al.*, 2007; KOROLCZUK, 1981). Este grau de hidratação das MC faz com seu diâmetro médio varie de 80 a 680 nm (RISSO *et al.*, 2007). A estrutura da micela de caseína é similar em leite de ovelha, de cabra e de vaca, mas difere na composição, tamanho e hidratação (PARK, 2007).

As caseínas incluem quatro tipos de cadeias polipeptídicas principais chamadas α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN e κ -CN (Tabela 3), além de alguns derivados formados por proteólise destas moléculas (ALVAREZ *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2006; WEST, 1986). Os quatro principais tipos de caseínas estão presentes no leite bovino em uma proporção de massa de cerca de 4:1:4:1,3 ($\alpha_{S1}:\alpha_{S2}:\beta:\kappa$) (BRAGA *et al.*, 2006). Nenhum dos quatro tipos de caseínas

possui uma estrutura secundária muito organizada, somente α -hélice e folhas β de comprimento curto. Os grupos ionizáveis são acessíveis à titulação e outras cadeias laterais são acessíveis à reação. Nem a reatividade de tais grupos, nem a rotação ótica, aumentam em presença de agentes desnaturizantes ou sob o efeito do aquecimento. Portanto, a conformação das caseínas é muito semelhante à das proteínas globulares desnaturizadas. O grande número e a distribuição uniforme dos resíduos de prolina ajudam a evitar uma conformação secundária empacotada e ordenada (RISSO, 2004).

As principais cadeias de caseínas são as mesmas no leite ovino, caprino e bovino, sendo que o leite caprino possui menos proteínas e caseínas que o leite ovino. Comparando com as caseínas ovinas, as caseínas caprinas contêm menos α_S (α_{S1} e α_{S2}) e mais β e κ -CN. O leite caprino também possui maior proporção de nitrogênio não protéico, em relação ao ovino (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a). Uma avaliação realizada por Moatsou *et al.* (2004), avaliou as diferenças entre as caseínas de leite de ovelha em raças gregas e observou a existência de uma variabilidade quantitativa, especialmente com respeito aos grupos α_S - e β -CN. As caseínas de leite da raça Karagouniko apresentaram os maiores conteúdos de β -CN e as menores proporções entre α_S - e β -CN, enquanto as raças Frisarta e Chios apresentaram porcentagens similares das caseínas individuais (MOATSOU *et al.*, 2004).

Todas as cadeias de caseínas têm em comum a presença de, ao menos, um grupo fosfato por molécula, esterificado a resíduos de serina e ocasionalmente a treonina (ligação éster-fosfato), característica que nenhuma das proteínas do soro possui (WEST, 1986). A presença de resíduos de cisteína na seqüência das cadeias de caseína é considerada um tanto rara, exceto para α_{S2} e κ -CN (Tabela 3). Os resíduos cisteína estão envolvidos na formação de pontes dissulfeto entre moléculas, relacionadas com o desenvolvimento de agregados de micelas de caseína (BOUGUYON *et al.*, 2006).

Tabela 3. Comparação de características estruturais das quatro caseínas em leite ovino e bovino.

Caseínas	Ovina			Bovina		
	Aminoácidos ^a	Cisteína ^b	Sítios P ^c	Aminoácidos ^a	Cisteína ^b	Sítios P ^c
α_{s1} -CN	199	-	10 / 10	199	-	9 / 9
α_{s2} -CN	208	37, 41	17 / 13	207	36, 40	17 / n.d.
β -CN	207	-	6 / 6	209	-	6 / 5
κ -CN	171	10, 11, 88	5 / 3	169	11, 88	5 / 3

^aNúmero de resíduos aminoacídicos da cadeia madura da proteína; ^aNúmero de resíduos de cisteína em caseínas; ^cNúmero de sítios de fosforilação (suposto / confirmado); n.d.: não determinado. (BOUGUYON *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2007).

As caseínas (CN) no leite apresentam-se na forma de complexos polidispersos contendo caseína e fosfato de cálcio coloidal (FCC). O complexo da caseína nativa é dissociado após remoção do FCC, produzindo uma mistura de caseínas individuais (PITKOWSKI *et al.*, 2008). O cálcio coloidal em leite pode ser definido como uma mistura de caseinato de cálcio (contendo fosfato orgânico) e fosfato de cálcio (que é um fosfato inorgânico). Contudo, experimentalmente, estes dois tipos de cálcio coloidal não são separáveis e torna-se difícil calcular as quantidades de cada um isoladamente (GAUCHERON, 2005).

As moléculas de caseína apresentam sensibilidade ao Ca^{2+} , sendo a capacidade de união a este cátion um processo reversível. Esta capacidade cresce com o aumento do pH e a diminuição da força iônica, com afinidade na seguinte ordem: α_{s1} -CN > β -CN > κ -CN. Devido a estas diferenças na capacidade de ligação ao Ca^{2+} das diferentes caseínas, a κ -CN tem um poder maior de estabilização frente à precipitação por este cátion, em relação à α_{s1} e à β -CN. Este poder é perdido após a ação da quimosina sobre a κ -CN (DICKINSON & STAINSBY, 1982; WALSTRA & JENNESS, 1984). As caseínas do leite ovino são mais ricas em cálcio que as do leite de vaca. O leite ovino é muito sensível à coagulação, devido à maior proporção β/α_s -CN, e o processo de coagulação é mais rápido que no leite bovino (PARK, 2007).

As caseínas possuem uma pronunciada tendência em associar-se e, geralmente, tendem à auto-associação nas condições de pH e de força iônica do leite (FARREL *et al.*, 2002). Os complexos são formados tanto em presença, quanto em ausência de cálcio, originando complexos com ampla variedade de tamanho. A associação das caseínas em presença de Ca^{2+} é muito mais importante, devido a sua aplicação ao sistema lácteo (FARREL *et al.*, 2002; MORA-GUTIERREZ *et al.*, 1993a; FARREL *et al.*, 1988). A κ -CN forma complexos estáveis, em presença de cálcio, tanto com a α -CN, como com a β -CN (FARREL *et al.*, 1993).

As caseínas precipitam a pH 4,6 e o FCC pode ser eliminado após esta precipitação em seu ponto isoelétrico e posterior lavagem (PITKOWSKI *et al.*, 2008). A caseína comercial, produzida por meio da precipitação ácida, é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica em alimentos (SABADINI *et al.*, 2006; ROMAN & SGARBIERI, 2005). Os métodos tradicionais de fabricação de caseína promovem alterações químicas irreversíveis na estrutura da micela, por meio da acidificação ou modificação enzimática, a fim de facilitar a separação das proteínas coaguladas dos constituintes do soro (ROMAN & SGARBIERI, 2005). São utilizados procedimentos adicionais de centrifugação a baixas temperaturas e lavagem com solventes para garantir a remoção da gordura láctea residual (FERREIRA *et al.*, 2006). Os caseinatos podem ser preparados por subsequente elevação do pH e dissolução das caseínas precipitadas. São chamados caseinato de sódio ou caseinato de cálcio, dependendo da solução utilizada na neutralização: hidróxido de sódio ou de cálcio, respectivamente (ALVAREZ *et al.*, 2008; PITKOWSKI *et al.*, 2008; SABADINI *et al.*, 2006).

Caseínas e caseinatos são extensivamente usados na indústria alimentícia devido a suas propriedades físico-químicas, nutricionais e funcionais (PITKOWSKI *et al.*, 2008; ALVAREZ *et al.*, 2007; RUIS *et al.*, 2007; BRAGA *et al.*, 2006), sendo ingredientes utilizados na formulação de produtos cárneos, produtos lácteos, produtos de panificação, chocolates e confeitos, coberturas comestíveis, bebidas lácteas e achocolatados, salgadinhos e snacks, filmes comestíveis e impermeabilizantes (ROMAN & SGARBIERI,

2005). O caseinato de cálcio não é tão utilizado quanto o de sódio, devido a sua limitada solubilidade (PITKOWSKI *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Propriedades e Estabilidade de Caseínas e Caseinatos

As propriedades coloidais das MC são em grande parte responsáveis pela estabilidade dos produtos lácteos durante o aquecimento, concentração e armazenamento, bem como por seu comportamento em várias fases da fabricação de queijos e iogurtes, e pelas propriedades reológicas dos derivados lácteos ácidos e concentrados. Além disso, as MC interagem com as interfaces ar-água e óleo-água. Esta última interação é especialmente importante, pois afeta propriedades como estabilidade e viscosidade dos produtos homogeneizados (WALSTRA & JENNESS, 1984).

As MC são notavelmente estáveis, já que suportam altas velocidades de centrifugação, altas temperaturas e possuem facilidade para re-dispersar após a desidratação do leite em pó ou grânulos (RISSO, 2004).

As propriedades de gelificação e o comportamento característico das caseínas são as bases da elaboração de queijos (BRAGA *et al.*, 2006; RISSO, 2004). Na Tabela 4, são apresentadas algumas propriedades das diferentes CN consideradas mais relevantes para este processo.

Tabela 4. Propriedades das caseínas importantes na fabricação de queijos.

Caseína	Porcentagem ^a	Propriedades
α_{s1} -CN	33	-Fixa fortemente o Ca^{2+} -Suscetível de ser descomposta pelo coalho durante a maturação -Resiste à protease natural do leite, a plasmina
α_{s2} -CN	11	-Fixa fortemente o Ca^{2+}
β -CN	33	-Parcialmente solúvel em leite -É atacada por plasmina, mas não pelo coalho
κ -CN	11	-Estabiliza as partículas de CN, evitando a coagulação -Une-se às proteínas do soro durante o aquecimento -É atacada pelo coalho

^aPorcentagem em relação ao total de caseínas, em leite bovino (RISSO, 2004).

As caseínas possuem atividade superficial de acordo com seu maior ou menor caráter anfifílico. Apresentam boa absorção em interfaces ar/água ou água/óleo, com ação tensoativa (diminuição da tensão interfacial). Contribui para esta ação, o fato de suas cadeias polipeptídicas serem relativamente curtas, o que diminui sua facilidade para dispersar em interfaces. A β -CN em interfaces encontra-se muito dispersa e estendida, devido a sua maior flexibilidade e caráter anfifílico, tornando-a melhor agente emulsificante e espumante. Por outro lado, a κ -CN tem a possibilidade de formar pontes dissulfeto, apresentando uma estrutura mais resistente à dispersão, com possibilidade de agregar-se na interface, aumentando a viscosidade superficial (estabilizante em emulsões e espumas) (RISSO, 2004).

2.2.1.2 Agregação, Gelificação e Hidrólise de Caseínas e Caseinatos

As modificações estruturais nas MC estão intimamente relacionadas com sua estabilidade coloidal e, portanto, aos processos envolvidos com esta estabilidade. As MC bovina são consideradas bastante estáveis (RISSO, 2004), mas devido às diferenças na composição bioquímica (mineralização, hidratação, interações protéicas), o leite de pequenos ruminantes apresenta estabilidade coloidal baixa (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a). Independentemente da estabilidade coloidal de cada tipo de leite, existem diversas formas de induzir a agregação das MC, entre as mais importantes estão:

- Quimosina ou outras enzimas proteolíticas: a quimosina contida no coalho bovino é a enzima utilizada com mais frequência. As proteinases gástricas obtidas de cabritos e cordeiros foram tradicionalmente utilizadas na produção de queijos, sendo ainda usadas para alguns tipos de queijos da Itália, França e Espanha (TRUJILLO *et al.*, 2000). As flores do cardo (*Asteraceae*) são uma fonte rica de peptidases, sendo bastante utilizadas na manufatura de queijos tradicionais da Península Ibérica (CAVALLI *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2001). A coagulação enzimática, fase fundamental na fabricação do queijo, é o resultado da desestabilização das MC pelo desprendimento da porção hidrofílica da

κ -CN, catalisada pela quimosina, conhecida como a primeira etapa da hidrólise (RISSO *et al.*, 2007; GATTI *et al.*, 1996). A clivagem catalisada pela quimosina ocorre na ligação peptídica Phe(105)-Met(106) da κ -CN e, como dito anteriormente, a porção hidrofílica da proteína é removida da superfície da micela e ocorre sua desestabilização (PEREIRA *et al.*, 2008; RISSO *et al.*, 2007; VASBINDER *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2001). Em seguida, é produzida a segunda etapa de agregação espontânea das MC parcialmente proteolisadas, na qual participam diferentes tipos de interação: forças de Van der Waals, pontes salinas, interações hidrofóbicas e pontes de fosfato de cálcio coloidal (WALSTRA & VLIET, 1986). Assim que todas as MC tenham floculado, forma-se um gel tridimensional que termina na formação de um coágulo que sofre retração, expulsando líquido, na última etapa conhecida como sinerese (RISSO, 2004);

- Ácidos: desestabilizam as micelas por diminuição da carga elétrica até alcançar o ponto isoelétrico. Ao mesmo tempo, a acidez do meio aumenta a solubilidade dos minerais de forma que o cálcio e o fosfato micelares gradualmente solubilizam-se na fase aquosa (RISSO, 2004). As MC desintegradas e as CN precipitam e a agregação ocorre como resultado de interações hidrofóbicas (RISSO *et al.*, 2007; RISSO, 2004).

A velocidade de floculação é afetada por vários fatores, alguns dos mais estudados são: a fração de κ -CN que se divide, a temperatura, a atividade do Ca^{2+} , o fosfato de cálcio coloidal e o pH. O leite que possui maior proporção de κ -CN coagula mais lentamente, entretanto, como o conteúdo desta CN e o tamanho micelar estão relacionados, é difícil estabelecer a causa primária disto. A energia de ativação aumenta muito ao diminuir a temperatura. Além disso, a temperatura aumenta a repulsão causada por cadeias sobressalentes de β -CN e diminui a atração de van der Waals. A atividade do Ca^{2+} está relacionada com a velocidade, já que a floculação ocorre em conteúdos de cálcio de 1,5-2,0 mM ou maiores. Quanto menor é o conteúdo de fosfato de cálcio micelar, maior é a atividade do Ca^{2+} necessário para causar a

agregação. Já o pH afeta a atividade do Ca^{2+} e a quantidade de fosfato de cálcio micelar (RISSO, 2004).

A coagulação ácida das caseínas promove uma interação proteína-proteína, muito importante na fabricação de produtos lácteos. Dois importantes processos de acidificação poderiam ser distinguidos, sendo um por culturas bacterianas e o outro por reagentes químicos, tais como glucono- δ -lactona (GDL) (BRAGA & CUNHA, 2004). No processo tradicional, o leite é acidificado por bactérias, as quais fermentam a lactose a ácido láctico. O segundo processo que tem ganhado espaço na indústria alimentícia é a acidificação direta. A adição de GDL, por exemplo, evita algumas dificuldades associadas ao uso de bactérias iniciadoras, tais como atividade variável e alteração com o tipo de cultura utilizada. GDL é um éster que hidrolisa espontaneamente para formar ácido glucônico e, durante a gelificação com GDL, o pH final do sistema é uma função da quantidade adicionada deste composto, enquanto as bactérias iniciadoras produzem ácido até que sejam inibidas pela diminuição de pH (BRAGA *et al.*, 2006).

A gelificação ácida das proteínas lácteas é importante durante o processamento de produtos, tais como sobremesas similares ao iogurte (PUGNALONI *et al.*, 2005). A estrutura de gel é formada durante a acidificação do leite/caseinato como resultado da dissociação e agregação das frações de caseína (moléculas, submicelas ou micelas) (BRAGA *et al.*, 2006), ao aproximar-se ao ponto isoelétrico destas moléculas (DICKINSON & MATIA-MERINO, 2002). Os géis ácidos de caseína podem ser formados por uma variedade de partículas primárias, variando desde moléculas de proteína isoladas ou oligômeros de proteína (nanopartículas de caseinato), até partículas de caseína micelares nativas ou gotículas de emulsões estabilizadas por caseína (PUGNALONI *et al.*, 2005). Durante a acidificação, as gotículas de óleo recobertas e as caseínas que as estabilizam permanecem juntas, levando à formação de uma estrutura de rede particulada, que pode ser caracterizada por suas propriedades reológicas (DICKINSON & MATIA-MERINO, 2002).

As condições do processamento, como o tratamento térmico e as forças mecânicas (pressão e cisalhamento), têm influência sobre a estabilidade e podem provocar a separação de fases em géis (BRYANT & MCCLEMENTS, 2000). A rede do gel de caseína pode apresentar sinerese, em função da contração do gel, mesmo sem a aplicação de uma força externa (BRAGA & CUNHA, 2005). A capacidade de retenção de água foi avaliada em um estudo com géis de caseinato e com acidificação por GDL. A relação GDL/caseinato utilizada teve um efeito significativo sobre as propriedades de firmeza do gel, sendo que a acidificação lenta produziu uma rede mais interconectada e firme, provavelmente devido ao extensivo rearranjo ou à reorganização dentro dos segmentos durante este processo (BRAGA *et al.*, 2006).

O leite de pequenos ruminantes possui menor estabilidade coloidal, o que leva a um menor tempo de coagulação e a um menor impacto do tratamento térmico sobre este parâmetro, ocasionando ainda uma estabilidade reduzida sobre tratamentos térmicos extremos, em comparação ao leite bovino (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a). A coagulação lenta durante a produção de queijo poderá acarretar problemas na retenção de soro pela massa, afetando diretamente sua atividade de água e conseqüentemente as reações químicas e enzimáticas durante a maturação. Além disso, acarretarão produtos mais ou menos úmidos do que os esperados, e possíveis deformações no interior e na casca (PARK, 2007).

A reologia representa as propriedades de ambos os alimentos sólidos e líquidos, onde a textura é a reologia relacionada a alimentos sólidos e a viscosidade é a reologia de alimentos fluidos (PARK, 2007). A reologia é uma ferramenta poderosa para analisar as diferentes etapas envolvidas na coagulação do leite e formação do gel, e para avaliar a textura do produto final (PARK, 2007; BRAGA *et al.*, 2006). As propriedades mecânicas, tais como estresse e tensão à fratura, podem fornecer informações sobre a textura do alimento (BRAGA *et al.*, 2006; BRAGA & CUNHA, 2004), sendo que autores propõe a utilização de métodos reológicos para avaliar os elementos mecânicos de textura de produtos alimentícios, como nos lácteos (BRAGA *et al.*, 2006). A caseína é uma das proteínas importantes para a constituição da

estrutura e para as propriedades macroscópicas de produtos alimentícios, através da formação de espumas, emulsões ou géis. O estudo da morfologia, características físico-químicas e interações entre grupos de proteínas são relevantes para o desenvolvimento de materiais para uso alimentício (RISSO *et al.*, 2007).

Os géis de caseínas são os principais responsáveis pelas propriedades reológicas do queijo e de outros produtos lácteos, independentemente da espécie animal que produziu o leite. Em leite fluido normal, a viscosidade é afetada pelo estado e concentrações da gordura e proteína, temperatura, pH e vida de prateleira do leite (PARK, 2007). Os leites de ovelha e de cabra possuem as mesmas proteínas que o leite de vaca, mas suas proporções e polimorfismos genéticos diferem amplamente, o que explica as diferenças na coagulação e as variações reológicas consideráveis na produção de queijo (PARK., 2007). As diferentes estruturas coloidais formadas pelas caseínas levam às diferenças nas características do produto, sendo que estas variações podem ser conduzidas por alterações nas condições de processamento, como a temperatura aplicada durante a formação do gel (RUIS *et al.*, 2007).

Os fatores mais importantes sobre a formação da estrutura da coalhada ácida são conteúdo de caseína, pH e conteúdo de cálcio no leite. Em pH baixo, o cálcio é progressivamente dissociado da micela de caseína. Somando-se a isto, a neutralização das cargas negativas da caseína favorece sua ampla agregação e a fusão das micelas, que tendem a formar um gel. Em pH 4,6, a rede de caseína é formada e os demais componentes são retidos em seu interior (FOX & BRODKORB, 2008; PARK, 2007). Os tempos de coagulação de queijos produzidos com leite de ovelha são menores em pH mais baixo. A interferência deste parâmetro sobre a textura do queijo é particularmente importante, devido às mudanças no pH estarem diretamente relacionadas com as mudanças na rede protéica presente na coalhada (PARK, 2007).

A influência de outros parâmetros, como atividade de água e conteúdo de sal, sobre as propriedades reológicas do queijo é indireta. Altos níveis de sal aumentam a pressão osmótica, que retira quantidades significativas de água

ligada à estrutura da caseína. Por outro lado, uma atividade de água menor resultaria em atividade proteolítica reduzida no queijo durante a maturação (PARK, 2007).

Uma grande variedade de alimentos contém caseinatos e açúcares de baixo peso molecular, como sorvetes, iogurtes, caramelos, licores cremosos e leite achocolatado. As interações entre estes componentes são de fundamental importância para a funcionalidade da proteína, bem como para a reologia, estabilidade e estrutura geral dos produtos (PUGNALONI *et al.*, 2005; BELYAKOVA *et al.*, 2003). A sacarose, em particular, causa várias alterações nas propriedades funcionais da caseína como: um aumento na solubilidade do caseinato de sódio, em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína; um aumento na atividade superficial de caseinato de sódio na interface ar/água; um aumento substancial na capacidade do caseinato de sódio em formar gel (BELYAKOVA *et al.*, 2003). Através de estudos, tem sido revelada a existência de uma aparente relação entre os efeitos da sacarose sobre a auto-associação do caseinato de sódio e um marcado aumento da viscoelasticidade de géis de caseína formados por acidificação (BRAGA & CUNHA, 2005; BRAGA & CUNHA, 2004; BELYAKOVA *et al.*, 2003).

A extensão da associação protéica, em presença de sacarose, é um fator chave e contribui para o balanço hidrofílico/hidrofóbico da superfície da proteína. Portanto, a afinidade das submicelas de caseinato com o meio aquoso é favorecida, observando-se a dissociação destas submicelas e uma microestrutura mais homogênea dos géis protéicos na presença de sacarose (BELYAKOVA *et al.*, 2003). A adição de açúcar acarretou a diminuição do tempo de gelificação e aumentou substancialmente o módulo elástico de géis emulsificados e géis protéicos, com caseinato, especialmente em altas relações açúcar/proteína (DICKINSON & MATIA-MERINO, 2002). A avaliação da microestrutura de géis de caseinato demonstrou que estes apresentam uma rede mais firme com o aumento do conteúdo de sacarose em sua composição. Em altas concentrações do açúcar, nenhum rearranjo significativo na rede parece acontecer após o gel ter sido formado, mesmo com o progresso da acidificação. O mesmo não havia sido observado em ausência de sacarose,

onde a rede de nanopartículas de caseinato apresentou grandes poros e com tendência ao rearranjo, à medida que o pH foi reduzido a valores abaixo do pI (PUGNALONI *et al.*, 2005). As alterações reológicas e microestruturais combinadas, observadas nos géis com caseinato e sacarose, podem ser explicadas pela dissociação dos agregados de caseinato em valores de $pH > pI$, e por uma intensificação da resistência das interações caseína-caseína sob influência da sacarose (PUGNALONI *et al.*, 2005).

A proteólise é um evento bioquímico importante, que proporciona impacto sobre o sabor e a textura da maioria dos tipos de queijo e de outros produtos lácteos (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a; SOUSA *et al.*, 2001). A proteólise é causada por agentes provenientes de diferentes fontes: coagulante residual (normalmente quimosina); enzimas lácteas endógenas, provenientes de microbiota iniciadora, não iniciadora ou, em alguns tipos de queijos, secundária (ex.: *Penicillium sp.* ou *Propionibacterium*) (SOUSA *et al.*, 2001).

A proteólise contribui para: alterações na textura do queijo, devido ao rompimento da rede protéica; diminuição da a_w através da ligação da água por liberação de grupos carboxil e amino; aumento no pH, particularmente na superfície de queijos maturados por bolores, o que facilita a liberação de compostos sápidos durante a mastigação. Isso contribui diretamente para o sabor desejado ou indesejado (ex.: amargor) no queijo, através da formação de peptídeos e aminoácidos livres. Ocorre ainda, a liberação de substratos para reações catabólicas secundárias, tais como transaminação, desaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações dos aminoácidos com outros compostos (SOUSA *et al.*, 2001).

A hidrólise enzimática das proteínas é freqüentemente utilizada para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais de proteínas alimentícias. O uso de pressão hidrostática durante o processo pode alterar a proteólise e levar a diferentes peptídeos, que podem ter redução no sabor amargo, melhorar as propriedades emulsificantes, ou causar menos reações alérgicas. Em geral, pressão combinada à proteólise pode ser uma ferramenta útil, quando porções hidrofóbicas da proteína necessitam ser acessadas (BRUINS *et al.*, 2009).

2.3 Produção de Leite Ovino

2.3.1 Fatores Relacionados à Produção de Leite

A espécie, a raça do animal, o melhoramento do rebanho e o sistema de produção empregado interferem diretamente sobre a composição físico-química do leite e em sua contaminação microbiológica (STUBBS *et al.*, 2009; RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008; LEUTHIER *et al.*, 2003; MENDIA *et al.*, 2000). Alguns fatores derivam diretamente do animal, como a idade, o momento da lactância, o número de partos e de cordeiros gerados, e outros podem ser controlados como a tosquia e o uso de antibióticos (BUSETTI, 2006; MENDIA *et al.*, 2000). A escolha dos animais e o manejo destes devem ser acompanhados por especialistas, para garantir um rebanho saudável, um leite de qualidade e a obtenção do queijo desejado (LEUTHIER *et al.*, 2003). No caso de queijos com Denominação de Origem Protegida, deve ser considerada ainda a localização geográfica (FREITAS & MALCATA, 2000).

A ração utilizada deve conter os nutrientes necessários ao bom desenvolvimento do animal e para que a produtividade não seja comprometida; contribuir para teores adequados de proteína, gordura e cálcio no leite; não ser fonte de resíduos de pesticidas e micotoxinas, que poderão ser contaminantes do leite (MORAND-FEHR *et al.*, 2007). A avaliação de composição das dietas de ovelhas e cabras observou que uma alimentação rica em fibras resulta em leite com altos teores de lipídios. Os leites apresentaram-se ricos em ácidos graxos, vitaminas e compostos voláteis, como terpenos e outros relacionados com sabor e aroma. As rações ricas em silagem de milho e rações com baixa relação entre forragem e suplementos concentrados levaram à redução da qualidade do leite e do queijo, resultando em baixos conteúdos de gordura, pasta granular e baixa uniformidade no queijo (MORAND-FEHR *et al.*, 2007).

Outros cuidados importantes são evitar mastites e observar as variações sazonais para evitar perdas no produto final (JAEGGI *et al.*, 2003). A saúde do animal em geral e da glândula mamária afetam a quantidade e a qualidade do leite produzido (BUSETTI, 2006), sendo que a infecção intramamária em

ovelhas, mesmo restrita a níveis subclínicos, afeta negativamente a produção de leite (LEITNER *et al.*, 2004).

A contagem de células somáticas (CCS) é utilizada como indicativo da saúde do rebanho e dos animais individualmente (ANDRADE *et al.*, 2001; JAEGGI *et al.*, 2003), compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação. Somente 10% das mesmas correspondem a células da glândula mamária, enquanto os 90% restantes são células do sangue, como macrófagos, linfócitos e neutrófilos. São células que normalmente contribuem às defesas imunológicas da glândula mamária, porém seu número aumenta consideravelmente na mastite (BUSETTI, 2006).

Um estudo com ovelhas da raça Israeli-Assaf observou que a produção de leite, nos animais com úbere infectado por *Staphylococcus* coagulase-negativa, foi significativamente diminuída em relação aos animais não infectados. Os valores observados foram de 0,36 kg/ordenha e 0,76 kg/ordenha, respectivamente (LEITNER *et al.*, 2004). Contagens de células somáticas superiores a 1.600.000 células / mL reduziram em 21% a produção de leite por cabras. Nestes animais, observou-se aumento na CCS do meio para o final da lactação (ANDRADE *et al.*, 2001). Yamaki *et al.* (2004) verificaram que 65% das amostras de leite de ovelha analisadas apresentaram contagens entre $0,5 \times 10^6$ e $1,5 \times 10^6$ células/mL.

2.3.2 Parâmetros Microbiológicos em Leite de Ovelha

A sanidade do leite é muito importante, pois garante a segurança do consumidor e as características adequadas ao produto. Sabe-se que a microbiota do leite é necessária para a produção de queijos tradicionais, por isso a opção por utilizar leite cru. Porém, a contaminação elevada da matéria-prima, por microrganismos indesejados, afeta sua composição e influencia o crescimento das bactérias desejadas no processo de maturação dos queijos, já que haverá competição pelos nutrientes, alterando atributos de qualidade do produto (cor e textura alteradas, odores estranhos, sabor desagradável, alteração da composição nutricional, produção de gás). Existem ainda dados relacionados à proteólise intensa no queijo, podendo inclusive ser devido à

presença excessiva das próprias bactérias lácticas (PEREIRA *et al.*, 2008; RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007b).

Os microrganismos patogênicos contaminantes do leite cru podem ter origem fecal ou por excreção direta através do úbere (MUEHLHERR *et al.*, 2003; JAY, 2000). Considerando que o leite não pasteurizado de ovelha e de cabra é utilizado na produção de queijos e que crianças com intolerância ao leite de vaca são consumidores destes produtos, a possibilidade de contaminação torna-se ainda mais preocupante (MUEHLHERR *et al.*, 2003).

O leite cru mantido em temperaturas de refrigeração mostra a presença de várias bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, bem como os que fazem parte do grupo coliforme. Estudos revelaram a presença de psicrotróficos formadores de esporos e micobactérias em leite cru, como *Bacillus* spp. e *Clostridium* psicrotróficos (JAY, 2000). A proteólise pode ser atribuída às bactérias psicrotróficas, sendo que estes microrganismos são a microbiota dominante durante o armazenamento de leite resfriado, transporte e estocagem. A bactéria mais conhecida por causar a proteólise em temperaturas de refrigeração é a *Pseudomonas* (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007).

Um estudo avaliou fazendas produtoras de leite de ovelha, na França. Foram coletadas amostras de queijos produzidos artesanalmente, de leite nos tanques de armazenamento, de leite de animais com lesão no úbere, de abscessos destes animais, de mãos e fossas nasais dos fazendeiros, e do ar na área de ordenha. Dentre as amostras de leite, 5,5% foram positivas para *Staphylococcus aureus*. Em sete fazendas foi isolado *S. aureus* do ar durante a ordenha, e em oito delas a partir das fossas nasais dos fazendeiros (VAUTOR *et al.*, 2003).

Um estudo realizado na Suíça avaliou a qualidade de leites crus de ovelha e de cabra. Não foram observadas diferenças significativas nas contagens totais de mesófilos e dos grupos de coliformes totais e fecais, entre

as amostras de leite de ovelha e de cabra. A avaliação utilizou os parâmetros fixados pela Comunidade Européia (*Council Directive 92/46/EEC*) e observou-se que 81% das amostras de leite de ovelha analisadas apresentaram valores inferiores ao limite permitido para contagem total de mesófilos (5×10^5 UFC/mL) em leite que não será submetido ao tratamento térmico. Os demais resultados observados em leite de ovelha foram: detecção de *Enterobacteriaceae* em 71,4% das amostras; *Staphylococcus aureus* em 33,3%; *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. não foram isoladas em nenhuma das amostras; toxina Shiga produzida por *Escherichia coli* (STEC) foi detectada, por PCR, em 12,7%; teste presuntivo para *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), realizado por PCR, evidenciou presença em 23,8% das amostras de leite de ovelha. Segundo os autores, estes resultados evidenciaram a necessidade de profissionais para gerenciamento da qualidade e da higiene nas propriedades e auxiliarão no desenvolvimento de padrões de qualidade próprios para a Suíça (MUEHLHERR *et al.*, 2003).

Os resultados mais preocupantes obtidos neste estudo com leite na Suíça são para STEC, em função de a dose infectiva mínima ser muito baixa, e para MAP, já que causa doença crônica intestinal nos animais e há relatos de que sobrevive ao processo de pasteurização (MUEHLHERR *et al.*, 2003). Um grande número de sorogrupos de STEC (O26, O91, O103, O111, O118, O145, O157 e O166) tem causado os principais surtos e casos esporádicos de doenças em humanos, desde diarreias leves até síndrome urêmica hemolítica. Na maioria dos casos, infecções por STEC foram atribuídas ao consumo de produtos lácteos ou carne moída contaminados. Portanto, o gado leiteiro pode ser considerado um risco significativo à saúde humana (HUSSEIN & SAKUMA, 2005). O *Staphylococcus aureus* foi encontrado na pele e nas mucosas das ovelhas e em queijos produzidos com leite cru contaminado. Uma população inicial de 10^3 UFC/mL no leite pode ser suficiente para a produção de enterotoxina A em queijos, em níveis detectáveis (ARQUÉS *et al.*, 2005).

A presença de resíduos de antibióticos pode desencadear reações alérgicas em consumidores suscetíveis, além de inibir o crescimento das bactérias lácticas necessárias para o processo de maturação do queijo. A

presença de outros resíduos químicos, utilizados como conservantes, sanitizantes ou presentes nas rações, pode apresentar efeitos inibitórios para a microbiota favorável à maturação do queijo. Após o tratamento com antibióticos, devem ser observados os períodos de não utilização do leite, para evitar a presença destas substâncias no leite, o que afetaria a microbiota do leite e inibiria a presença das bactérias lácticas durante a maturação do queijo (YAMAKI *et al.*, 2004).

2.3.3 Parâmetros Físico-Químicos em Leite de Ovelha

Os parâmetros de qualidade avaliados em leite estão vinculados às exigências da legislação vigente. Considerando-se os parâmetros de qualidade do leite cru, estão incluídos matéria gorda, densidade relativa a 15°C, acidez titulável em ácido láctico, extrato seco desengordurado, índice crioscópico máximo e proteínas. Além disso, existem testes para controle diário de qualidade do leite cru refrigerado na propriedade rural (BRASIL, 2002a).

As enzimas presentes no leite podem ser inativadas por tratamentos térmicos e são usadas como indicativo da efetividade destes processos (ex.: pasteurização), testando-se, por exemplo, a atividade da enzima fosfatase alcalina. Os conteúdos de fosfatase alcalina, porém, variam entre as espécies, sendo de 8300-17300 µg de fenol/mL em leite de ovelha, de 115-1300 µg de fenol/mL em leite cabra e de 1800-4750 µg de fenol/mL em leite de vaca. Aparentemente, os conteúdos desta enzima não estão relacionados ao conteúdo de gordura no leite, e sim unicamente à espécie (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a).

A avaliação de qualidade da gordura láctea pode auxiliar a prevenir o dano lipolítico em leite. A lipólise láctea é a hidrólise dos ácidos graxos a partir dos triglicerídeos presentes no glóbulo de gordura. A lipólise espontânea em leite fresco é causada principalmente pela atividade das lipases nativas do leite e pode ser estimulada por agitação, formação de espuma ou mudanças de temperatura. Parâmetros como conteúdo de gordura, formação natural de creme (“creaming”) e teor de ácidos graxos livres podem ser utilizados para

avaliar a qualidade da gordura láctea. Além destes, o diâmetro médio do glóbulo de gordura (D_1), o diâmetro médio superfície-volume ($D_{3,2}$), a área superficial do glóbulo e a distância interglobular média são usados na avaliação da distribuição de tamanho no glóbulo de gordura láctea (ABENI *et al.*, 2005).

A separação da gordura láctea de forma natural pode ser chamada de formação de creme ou “creaming” macroscópica da emulsão. A formação de creme natural pode ser avaliada após aspiração da gordura que fica na superfície do leite, calculando-se a porcentagem de gordura separada pela diferença entre o conteúdo de gordura antes e após o “creaming” natural (ABENI *et al.*, 2005).

A atividade de íons no leite é afetada pela presença de “quelantes”, por exemplo, as caseínas. A associação entre degradação da caseína e redução na atividade de cálcio pode ocorrer pela exposição de grupos fosfoserina, que normalmente estão internos nas micelas de caseína (GUERZONI *et al.*, 1999; LEITNER *et al.*, 2004), e são os responsáveis pelas propriedades da caseína de “quelar” cálcio. A degradação da caseína ocorre na glândula mamária durante os intervalos entre as ordenhas e a verificação deste fenômeno pode utilizar como indicador a medida da atividade de cálcio, considerada uma metodologia rápida e acessível (LEITNER *et al.*, 2004).

A contagem de células somáticas está inversamente relacionada com a qualidade do leite, atuando diretamente sobre suas propriedades físicas e químicas (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007b). Os valores aumentados estão geralmente relacionados com um processo inflamatório, devido à presença de uma infecção intramamária, ou com condições não patológicas, tais como estro, lactações avançadas ou sazonalidade (PAAPE *et al.*, 2007; RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007b).

Uma revisão realizada por Raynal-Ljutovac *et al.* (2007b) apresentou as principais alterações na parâmetros físico-químicos de leite de ovelha observadas com valores aumentados para CCS. Segundo os estudos, de uma maneira geral, foram observados nos leites a elevação do pH e diminuição nos conteúdos de sólidos totais, lactose e gordura. Os resultados para proteínas

totais em leite foram contraditórios, mas a maioria apresentou diminuição na relação caseína / proteína total e elevação do teor de proteínas no soro, o que afetará diretamente o rendimento de queijo produzido. Em queijos produzidos com leite de ovelha ou de cabra com altas CCS, observaram-se aumentos nos tempos necessários para coagulação e para obtenção da firmeza no coágulo, perdas no rendimento, elevação nos conteúdos de água, maior intensidade de proteólise e lipólise, e perda da qualidade sensorial (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007b).

Nos Estados Unidos, país onde o consumo de leite ovino tem aumentado, a contagem de células somáticas foi realizada para avaliar o impacto sobre a qualidade do queijo produzido com leite cru de ovelha. Após a análise de CCS, os leites foram classificados em grupo I (abaixo de 100.000 células/ mL), grupo II (100.000 a 1.000.000 células/mL) e grupo III (acima de 1.000.000 células/mL). A produção do queijo utilizou o protocolo para queijo Manchego e observou-se que o aumento na contagem estava inversamente relacionado com a qualidade do queijo. Os teores de caseína e gordura foram menores no grupo III, e os teores de umidade mostraram-se aumentados neste grupo (JAEGGI *et al.*, 2003). Resultados semelhantes foram citados por Leitner *et al.* (2004). As baixas contagens de CCS em leite de ovelha ou de cabra demonstraram que é possível recuperar 4% a mais de proteína durante a fabricação do queijo, em relação ao leite com altas contagens (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007b).

2.4 Produção de Queijo de Leite de Ovelha

A elaboração de queijo pode ser descrita como um processo de remoção de água, lactose e alguns minerais do leite para produzir um concentrado de lipídeos e proteínas lácteas. Os ingredientes essenciais para o queijo são o leite, a enzima coagulante (coalho), culturas bacterianas e sal (RISSO, 2004). O coalho modifica as caseínas, através da hidrólise, e faz com que as proteínas lácteas agreguem-se, num processo chamado floculação ou agregação (MOATSOU *et al.*, 2004; RISSO, 2004). Finalmente, o leite transforma-se em um gel semi-rígido. Ao cortar este gel em pequenas peças, o

soro, formado principalmente por água e lactose, separa-se da coalhada num processo chamado sinerese. Estas são as etapas da fase fundamental no processo de elaboração conhecido como coagulação enzimática (RISSO, 2004).

Os objetivos principais a alcançar na fabricação do queijo são: (1) Obter a composição ótima em relação à umidade, acidez /pH e conteúdo de lipídeos, proteínas e minerais; (2) Estabelecer a correta estrutura do queijo; (3) Conseguir, a partir dos anteriores, a maturação adequada ao produto. Estes objetivos são alcançados pelo controle e/ou variação nas etapas iniciais do processo de fabricação do queijo.

A maioria dos queijos é produzida a partir da fermentação láctea do leite. Em geral, o processo de fabricação consiste em duas etapas importantes: o leite é preparado e inoculado com bactérias lácticas iniciadoras apropriadas, sendo que a cultura iniciadora produz ácido láctico e com a adição de renina, inicia-se a formação da coalhada; a coalhada passa por corte e prensagem, seguida por adição de sal e, no caso de queijos maturados, o processo de maturação é realizado nas condições adequadas a cada queijo (JAY, 2000).

Existem mais de 400 variedades de queijos, representando pelo menos, 20 tipos distintos, que estão agrupados ou classificados de acordo com a textura ou conteúdo de umidade, se são maturados ou não, e se o processo de maturação envolve bactérias ou bolores. As três classificações de textura são duro, semi-duro ou mole. Dentre os queijos duros, encontram-se Cheddar, Provolone, Romano e Edam, sempre maturados por bactérias, em períodos de 2 a 16 meses. Queijos semi-duros incluem Muenster e Gouda, com maturação por bactérias, por 1 a 8 meses. Os queijos azuis e o Roquefort são dois exemplos de queijos semi-duros maturados por bolores, de 2 a 12 meses, e tradicionalmente devem ser produzidos com leite de ovelha. O queijo Limburger é um exemplo de um mole maturado por bactérias, e Brie e Camembert são queijos moles maturados por bolores. Entre os não maturados, estão o cottage, o "cream cheese" e o Neufchatel (JAY, 2000). Os queijos da Península Ibérica com Denominação de Origem Protegida (PDO) são classificados de acordo

com a textura do queijo, tipo de leite e raça do animal, tipo de coagulante utilizado e a região de origem (FREITAS & MALCATA, 2000). Os queijos italianos tradicionais incluem ainda o tipo de cultura iniciadora utilizada e o tempo de maturação (SIRAGUSA *et al.*, 2007; RIZZELLO *et al.*, 2005; DE ANGELIS *et al.*, 2001).

Os equipamentos que entram em contato com o produto devem ser de materiais inertes e passíveis de serem submetidos à limpeza e desinfecção. Os produtos de higienização podem ser selecionados através das orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que a utilização de produtos com ação antimicrobiana para indústria alimentícia abrange uso em objetos, equipamentos e superfícies inanimadas e ambientes onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios (BRASIL, 2007). A observação e implementação de procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BRASIL, 2002b) e dos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) (BRASIL, 1997; BRASIL, 2002b) também têm influência direta sobre a qualidade e inocuidade do produto final. A implantação de BPF, Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) contribuem para evitar variações na composição do leite. Com estas ações, combinadas ao treinamento adequado da equipe de trabalho, poderiam ser reduzidos ou até eliminados os riscos de alterações no leite e nos queijos produzidos.

A qualidade do queijo produzido está relacionada com a qualidade matéria-prima. As fontes de contaminações externas, provenientes dos animais, dos manipuladores, dos utensílios ou equipamentos, são as primeiras a serem evitadas, pois serão contaminantes físicos no produto e influenciarão em sua contaminação microbiológica. A escolha dos animais e o manejo adequado do rebanho terão influência direta sobre a qualidade da matéria-prima, pois determinam a composição físico-química do leite e a redução de contaminantes. A localização geográfica seria também um atributo para garantir a qualidade de um queijo com PDO.

2.4.1 Etapas do Processamento do Queijo

O queijo Fascal é considerado o primeiro queijo de leite de ovelha desenvolvido no Brasil. A partir do fluxograma do processo de fabricação deste queijo (Figura 1) e a partir da consulta à literatura (CURI & BONASSI, 2007; FALLICO *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2004), são apresentadas as etapas utilizadas na produção de queijo de leite de ovelha.

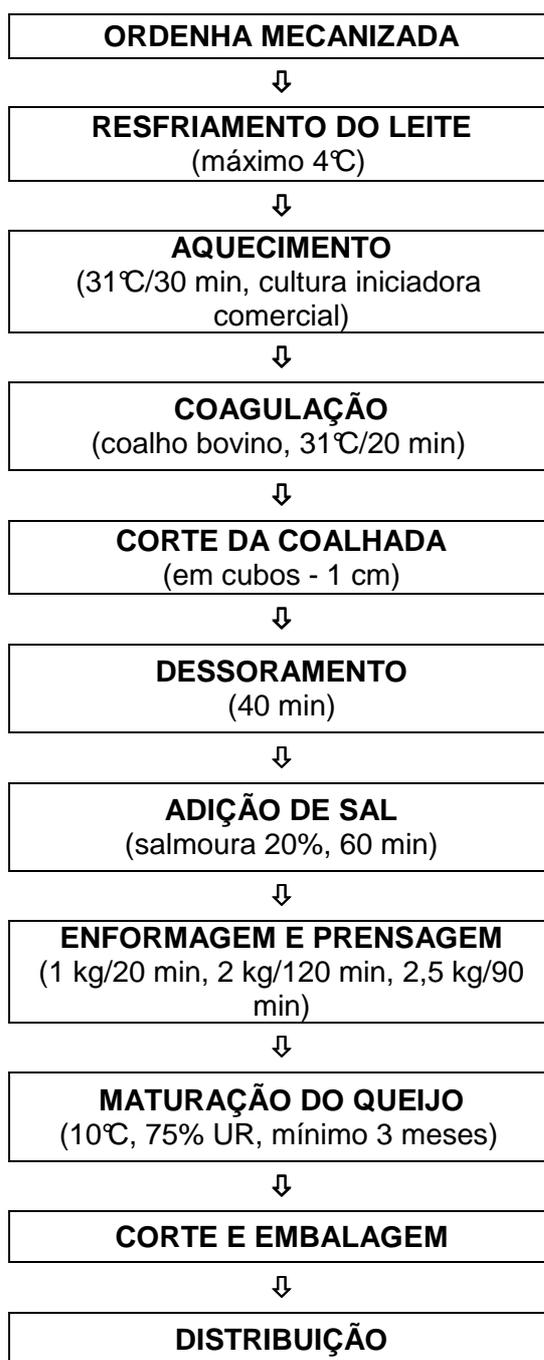


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Fascal.

2.4.1.1 Ordenha

Cuidados higiênicos devem ser tomados durante a ordenha, para não gerar aumento de contaminação no leite. Esta contaminação pode ser proveniente do úbere, dos equipamentos e recipientes utilizados, das tubulações e dos manipuladores. Deve ser feita a limpeza e a sanitização de todos os materiais e superfícies que entrarem em contato com o leite durante a ordenha. A legislação brasileira orienta que a limpeza seja feita de acordo com as instruções do fabricante, usando-se detergentes inodoros e incolores (BRASIL, 2002a).

As recomendações higiênico-sanitárias para obtenção de matéria-prima, presentes na Instrução Normativa N° 51, incluem lavagem prévia dos tetos do animal com água corrente, secagem com toalhas descartáveis, descarte dos jatos iniciais de leite, desinfecção após a ordenha e manutenção do animal em pé até que o esfíncter do teto volte a se fechar (BRASIL, 2002a). A ordenha em cabras, descrita em diferentes estudos como seguindo cuidados higiênicos, incluiu limpeza do úbere com água corrente, desinfecção com solução gliceroniodada, posterior secagem com tecido de algodão limpo e eliminação dos primeiros jatos de leite (EUTHIER *et al.*, 1998; LEUTHIER *et al.*, 2003).

Os intervalos entre as ordenhas, as frequências de ordenha e as técnicas que assegurem uma ordenha completa sem leite residual, seja manual ou com ordenhadeira mecânica, interferem na produção diária e total de leite, por remoção do efeito inibidor do leite acumulado no tecido alveolar da glândula mamária (BUSETTI, 2006). Por outro lado, um aumento na frequência de ordenha foi relacionado a um aumento na atividade das enzimas acetilcoenzima A e ácido graxo sintetase no tecido mamário de cabras, levando a um aumento na síntese de ácidos graxos de cadeia curta. Considerando-se a afinidade geral das lipases lácteas por triglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia curta, em relação a triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa, a maior lipólise em leite poderia estar associada a uma maior frequência de ordenhas diárias (ABENI *et al.*, 2005).

2.4.1.2 Resfriamento

O resfriamento deve ser feito até que o leite seja processado, sendo muito importante, pois poderá evitar o aumento da contaminação microbiana e a ocorrência de reações químicas e enzimáticas. Na produção do queijo Fascal, não é necessário o transporte refrigerado, já que a indústria processa apenas seu próprio leite. O leite é imediatamente resfriado após a ordenha, sendo transportado por tubulações até o tanque de resfriamento, onde é armazenado em temperaturas inferiores a 4°C.

Os tanques de refrigeração e armazenagem do leite devem ser mantidos sob condições adequadas de limpeza e higiene, serem cobertos, arejados, pavimentados, com isolamento por paredes, iluminação adequada, ponto de água corrente com qualidade microbiológica e adequadamente clorada, para ser utilizada na limpeza e sanitização do equipamento de refrigeração e utensílios em geral. O tanque de refrigeração por expansão direta deve permitir a refrigeração do leite em temperatura igual ou inferior a 4°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, e o tanque de refrigeração por imersão deve permitir a refrigeração do leite em temperatura igual ou inferior a 7°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha (BRASIL, 2002a).

A homogeneização pode ser empregada, antes da produção do queijo, com o objetivo de romper glóbulos de gordura grandes. No caso do leite ovelha, esta etapa não se faz necessária, porque este naturalmente já contém glóbulos de gordura menores (MARTH & STEELE, 2001).

O congelamento do leite ovelha poderia ser aplicado como forma de resolver a sazonalidade da produção leiteira, fazendo com que a produção do queijo não fosse diminuída em alguns períodos do ano. A avaliação do congelamento sobre a qualidade de leite ovino demonstrou que em temperatura de -15°C houve formação de cristais de gelo maiores, em relação à temperatura de -27°C. Estes cristais de gelo maiores podem causar danos nos glóbulos de gordura, causando valores maiores de acidez no leite. Em

queijos de leite de ovelha completamente maturados, o congelamento a -20°C por 6 meses foi um método adequado de estocagem (PARK *et al.*, 2006).

2.4.1.3 Aquecimento

O leite é colocado na cuba do queijo pelo tempo necessário para atingir a temperatura desejada, sendo que Fallico *et al.* (2006) citam temperaturas entre 30 e 35°C. Para iniciar a fabricação do queijo Fascal, o leite de ovelha é levado do tanque de resfriamento e colocado em uma Tina Duplo “O” (Globoinox), a 31°C por 30 min. Nesta etapa, pode ser adicionada a cultura iniciadora (se fizer parte do processo), iniciando-se a acidificação no produto. A cultura iniciadora comercial (MA, Danisco), que contém uma mistura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, é adicionada para produção do queijo Fascal.

A falta de sanitização adequada da cuba, a contaminação da cultura iniciadora e a acidificação deficiente poderão elevar a contaminação no queijo. Apesar de ser utilizado leite cru, a indústria de laticínios utiliza a cultura iniciadora na produção do queijo Fascal, diferentemente de queijos tradicionais da Europa que utilizam apenas a microbiota endógena do leite de ovelha.

A legislação brasileira permite dois tipos de pasteurização do leite, a pasteurização rápida, realizada a temperaturas entre 72 e 75°C por 15 a 20s, e a pasteurização lenta, entre 62 e 65°C durante 30 min (SCHUSTER *et al.*, 2006). A ausência do tratamento térmico é permitida pela legislação para o leite que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação durante um tempo não inferior a 60 dias, a uma temperatura superior aos 5°C (BRASIL, 1996b).

A necessidade do processamento térmico está relacionada ao alto risco de contaminação microbiana em leite e queijos, em função dos valores de pH e a_w (GLASS & DOYLE, 2005). Os processos térmicos aplicados na indústria podem incluir: Termização para destruição de psicrotróficos (63-65°C, por 15-20 s); Pasteurização (75-85°C, por 15-30 s) para destruição de *Mycobacterium tuberculosis*; Esterilização para destruição de enzimas e patógenos, incluindo esporos (20 min, 100-120°C); Esterilização UHT para destruição de enzimas,

como fosfatase alcalina e peroxidase, e patógenos, incluindo esporos (2-3 s, 135-150°C) (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a).

Por outro lado, sabe-se que a pasteurização do leite pode afetar de forma adversa o desenvolvimento de propriedades sensoriais no queijo. Geralmente, queijos produzidos com leite pasteurizado maturam de forma mais lenta e desenvolvem sabores e aromas em menor intensidade, em relação a queijos produzidos com leite cru. Dentre os motivos, estão os menores conteúdos de aminoácidos livres, ácidos graxos e compostos voláteis. A pasteurização também afeta a textura do queijo, podendo resultar em uma estrutura aberta, com numerosas e irregulares cavidades, menos firme e mais fraturável, comparando-se com queijos de leite cru (FALLICO *et al.*, 2006).

2.4.1.4 Coagulação

Após a adição do coalho, aguarda-se o tempo necessário para que a coagulação seja completa, até a formação da estrutura característica de gel. O coalho bovino (marca BV) é utilizado para queijo Fascal, de acordo com a quantidade de leite processado, sendo que 20 min a 31°C são suficientes para a gelificação. Dentre os pontos que devem ser observados nesta etapa estão a adição de quantidade adequada de coalho, para não afetar o rendimento do queijo e não haver perda de matéria coagulável no soro, e a observância do tempo necessário para coagulação, evitando que o coágulo não adquira consistência adequada e forme um queijo quebradiço. Segundo Fallico *et al.* (2006), são adicionados 42g de coalho / 100L de leite, mantendo-se a 35°C por 50 min.

Os fatores mais importantes sobre a formação da estrutura da coalhada ácida são conteúdo de caseína, pH e conteúdo de cálcio no leite. Em pH baixo, o cálcio é progressivamente dissociado da micela de caseína. Em adição a isto, a neutralização das cargas negativas da caseína favorece a ampla agregação da caseína e a fusão das micelas, que tendem a formar um gel. Em pH 4,6, a rede de caseína é formada e os demais componentes são retidos em seu interior (PARK, 2007). Os tempos de coagulação de queijos produzidos com

leite de ovelha são menores em pH mais baixo. A interferência deste parâmetro sobre a textura do queijo é particularmente importante, devido às mudanças no pH estarem diretamente relacionadas com as mudanças na rede protéica presente na coalhada (PARK, 2007).

A influência de outros parâmetros, como atividade de água e conteúdo de sal, sobre as propriedades reológicas do queijo é indireta. Altos níveis de sal aumentam a pressão osmótica, que retira quantidades significativas de água ligada à estrutura da caseína. Por outro lado, uma atividade de água menor resultaria em atividade proteolítica reduzida no queijo (PARK, 2007).

A plasmina é a principal enzima proteolítica em leite de ovelhas e está associada ao aumento na degradação de caseína. A atividade pronunciada deste sistema em ovelhas está associada às diferenças no rendimento de coágulo e tempo de coagulação, em relação ao leite de vaca (RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2007a; LEITNER *et al.*, 2004).

A coagulação do queijo pode ser afetada pela alteração no leite de ovelha, devido ao desmame precoce dos cordeiros. Isso acarretaria uma diminuição da ocitocina e prolactina e resultaria no aumento do plasminogênio, envolvido na síntese da caseína, atuando assim sobre a consistência final do coágulo (BUSETTI, 2006).

A contagem elevada de células somáticas em leite demonstrou um aumento do tempo necessário para coagulação visual do queijo e, conseqüentemente, mais tempo para alcançar a firmeza necessária para corte do coágulo (JAEGGI *et al.*, 2003). Altas CCS também foram relacionadas com aumento da proteólise, pela ativação do sistema ativador de plasmina - plasminogênio – plasmina (LEITNER *et al.*, 2004). Na glândula mamária de animais com altas CCS, pode ocorrer aumento na atividade da plasmina e aumento no conteúdo de plasminogênio. Em alguns casos, onde há aceleração na conversão de plasminogênio em plasmina, não será observado aumento no conteúdo de plasminogênio na glândula mamária (LEITNER *et al.*, 2004). Os animais com infecções subclínicas possuem também teores de cálcio menos

disponível para induzir o efeito pró-coagulante sobre a para- κ -caseína, devido a sua associação com produtos da proteólise (LEITNER *et al.*, 2004).

2.4.1.5 Corte da Coalhada

Após formação desta estrutura, é feito o corte da massa com lira para a expulsão do soro. A coalhada do queijo Fascal é cortada em cubos de cerca de 1 cm. O corte da massa adequado evita a retenção de soro em seu interior e também que os blocos sejam muito pequenos, comprometendo a qualidade do produto. Além disso, deve ser realizada adequada da sanitização da lira e o manipulador deve seguir as boas práticas de fabricação e procedimentos de higiene, já que poderá ter contato direto com a massa. Passado este período, o corte é realizado mecanicamente durante 5 min, sendo que a temperatura verificada na massa foi de 34,2°C (FALLICO *et al.*, 2006).

2.4.1.6 Dessoramento

Após o corte da coalhada, a massa do queijo Fascal é mantida por 40 min no tanque. Esta etapa consiste na retirada do soro expulso da massa e está diretamente relacionada com a atividade de água. Valores elevados neste parâmetro estarão diretamente relacionados com contaminação microbiana e reações químicas e enzimáticas no queijo, durante sua maturação e sua vida de prateleira. O dessoramento mais ou menos intenso acontecerá de acordo com a textura, o grau de maturação e o período de conservação desejados para o queijo.

Uma pré-prensagem por 15 a 20 min é realizada no tanque para remoção do soro residual da massa de queijo Fascal. O tempo necessário para drenagem do soro para produção de queijo Piacentinu Ennese, observado por Fallico *et al.* (2006), foi de 80 min, o pH da massa ficou em torno de 6,4 e a temperatura foi de 39°C.

A quantidade de soro liberada a partir da coalhada, produzida com leite de cabra, foi dependente da existência ou não de processamento térmico no leite. Os queijos produzidos com leite não processado termicamente e com leite

submetido ao processo de “sanitização” (61°C / 20 min) tiveram uma perda inicial de água menor, em relação ao produzido com leite pasteurizado. Ao final de 45 dias de maturação, porém, os resultados foram invertidos. O queijo produzido com leite pasteurizado teve perda menor de água, seguido pelo produzido com leite não tratado termicamente e com leite “sanitizado” respectivamente (GUERZONI *et al.*, 1999).

2.4.1.7 Adição de Sal

Nesta etapa, é feita a adição de sal no produto, que contribuirá para diminuição da atividade de água, mas sua distribuição deve ser homogênea para alcançar sabor e conservação adequados. A concentração da salmoura utilizada para o queijo Fascal é de 20% (p/v). O tempo de manutenção é calculado em função do tamanho do queijo, sendo de 1 h para cada 100g. Novamente, a manipulação da coalhada é um ponto a ser controlado, já que o manipulador poderá ser fonte de contaminação para o produto.

2.4.1.8 Enformagem e Prensagem

A coalhada salgada é colocada em formas de acordo com o tamanho do queijo a ser produzido. Para o queijo Fascal, são utilizadas formas de 600 g, 1,2 kg e 2,5 kg. Formas que não forem bem lavadas poderão ser foco de contaminação, já que resíduos de massa de queijo são meios ricos para crescimento microbiano. A colocação da massa nas formas geralmente é manual e novamente o manipulador aparece como potencial contaminador do produto.

As formas são colocadas em prensas mecânicas, ajustadas para aumentar a pressão gradativamente, liberando quantidades crescentes de soro. A pressão insuficiente poderá resultar em retenção de soro em excesso na massa, constituindo foco de contaminação microbiana, bem como impedir a agregação das partículas de coalhada, afetando futuramente a textura do queijo. Durante a fabricação do queijo Fascal, as formas são prensadas a temperatura ambiente da seguinte forma: 1 kg por 20 min; 2 kg por 120 min;

2,5 kg por 90 min. Os queijos são virados três vezes ao longo do período de 3 h.

2.4.1.9 Maturação

Os queijos prensados são retirados das formas e encaminhados para a câmara de maturação. O período de cura é planejado de acordo com as características desejadas no queijo. Considerando o queijo Fascal, este período pode variar de 90 a 150 dias, tornando as características organolépticas mais acentuadas ao longo do tempo.

No caso dos queijos de massa dura e semidura, o tempo necessário para o desenvolvimento de sabor, aroma e textura é maior, aumentando assim os custos de produção (GUTIERREZ *et al.*, 2004) e também o período de exposição ao ambiente da câmara de maturação, o que pode representar risco de contaminação no produto.

Durante a cura, os queijos devem ser mantidos em câmaras de maturação com temperatura e umidade adequadas ao produto, e devem passar por lavagens periódicas da casca. A maturação do queijo Fascal é realizada em câmaras de maturação a 10°C e umidade relativa de 75%, por no mínimo 3 meses. Na indústria que produz o queijo Fascal, são utilizadas câmaras distintas, em função da introdução ou não de fungos nos produtos, evitando assim a contaminação cruzada. A câmara de maturação deve manter temperaturas baixas, para evitar proliferação de microbiota indesejável, e umidade baixa, já que o queijo produzido na indústria analisada deverá possuir casca e será um queijo com baixo teor final de umidade. As lavagens da casca acontecem em função de contaminações superficiais no produto. A circulação de ar deve ser monitorada para evitar a entrada de contaminação externa no produto, e a circulação de pessoas na câmara deve ser mínima. Os mostradores de temperatura e umidade devem estar do lado de fora da câmara, para facilitar o monitoramento destes parâmetros.

Durante a maturação do queijo são liberados vários produtos, como peptídeos, cetonas, aminoácidos livres e ácidos graxos livres, relacionados

diretamente à intensidade do sabor e aroma e com sua textura. O pH controla as reações durante este período, bem como a atividade enzimática e o crescimento microbiano. Ocorre um aumento do pH nos queijos durante o período de maturação, aumentando a atividade das proteases bacterianas e proteases naturais do leite (GUTIERREZ *et al.*, 2004).

A presença de ácidos graxos livres durante a maturação, particularmente os de cadeia curta, poderia estar diretamente relacionada com a população de bactérias lácticas. O crescimento de espécies homoláticas, como *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, parece ser inibido pelos ácidos oléico, capríico e linoléico (GUERZONI *et al.*, 1999). Altos níveis de ácidos graxos livres foram encontrados em diferentes tipos de queijo Pecorino, ao final da maturação, sendo que 19 compostos distintos foram identificados. Os ácidos etanóico, butanóico, hexanóico, octanóico e decanóico representaram as maiores proporções do total de ácidos carboxílicos nos queijos (CODA *et al.*, 2006).

Enquanto a glicólise e a lipólise são processos críticos em algumas variedades de queijos (por exemplo, queijo azul, italiano de massa dura e tipo Suíço), a proteólise é um processo essencial em todos os tipos de queijos, especialmente os queijos com maturação interna e superficial. A proteólise é provavelmente o principal evento bioquímico durante a maturação (TRUJILLO *et al.*, 2000; IZCO *et al.*, 1999). Os principais agentes responsáveis pela proteólise durante a maturação do queijo são: enzimas endógenas do leite, como a plasmina; coagulante residual retido na coalhada após a manufatura; enzimas proteolíticas de bactérias iniciadoras e bactérias de um inóculo secundário (TRUJILLO *et al.*, 2000). Estes agentes proteolíticos atuam de forma combinada para hidrolisar paracaseína a peptídeos e aminoácidos (EMMONS *et al.*, 2003; TRUJILLO *et al.*, 2000).

Um aumento na proteólise durante o último estágio de maturação está associado com as proteinases bacterianas, as quais são extensivamente liberadas via lise destes microrganismos (PEREIRA *et al.*, 2008). Estudos com

queijos italianos demonstraram que a α_{s1} -CN foi completamente degradada durante a maturação de quase todos os queijos (FALLICO *et al.*, 2006; FALLICO *et al.*, 2004). β -CN persistiu até o final da maturação destes queijos italianos e de queijo português Terrincho, e a formação de γ -CN foi evidente, indicando a atividade da plasmina (CODA *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2006; FALLICO *et al.*, 2004).

A análise da microestrutura do queijo italiano Piacentinu Ennese demonstrou que os rearranjos proteolíticos durante sua maturação deram origem a uma microestrutura tipo esponja, permeada por um sistema bem distribuído de espaços vazios. A estrutura do queijo tornou-se mais compacta durante o período de maturação, com cavidade de tamanhos menores, como resultado de uma perda gradual de umidade causada pela evaporação na superfície do queijo (FALLICO *et al.*, 2006). Durante os primeiros dias da maturação do queijo Terrincho, um aumento na resistência, fraturabilidade, dureza, firmeza e intensificação da cor amarela ocorreram. Simultaneamente, adesividade e coesividade diminuíram. Após 20 dias de maturação, a resistência, fraturabilidade, dureza e firmeza diminuíram, e a coesividade aumentou (PINHO *et al.*, 2004).

Na maturação de queijos produzidos com leite com CCS altas, houve maiores quantidades de ácidos graxos livres e aumento significativo de ácidos butírico e caprílico. Foram também detectados sabor e odor de ranço nestes queijos e observados defeitos na textura. A proteólise foi intensa, quanto maior foi a contagem de CCS no leite (JAEGGI *et al.*, 2003). A mastite nos animais pode estar relacionada com a presença de bactérias psicrófilas proteolíticas em leite e conseqüente contaminação dos produtos lácteos (PINTO *et al.*, 2006). As variações observadas para a hidrólise de ácidos graxos e de proteínas podem estar relacionadas aos maiores conteúdos de umidade presente nestes queijos (JAEGGI *et al.*, 2003).

Na comparação entre queijos produzidos com leite de cabra processado termicamente ou não, os valores iniciais de pH foram semelhantes para os diferentes queijos. Os valores de pH entre os queijos com leite submetido ou

não ao tratamento térmico também foram semelhantes entre os grupos, ao final de noventa dias de maturação. Ao longo deste período, observou-se elevação do pH, especialmente na casca, devido ao efeito do rápido crescimento de bolores e leveduras nesta região do queijo (GUERZONI *et al.*, 1999).

2.4.1.10 Corte e Embalagem

Quando os queijos produzidos são grandes, pode ser necessário que se faça o corte dos produtos para sua posterior embalagem a vácuo, garantindo um aumento da vida de prateleira do produto, devido à diminuição de alterações relacionadas com a presença de oxigênio.

2.4.1.11 Distribuição

Devem ser utilizadas temperaturas de refrigeração, para evitar aumento da contaminação microbiana e da velocidade de reações indesejadas no queijo.

2.4.2 *Parâmetros Microbiológicos em Queijos*

Os queijos produzidos com leite de ovelha cru contêm um número muito maior de bactérias lácticas, em relação aos queijos produzidos com leite pasteurizado (DE ANGELIS *et al.*, 2001). A utilização deste leite proporciona a oportunidade para patógenos contaminarem, sobreviverem e crescerem facilmente durante a fabricação, transporte e estocagem (CARIDI, 2003).

Os queijos da Península Ibérica geralmente são produzidos com leite cru e não utilizam culturas iniciadoras, podendo constituir um perigo potencial à saúde do consumidor. Os estudos microbiológicos nestes queijos têm tido como foco a avaliação dos microrganismos de interesse sanitário e dos envolvidos na maturação, incluindo enterobactérias, *Staphylococcus*, bactérias lácticas e leveduras. Os microrganismos pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* e aos coliformes são considerados indicadores da qualidade sanitária e microbiológica em alimentos, sendo preocupantes

quantidades altas em queijos maturados (FREITAS & MALCATA, 2000; CARIDI, 2003).

Uma revisão avaliou o perfil microbiológico em queijos de leite de ovelha da Península Ibérica, produzidos com coagulante de origem animal ou vegetal. Dentre os produzidos com coagulante extraídos de plantas, as contagens de mesófilos variaram de 10^5 a 10^{10} UFC/g. A quantificação de alguns microrganismos indicou uma diminuição nas contagens de coliformes e bolores e leveduras ao longo do período de maturação. O queijo La Serena apresentou uma qualidade microbiológica ruim, visto que altas concentrações de coliformes foram detectadas, mesmo em estágios avançados de maturação (FREITAS & MALCATA, 2000).

Os queijos duros e semi-duros possuem baixo conteúdo de umidade, o que faz com que sejam menos susceptíveis à deterioração causada pela maioria dos microrganismos, embora bolores estejam envolvidos em deterioração neste tipo de alimento (JAY, 2000). A levedura *Yarrowia lipolytica* foi responsável pela pigmentação marrom na superfície de queijos Castelo Branco, durante a maturação. No período de 30 dias de maturação do queijo de Évora, foi encontrada prevalência da levedura *Debaryomyces hansenii* e presença também de *Candida zeylanoides* e *Rhodotorulla* spp. Em isolados obtidos de queijo Serpa, puderam ser identificadas *Debaryomyces hansenii* como a mais freqüente, seguida por *Yarrowia lipolytica*. Várias leveduras foram isoladas de queijo Serra da Estrela, sendo que *Sporobolomyces roseus* foi predominante (FREITAS & MALCATA, 2000).

A presença de micotoxinas em queijos também é citada na literatura, como aflatoxinas na superfície de queijos Tilsit, Cheddar e tipo Brick (JAY, 2000). Experimentos realizados com ovelhas na Itália demonstraram que a administração contínua de aflatoxina B1, por 7 dias a ovelhas em lactação, aumentou a concentração da aflatoxina M1 no leite, em função do consumo da aflatoxina B1. A concentração da aflatoxina M1 na coalhada dos queijos foi dependente de sua concentração no leite não processado, sendo que algumas vezes alcançou o dobro do quantificado em leite (BATTACONE *et al.*, 2005).

Ao longo do tempo de maturação do queijo Évora, alguns autores relataram *Enterococcus* e *Staphylococcus* como mais constantes. Outros relataram presença de bactérias lipolíticas, como as pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Micrococcaceae* e aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* (FREITAS & MALCATA, 2000). A bactéria aeróbica formadora de esporos *Bacillus polymyxa* tem sido relacionada com a formação de gás em queijos. Isto resulta da utilização do ácido láctico para produção de CO₂ (JAY, 2000).

O *Staphylococcus aureus* está presente em leite cru e normalmente não sobrevive ao processo de pasteurização, porém suas toxinas não são destruídas por este tratamento. A temperatura de 7°C e o pH 4 seriam os valores mínimos para crescimento. Esta bactéria está frequentemente presente na pele e nas fossas nasais de humanos, sendo um risco potencial de contaminação pós-processamento (GLASS & DOYLE, 2005). Os produtos contaminados com *Staphylococcus aureus* podem causar sintomas induzidos por enterotoxina, como vômito intenso, dor abdominal, e algumas vezes diarreia e dores de cabeça (VAUTOR *et al.*, 2003). A produção de queijos usando leite cru, particularmente nos casos de acidificação insuficiente ou lenta da coalhada, pode levar a surtos associados com *Staphylococcus* nestes produtos. Além disso, a fabricação de queijos com leite pasteurizado, em condições inadequadas de higiene, pode levar à contaminação do leite ou da coalhada com *Staphylococcus aureus* (ARQUÉS *et al.*, 2005; JAY, 2000).

Em amostras de queijo Castelo Branco e de queijo Idiazabal, não foi detectada a presença de *Staphylococcus aureus*. Alguns autores não detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Serpa, resultado contrário obtido por outros que quantificaram acima de 2x10³UFC/g no mesmo tipo de queijo (FREITAS & MALCATA, 2000). Em queijo Terrincho, cerca de 10% das amostras apresentaram resultados insatisfatórios na detecção de *S. aureus* (ALMEIDA *et al.*, 2007). Queijos de leite de ovelha provenientes de oito dentre as dez fazendas avaliadas na Suíça estavam contaminados com *S. aureus* (VAUTOR *et al.*, 2003).

A *Salmonella* spp. é freqüentemente detectada em leite cru, mas não em queijo, com relato de que as condições mínimas necessárias para crescimento seriam 6,5°C e pH 4,5 (GLASS & DOYLE, 2005). Não houve detecção de *Salmonella* spp. em amostras de queijo Castelo Branco, Idiazabal e Vastedda (MUCCHETTI *et al.*, 2008; FREITAS & MALCATA, 2000). Em queijo La Serena, *Salmonella arizonae* foi a única espécie detectada ao longo do tempo de maturação (FREITAS & MALCATA, 2000). *Salmonella* foi detectada em queijos Terrincho com massa mole ou semi-mole (ALMEIDA *et al.*, 2007). Em queijo Feta produzido com leite de ovelha cru, o tempo de sobrevivência de *Salmonella* spp. foi em torno de 20 dias (MARTH & STEELE, 2001).

A *Escherichia coli* O157:H7 está normalmente associada a carnes, mas também pode ser detectada em queijos e leite cru. As condições mínimas para crescimento seriam 2,5°C e pH 4,6 (GLASS & DOYLE, 2005; HUSSEIN & SAKUMA, 2005). A quantificação de coliformes e *Escherichia coli* em queijo Serpa demonstrou valores acima de $2,5 \times 10^6$ UFC/g e $1,4 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente. Foi detectada sua presença também em queijo Serra da Estrela (FREITAS & MALCATA, 2000). A detecção de *E. coli* indicou que cerca de 34% das amostras de queijos Terrincho apresentaram resultados considerados insatisfatórios (ALMEIDA *et al.*, 2007). Em queijo Pecorino del Poro, foram observadas contaminações altas por *Escherichia coli* no início do período de maturação, sendo que *E. coli* desapareceu ao final da maturação. Este fato pode ser explicado pela utilização do leite cru de ovelha e pelos microrganismos produtores de bacteriocinas, normalmente presentes no leite (CARIDI, 2003).

As condições mínimas para crescimento de *Listeria monocytogenes* citadas na literatura são 10°C e pH 4,8. Esta bactéria foi detectada em leites crus com freqüência (GLASS & DOYLE, 2005; JAY, 2000), inclusive em meses frios do ano e em fábricas que apresentavam boas condições de higiene e sanitização. Freqüentemente contamina tubulações e superfícies e pode estar presente em sistemas de resfriamento, sendo que freqüências altas de detecção foram observadas em queijos maturados e na água usada para lavagem de queijos (GLASS & DOYLE, 2005).

A presença de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* e *Listeria seeligeri* foi confirmada em queijos de leite de ovelha produzidos na subregião Castelo Branco, e apenas *Listeria monocytogenes* em queijo La Serena (FREITAS & MALCATA, 2000). Nos Estados Unidos, vários surtos e mortes causadas por *L. monocytogenes* foram relatadas, sendo que o veículo mais comum foram queijos moles com pasteurização inadequada (JAY, 2000). *L. monocytogenes* foi detectada em oito das setenta amostras de queijo Terrincho avaliadas em um estudo (ALMEIDA *et al.*, 2007), mas não em amostras do queijo siciliano Vastedda (MUCCHETTI *et al.*, 2008).

A contagem de *Pseudomonas fluorescens* em coágulo de queijo Serra da Estrela foi de 10^3 UFC/g, sendo que após uma semana de maturação sua concentração foi insignificante (FREITAS & MALCATA, 2000). Dentre as bactérias isoladas de queijos Pecorino Abruzzese, *Pseudomonas* e *Enterococcus* foram os que mostraram atividades proteolíticas mais altas (MARTUSCELLI *et al.*, 2005).

Os *Enterococcus* estão presentes em vários queijos artesanais produzidos com leite cru ou pasteurizado de ovelhas, cabras, búfalos e vacas, estando relacionados com alterações negativas no sabor e aroma dos queijos (MADRAU *et al.*, 2006; GELSOMINO *et al.*, 2002; JAY, 2000). O *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium* são os mais comumente presentes em queijos. Além das alterações na qualidade dos queijos, estão envolvidos em infecções hospitalares e apresentam aumentada resistência a antimicrobianos. A presença de *Enterococcus* em alimentos está relacionada a condições higiênico-sanitárias inadequadas no processamento, já que possuem o trato intestinal como *habitat* mais comum, e também trato urinário e cavidade oral (GELSOMINO *et al.*, 2002; JAY, 2000).

Uma avaliação realizada com queijo produzido com leite cru demonstrou que os *Enterococcus* sobreviveram e cresceram em equipamentos de ordenha não sanitizados adequadamente e no tanque de armazenamento de leite, provocando a contaminação de todo leite que entrou em contato com estes locais. Conseqüentemente, foi observada contaminação no queijo e

evidenciado o risco para o consumidor, já que o *Enterococcus* foi detectado no trato intestinal das pessoas que ingeriram o queijo (GELSOMINO *et al.*, 2002).

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria que pode contaminar produtos lácteos, sendo que os valores mínimos para crescimento são 5°C e pH 4,7 (GLASS & DOYLE, 2005). O *Clostridium butyricum* produtor da toxina tipo E apresentou valores mínimos para crescimento em queijos moles de 12°C e pH 4,8, e produção de toxina após 5 dias a 25°C (GLASS & DOYLE, 2005; YUICHI *et al.*, 2008). O *Clostridium perfringens* também pode contaminar produtos lácteos, sendo que esporos foram encontrados em leite cru e em queijo, onde as condições mínimas para crescimento seriam de 15°C e pH 5,0 (GLASS & DOYLE, 2005).

O queijo Idiazabal apresentou contagem de *Clostridium* spp. de aproximadamente 10 UFC/g (FREITAS & MALCATA, 2000). O crescimento de *C. botulinum* proteolítico é inibido em valores de a_w menores que 0,935, enquanto o não proteolítico é inibido em a_w menor que 0,97. Estes valores de a_w correspondem, respectivamente, a 10% e 5% de sal na fase aquosa. Em queijos com valores de a_w menores que 0,944, não houve detecção de toxina botulínica. Os níveis de sal, aliados ao pH, temperatura, substâncias antimicrobianas, são importantes fatores para controle do crescimento de patógenos, especialmente por seu efeito sobre a a_w . Os sais de potássio podem ser uma alternativa aos sais de sódio, no caso de queijos processados (GLASS & DOYLE, 2005).

Um dos riscos de contaminação em queijos processados termicamente é a presença de *Clostridium botulinum*. O processamento térmico mínimo para minimizar os riscos seria a 121°C por 2,5 a 3 minutos, o que diminuiria a qualidade do queijo processado ou do leite. Um estudo com diferentes formulações de queijos revelou que o pH, conteúdos de umidade, cloreto de sódio e fosfato dissódico são os fatores primários para controlar a produção da toxina botulínica. A presença de ácido láctico inibiu o crescimento da bactéria e a produção de toxina, provavelmente por seu efeito de redução do pH (GLASS & DOYLE, 2005).

Alguns queijos maturados apresentam potencial de oxirredução suficientemente baixo para suportar o crescimento de microrganismos anaeróbios, podendo causar deterioração quando a a_w (atividade de água) permitir que seu crescimento ocorra. *Clostridium* spp., especialmente *C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* e *C. tyrobutyricum*, tem sido relacionado com a formação de gás em queijos. O *C. tyrobutyricum* causa a fermentação butírica ou o defeito de olhadura tardia em queijos como Gouda (JAY, 2000). Compostos com efeito antimicrobiano podem estar presentes em leite, queijos maturados ou queijos processados. A lisozima é uma enzima presente no leite, mais ativa contra bactérias gram-positivas através da degradação da parede celular, que demonstrou atividade contra *C. botulinum*, quando combinada com EDTA. Alguns produtos da reação de Maillard inibiram crescimento de *Aeromonas hydrophyla* (GLASS & DOYLE, 2005).

Já a ocorrência de surtos envolvendo queijos processados é considerada baixa, sendo que, quando existiram, estavam relacionados a produtos com pH elevado e alta atividade de água. Um caso de botulismo fatal foi relatado nos Estados Unidos e o produto envolvido tinha pH 5,9. Posteriormente, houve um surto na Argentina, com parâmetros para o queijo de pH 5,7 e a_w 0,97, e outro nos Estados Unidos, com pH 5,8 e a_w 0,96 no queijo (GLASS & DOYLE, 2005).

Casos esporádicos de brucelose ocorreram na Europa, sendo que um surto foi descrito na Espanha envolvendo queijo tipo Cottage não pasteurizado, produzido com leite de ovelhas infectadas (MARTH & STEELE, 2001). As espécies *Brucella melitensis* e *B. abortus* são patogênicas para ovelhas e, conseqüentemente, uma preocupação para a indústria láctea. Casos de *B. melitensis* foram relatados em queijos italianos, queijos de Malta e da Turquia, todos produzidos com leite de ovelha cru (MARTH & STEELE, 2001).

Um estudo sobre as condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra produzido no Brasil, de forma artesanal, apontou a necessidade de reavaliar as técnicas aplicadas durante o processamento e manipulação dos queijos elaborados, já que foram observadas contagens microbianas elevadas

(EUTHIER *et al.*, 1998). Já outro estudo com queijo de leite de cabra produzido com leite pasteurizado, em uma indústria no sul do Brasil, demonstrou que o produto encontrava-se dentro dos padrões exigidos pela legislação. A elevada contagem de mesófilos totais, contudo, sugere necessidade de melhoria das medidas de sanitização durante o processamento, a fim de garantir a qualidade higiênica e uma maior vida de prateleira ao queijo produzido (PICOLI *et al.*, 2006).

A verificação da presença de microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitárias em queijos produzidos com leite de cabra cru, na região Nordeste do Brasil, demonstrou que a maioria das amostras analisadas apresentava risco à saúde do consumidor e não atendia aos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira. Os resultados indicaram 70% de presença de *Staphylococcus* coagulase-positiva, 12% com presença de *Salmonella* sp. e 12,5% com presença de *Listeria* sp. Foram detectados altos índices de presença de coliformes termotolerantes, com confirmação para *Escherichia coli* em algumas amostras, e contagens elevadas para fungos e leveduras (FEITOSA *et al.*, 2003).

Resultados obtidos por Euthier *et al.* (1998), em queijo “tipo coalho” produzido com leite de cabra, demonstraram que algumas amostras apresentavam contagens elevadas para coliformes totais, coliformes termotolerantes e fungos e leveduras. A ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo Minas frescal foi investigada, sendo que 50% das amostras analisadas apresentaram presença, com contagens médias em torno de 10^5 UFC/g. Os valores foram muito próximos aos requeridos pelas cepas enterotoxigênicas para a produção de enterotoxinas (10^5 a 10^9 UFC/g) em quantidades necessárias para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000).

As práticas tradicionais, que não utilizam a pasteurização do leite como etapa inicial na fabricação de queijos, podem ser observadas na produção de queijo na região do Serro, em Minas Gerais. Este queijo artesanal é produzido desde o século XVIII e, atualmente, um expressivo número de pessoas vive

exclusivamente de sua produção e comercialização (ALEXANDRE *et al.*, 2002). Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles no Brasil elaborados a partir de leite cru, a do queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente tem sido constatada, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (MACHADO *et al.*, 2004; ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000). Um estudo realizado em uma indústria em Juiz de Fora avaliou o leite pasteurizado e o queijo Minas Frescal produzido, sendo que *Listeria monocytogenes* foi isolada a partir dos produtos alimentícios analisados (BRITO *et al.*, 2008).

Em amostras de queijo da região da Serra da Canastra, as contagens dos indicadores microbiológicos foram maiores no soro iniciador do que na massa coagulada. Níveis altos de contaminação por coliformes totais e fecais, como também bolores, foram observados nas amostras de queijo. Os níveis de *Staphylococcus* spp. foram acima de 10^5 UFC/g e em nenhuma das amostras foi isolada *Salmonella* spp. ou *Listeria* spp. Estes resultados mostram a necessidade de melhorias no processo de produção do queijo artesanal produzido na Serra da Canastra (BORELLI *et al.*, 2006).

2.4.3 Parâmetros Físico-Químicos em Queijos

A classificação destes alimentos é baseada no conteúdo de matéria gorda no extrato seco e no conteúdo de umidade (BRASIL, 1996b). A perda gradual de umidade ocorre durante a maturação de queijos, causada pela evaporação na superfície do queijo (FALLICO *et al.*, 2006), o que leva a uma diminuição da atividade de água, a uma concentração dos demais componentes do queijo e aumento nos teores de sólidos totais. Os teores de gordura, proteína, cinzas e cloreto de sódio aumentam ao longo da maturação, evidenciado, sobretudo, quando os cálculos são feitos com base na matéria seca (MADRAU *et al.*, 2006).

O pH pode ser utilizado como um indicativo da fermentação do leite, que ocorre devido à atividade metabólica dos microrganismos presentes no queijo, levando a uma diminuição nos valores de pH (MADRAU *et al.*, 2006).

A lactose em geral é completamente metabolizada durante a maturação do queijo, podendo variar de acordo com a duração deste período, enquanto o teor de ácido láctico aumenta (MADRAU *et al.*, 2006).

As alterações na umidade, a_w , pH e acidez foram monitoradas durante a maturação de queijo Terrincho e distinguiram-se duas fases. A primeira, nos primeiros 20 dias, foi caracterizada por uma diminuição lenta da umidade e a_w e o pH diminuiu de 6,6 a 5,4, resultando em um aumento da dureza, fraturabilidade, resistência, firmeza e intensificação da cor amarela. Após 20 dias, a diminuição da umidade e a_w foi mais proeminente, e o pH aumentou levemente. Esta segunda fase foi caracterizada por um aumento na coesividade e decréscimo da dureza e fraturabilidade, porque as caseínas foram hidrolisadas a pequenos peptídeos (PINHO *et al.*, 2004).

A detecção da presença de leites provenientes de outros animais é um parâmetro importante para a qualidade dos queijos, que devem utilizar apenas de leite de ovelha em sua fabricação (RECIO, *et al.*, 2004; VELOSO *et al.*, 2001). A adição não mencionada na rotulagem de leite de vaca e proteínas do soro aos queijos tradicionais de ovelha e cabra é considerada uma adulteração, e diferentes metodologias podem ser úteis na detecção destas adições (FERREIRA *et al.*, 2006; VELOSO *et al.*, 2001). As principais metodologias podem ser divididas em métodos que necessitam de degradação química das proteínas (ex.: Kjeldahl), métodos por fixação de corantes, métodos colorimétricos, por espectrometria de absorção no infravermelho e ultravioleta, por fluorescência, métodos cromatográficos, electroforéticos e imunológicos (VELOSO *et al.*, 2001).

Uma metodologia para detecção da presença de leite de vaca ou de cabra em queijo apenas com leite de ovelha, foi testada utilizando eletroforese capilar. Os indicadores foram a para- κ -caseína caprina e a α_{S1} -caseína bovina, sendo que a metodologia demonstrou ser capaz de detectar teores acima de 2% de leite de cabra e de 5% de leite de vaca para queijos frescos ou maturados (RECIO, *et al.*, 2004).

A proteólise tem sido considerada por alguns pesquisadores como a base para a classificação de queijos. Um esquema de amostragem adequado deve ser observado para o estudo da proteólise durante a maturação de queijos, sendo que a taxa e o padrão de proteólise podem ser influenciados pela localização dentro do queijo (SOUSA *et al.*, 2001).

O índice de extensão da maturação está relacionado à proteólise primária. Este índice reflete a quantidade de peptídeos derivados da caseína, que são resultado principalmente da ação direta do coagulante residual (quimosina e plasmina), retido na coalhada após a produção, sobre o substrato proteína. Os produtos nesta fração variam desde peptídeos grandes até uma variedade de peptídeos de tamanho médio (PEREIRA *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2006; FALLICO *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2001). A proteólise primária pode ser definida como aquelas alterações em β -, γ - e α -CN, peptídeos e outras bandas menores que são detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (RANK *et al.*, 1985).

O índice de profundidade da maturação tem relação com a proteólise secundária e está correlacionado com a quantidade de peptídeos de tamanho pequeno e médio (2 a 20 aminoácidos). O índice de aminoácidos livres também está relacionado com a proteólise secundária, considerando a presença de aminoácidos na forma livre (produto final da proteólise), bem como os peptídeos menores que contenham menos de seis resíduos aminoacídicos (PEREIRA *et al.*, 2008; PINTADO *et al.*, 2008). Os produtos da proteólise secundária podem incluir aqueles peptídeos, proteínas e aminoácidos solúveis na fase aquosa do queijo (FALLICO *et al.*, 2006; RANK *et al.*, 1985), e estão relacionadas com a microbiota nativa do leite/queijo ou de culturas adicionadas durante a fabricação (FALLICO *et al.*, 2006; MADRAU *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2001). Em experimentos com queijos, o aumento na acumulação de aminoácidos essenciais livres foi relacionado com maior efetividade e especificidade da atividade proteolítica de *Lactobacillus* presentes nas culturas iniciadoras (MADRAU *et al.*, 2006).

Uma rápida acumulação de aminoácidos livres foi observada durante os estágios finais da maturação do queijo Pecorino Sardo (MADRAU *et al.*, 2006). Leucina, valina, ácido aspártico, ácido glutâmico e prolina foram os aminoácidos livres dominantes em queijos portugueses Terrincho, que, de uma forma geral, apresentaram altos índices de aminoácidos livres (PINTADO *et al.*, 2008). Além dos aminoácidos observados no queijo Terrincho, lisina, fenilalanina, isoleucina e serina também estiveram entre os principais aminoácidos detectados em queijo italiano Ragusano (FALLICO *et al.*, 2004). Os aminoácidos valina, leucina, lisina e fenilalanina estiveram presentes em altas quantidades durante todo o período de maturação de queijo Pecorino Sardo (MADRAU *et al.*, 2006).

A proteólise pode ser avaliada através das diferentes frações nitrogenadas em queijos. Os índices proteolíticos principais são os seguintes:

- Índice de extensão da maturação: nitrogênio solúvel em água / nitrogênio total (PEREIRA *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2006);
- Índice de profundidade da maturação: nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) / nitrogênio total (PEREIRA *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2006);
- Índice de aminoácidos livres: nitrogênio solúvel em ácido fosfotúngstico (PTA) / nitrogênio total (PEREIRA *et al.*, 2008).

A utilização de um procedimento de extração aquosa seguido por análise da fração nitrogenada pode ser usada para avaliar a maturação do queijo. Várias metodologias podem ser utilizadas, entre elas a descrita por Kuchroo e Fox (1982), onde o queijo triturado e desengordurado é homogeneizado em uma proporção de 1:2 (p/v) e mantido a 20°C, por 20 min. Após, o homogeneizado é aquecido a 40°C, por 1 h, seguido por centrifugação para coletar o líquido sobrenadante (SALLAMI *et al.*, 2004; KUCHROO & FOX, 1982). Kuchroo e Fox (1982) utilizaram solução pH 4,6 acidificada com HCl para extração desta fração e encontraram eficiência de 95% no primeiro extrato aquoso. A fração é chamada de nitrogênio solúvel em água (WSN) ou nitrogênio solúvel em pH 4,6 (pH 4,6 SN) (SOUSA *et al.*, 2001). Este

procedimento é utilizado para isolar peptídeos pequenos e médios, sendo que a maioria dos compostos nitrogenados solúveis em pH 4,6 são produzidos pela ação do coagulante residual e plasmina (FALLICO *et al.*, 2004; BYNUM & BARBANO, 1985; RANK *et al.*, 1985).

O fracionamento com TCA promove a precipitação de vários compostos nitrogenados, sendo que Kuchroo e Fox (1982) obtiveram uma precipitação de 50% com TCA 12%, incluindo peptídeos maiores e alguns de tamanho menor. A fração consiste de peptídeos pequenos, ácidos graxos livres e outros compostos nitrogenados produzidos por bactérias iniciadoras e não iniciadoras (FALLICO *et al.*, 2004). Esta técnica pode ser utilizada inclusive para sub-fractionar a fração nitrogenada solúvel em pH 4,6 (RANK *et al.*, 1985).

A utilização de etanol 70% para a precipitação de proteínas e peptídeos em queijos corresponde à quantidade extraída com TCA 12% (FALLICO *et al.*, 2004; RANK *et al.*, 1985). Kuchroo e Fox (1982) demonstraram, porém, que o etanol 70% precipita alguns peptídeos de baixos pesos moleculares não precipitados por TCA.

O fracionamento por PTA 5% é o mais seletivo e produz uma fração onde somente aminoácidos e peptídeos com um peso menor que 600 daltons são solúveis (RANK *et al.*, 1985).

Os parâmetros de textura em queijos podem ser avaliados de forma quantitativa, utilizando equipamentos analisadores de textura. Entre os parâmetros estão: a dureza, que é definida como a força (em Newtons, N) necessária para alcançar uma determinada deformação; a fraturabilidade é a força (em N) sob a qual o material sofre uma fratura; a elasticidade é a extensão a qual um material deformado retorna a sua condição não deformada, após a força de deformação ter sido removida (SALLAMI *et al.*, 2004).

2.5 Legislação para Leite e Queijo

Os parâmetros de qualidade para o leite cru refrigerado são definidos na Instrução Normativa N° 51, de 18/09/2002, que determina padrões físico-

químicos e microbiológicos. O leite cru deve ser avaliado quanto aos teores de gordura e proteína, densidade relativa, acidez em ácido láctico, extrato seco desengordurado, índice crioscópico, contagem padrão em placas, contagem de células somáticas, pesquisa de resíduos de antibióticos, monitoramento da temperatura no tanque de conservação do leite, de acordo com a frequência recomendada na legislação, além de controles diários na propriedade (BRASIL, 2002a). A Instrução Normativa N° 37, de 31/10/2000, fixa as condições de produção, identidade e requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano (BRASIL, 2000).

No Brasil, o MAPA estabeleceu o valor 1.000.000 células/mL de leite como limite máximo de CCS até julho de 2008, diminuindo progressivamente para 100.000 células/mL até julho de 2011 (BRASIL, 2002a). Nos Estados Unidos, o “Food and Drug Administration” (FDA) estabeleceu o valor 1.000.000 células/mL como limite máximo de CCS para ovelhas e cabras (PAAPE *et al.*, 2007). Para Pirisi *et al.* (apud JAEGGI *et al.*, 2003), os parâmetros de qualidade para CCS são: boa (abaixo de 500.000 células/ mL), média (500.000 a 1.000.000 células/mL) e ruim (acima de 1.000.000 células/mL).

A legislação brasileira exige que os queijos sejam avaliados para coliformes a 30°C, coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e fungos e leveduras, de acordo com a umidade que o queijo possui, além de teor de umidade e de gordura, necessários para a classificação do queijo (BRASIL, 1996b).

Segundo a legislação, alguns conservantes classificados como (*generally recognized as safe*) pelo FDA podem ser utilizados em queijos: ácido propiônico e propionatos e ácido sórbico e sorbatos (máximo 1000 mg/kg de queijo) para prevenção de bolores em queijos; nisina (máx. 12,5 mg/kg de queijo) como conservador em queijos; nitrato (máx. 50 mg/kg queijo em nitrato de sódio) (BRASIL, 1996b; JAY, 2000) é adicionado para controlar a formação de gás causada por *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum*; e ácido caprílico para prevenção de bolores em queijos embalados (JAY, 2000). A legislação brasileira determina que possam ser utilizados aditivos na elaboração de

queijos, tendo em vista para quais classes de queijo seu uso está autorizado, ou de acordo com padrões individuais de certas variedades particulares de queijo (BRASIL, 1996b).

A Comunidade Europeia através do Regulamento Nº. 2081/92, de 14 de julho de 1992, normatizou o procedimento relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos gêneros alimentícios. A regulamentação permite a definição de características qualitativas, os métodos de obtenção e a delimitação da área geográfica de produção (SCINTU & PIREDDA, 2007; CE, 2002). Um dos objetivos é unificar os diferentes conceitos para o termo “tipicidade”. A Denominação de Origem Protegida (PDO) e a Indicação Geográfica Protegida (PGI) apareceram como forma de proteger os produtos agroindustriais e recuperar a confiança do consumidor ao adquirir um produto típico (SCINTU & PIREDDA, 2007).

Para obter a PDO, o produto deve satisfazer duas condições: a matéria-prima crua deve ser produzida e processada até obter o produto final na área definida cujo nome acompanha o produto; a qualidade ou características do produto devem ser devidas essencialmente ou exclusivamente às características regionais deste local de origem (clima, solo e conhecimento tradicional) (PINTADO *et al.*, 2008; SCINTU & PIREDDA, 2007). A PGI também designa produtos ligados à região, mas a ligação é menos estrita que no caso da PDO. Um produto com PGI deve também satisfazer duas condições: deve ter sido produzido na região geográfica cujo nome acompanha o produto, mas é suficiente que um dos estágios de produção tenha ocorrido nesta região definida. Alguns ingredientes usados na produção podem vir de outra região. A outra condição para a PGI é que deve existir uma ligação entre o produto e a região que lhe dá nome, porém estas características não necessitam ser predominantes ou exclusivas como no caso da PDO (SCINTU & PIREDDA, 2007). A utilização do termo “Queijo da Serra da Estrela”, por exemplo, é prevista na regulamentação de PDO, concedida aos queijos produzidos nesta região específica de Portugal e que sigam os padrões de identidade e qualidade definidos na legislação (TAVARIA *et al.*, 2004). A PDO pode permitir variações no produto, como no caso do queijo Pecorino Sardo, que pode ser

produzido tradicionalmente com leite de ovelha cru e sem adição de cultura iniciadoras, ou com leite termizado e adicionando-se estas culturas (MADRAU *et al.*, 2006).

No Brasil, a Lei Nº 9.279/96 regulamenta os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial, incluindo em seu conteúdo as indicações geográficas para produtos alimentícios. Esta lei normatiza a utilização da indicação de procedência ou da denominação de origem, indicando que seu uso é restrito aos produtores e prestadores de serviço estabelecidos no local, exigindo-se, ainda, em relação às denominações de origem, o atendimento de requisitos de qualidade (BRASIL, 1996a).

2.6 Bactérias Lácticas

O leite cru constitui boa fonte de bactérias lácticas passíveis de serem utilizadas pela indústria de laticínios nacional, pelo fato de estarem adaptadas às condições do clima e da matéria-prima. As bactérias lácticas (LAB) têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos (ALEXANDRE *et al.*, 2002).

As bactérias lácticas constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos e catalase negativos muito heterogêneo. Os doze gêneros principais são *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* (ALEXANDRE *et al.*, 2002; JAY, 2000; O'SULLIVAN *et al.*, 2002), *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera* e *Weissella* (JAY, 2000). Após os *Enterococcus* e *Lactococcus* terem sido retirados do gênero *Streptococcus*, o *S. thermophilus* passou a ser o mais importante representante deste gênero em alimentos. Já o *S. diacetylactis* foi reclassificado como uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que metaboliza citrato. Outras bactérias relacionadas, mas não consideradas como lácticas são *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (JAY, 2000), apesar de a literatura consultada apresentar algumas divergências entre autores (ALEXANDRE *et al.*, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

As LAB necessitam para seu crescimento de aminoácidos pré-formados, vitaminas do complexo B e base purina e pirimidina. Embora sejam mesofílicas, algumas podem crescer abaixo de 5°C e outras até 45 °C. Com respeito ao pH, podem crescer em valores entre 3,2 e 9,6, mas a maioria cresce em intervalos de pH de 4,0 a 4,5. As bactérias lácticas são consideradas fracamente proteolíticas e lipolíticas (JAY, 2000).

As LAB desenvolvem uma rota essencial na fermentação de alimentos e são empregadas como culturas iniciadoras na produção de laticínios, carnes e produtos vegetais. A principal contribuição destes microrganismos ao produto é preservar as qualidades nutricionais do alimento cru, aumentando a vida de prateleira e inibindo bactérias patogênicas ou deteriorantes. Estudos demonstraram a inibição de *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* por inoculação com *Streptococcus diacetylactis* (O'SULLIVAN *et al.*, 2002), citado anteriormente como tendo sido reclassificado a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (JAY, 2000).

Embora o grupo de bactérias lácticas apresente heterogeneidade, todos os membros possuem a propriedade de produzir ácido láctico a partir de hexoses. A divisão do grupo em dois é baseada nos produtos finais do metabolismo da glicose, sendo que aqueles que produzem ácido láctico como o principal e único produto da fermentação da glicose são chamados homofermentativos. Os gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* são homofermentativos, juntamente com alguns *Lactobacillus*. Os homolácticos são capazes de extrair cerca de duas vezes mais energia de uma determinada quantidade de glicose, em relação aos heterolácticos. Este padrão homofermentativo é observado no metabolismo de glicose, mas não necessariamente na metabolização de pentoses, quando alguns homolácticos produzem ácido acético e ácido láctico a partir de pentoses. Isso pode ainda ser observado por alteração das condições de crescimento, tais como concentração de glicose, pH e limitação de nutrientes. As bactérias lácticas que produzem quantidades molares equivalentes de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir de hexoses são classificadas como heterofermentativas. Os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*

e alguns *Lactobacillus* são heterofermentativos. Os heterolácticos são mais importantes na produção de componentes relacionados ao sabor e aroma, tais como acetilaldeído e diacetil (JAY, 2000).

A literatura descreve que a maioria das bactérias lácticas não representa risco à saúde do consumidor, embasada no amplo emprego destas no processamento de alimentos e pela sua utilização como probióticos, com importantes resultados benéficos citados em publicações (DEL PIANO *et al.*, 2006; SALMINEN *et al.*, 1998). Existem, porém, relatos do envolvimento de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* em infecções, principalmente em indivíduos com baixa imunidade, e de expressão de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos por bactérias lácticas presentes em alimentos (KLARE *et al.*, 2007). Outra preocupação é o consumo por indivíduos considerados não saudáveis. A segurança das bactérias lácticas tem sido questionada, em função de casos isolados de infecções em humanos (FLÓREZ *et al.*, 2005; SALMINEN *et al.*, 1998). A eficiência de uma bactéria láctica utilizada como probiótico é limitada por fatores como: frequência e forma adequada de administração; seleção das cepas bacterianas apropriadas; possíveis efeitos adversos; resposta imune dos probióticos presentes na mucosa intestinal (PAVAN *et al.*, 2003). Os microrganismos probióticos poderiam estar relacionados com quatro tipos de efeitos adversos: infecções sistêmicas, risco de atividades metabólicas nocivas, risco de imunomodulação excessiva, e risco de transferência de genes (MARTEAU & SHANAHAN, 2003; SALMINEN *et al.*, 1998).

Os isolados de bactérias lácticas utilizados em alimentos devem ser inócuos aos consumidores dos produtos onde forem aplicados. Para tanto, existem critérios recomendados pela “Food and Agriculture Organization” (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliação de microrganismos utilizados em alimentos e as diretrizes recomendadas para probióticos. Inicialmente, deve-se proceder a identificação do gênero, espécie e linhagem, combinando-se testes fenotípicos e genotípicos. A identificação e a pesquisa na literatura podem indicar a segurança ou não da bactéria, descartando-se sua utilização em alimentos se fosse classificada como não

GRAS. A etapa subsequente de classificação deve seguir os testes mínimos recomendados para receber o *status* GRAS (DEL PIANO *et al.*, 2006; SALMINEN *et al.*, 1998), sendo que a ANVISA não apresenta metodologias específicas para comprovação do *status* GRAS, inclusive as legislações fazem referência aos protocolos e à classificação do FDA.

2.6.1 *Bactérias Lácticas em Queijos*

As bactérias lácticas são os microrganismos predominantes durante a produção e maturação de queijos, desenvolvendo um papel essencial nas características organolépticas dos queijos (PEREIRA *et al.*, 2008; SALLAMI *et al.*, 2004). O estudo da diversidade das bactérias lácticas envolvidas no processamento de queijos pode ser útil para: diferenciar os queijos; estabelecer os efeitos dos parâmetros tecnológicos sobre a especificidade da microbiota do queijo; desenvolver um sistema para estudo da dinâmica microbiana nas fermentações mistas; avaliar a contribuição real das diferentes espécies para a maturação dos queijos; obter informações sobre a diversidade microbiana (CODA *et al.*, 2006; DE ANGELIS *et al.*, 2001). Tais informações poderiam permitir a seleção das cepas adequadas para serem introduzidas como culturas iniciadoras em queijos com leite pasteurizado, de forma a reproduzir o sabor obtido em queijo fabricado com leite cru, ou a acelerar a maturação do queijo (DE ANGELIS *et al.*, 2001).

A capacidade de produzir ácido láctico a partir da lactose é provavelmente a propriedade mais importante destas bactérias. Isto auxilia na redução do pH, que por sua vez provoca a expulsão de soro da coalhada. Desta forma, ocorre diminuição no conteúdo de umidade e no risco de deterioração microbiológica. Durante a maturação do queijo, microrganismos patógenos são normalmente inibidos por bactérias lácticas. Este efeito depende do consumo de lactose com a consequente produção de ácido láctico e redução de pH, criando um ambiente desfavorável para o crescimento de patógenos (CARIDI, 2003). Variações são observadas com relação à produção de ácido láctico, sendo que *L. casei* e *L. plantarum*, por exemplo, produzem acima de 1,5% com uma temperatura de crescimento ótimo de 30°C, enquanto

L. acidophilus e *L. bulgaricus* podem produzir acima de 3% de ácido láctico em uma temperatura ótima de 40°C (JAY, 2000).

Nos últimos anos, é crescente o interesse nos estudos genotípicos e fenotípicos sobre os isolados obtidos em queijos artesanais produzidos principalmente sem a adição de culturas iniciadoras. O aumento das informações sobre a população microbiana presente em produtos lácteos pode ajudar a prevenir a perda da biodiversidade microbiana em alimentos típicos e, conseqüentemente, manter a grande variedade de queijos produzidos por diferentes métodos. A população microbiana endógena presente no leite cru pode ser conservada e selecionada durante a produção do queijo (MADRAU *et al.*, 2006; MARTUSCELLI *et al.*, 2005; FORTINA *et al.*, 2003).

Dentre as bactérias que convertem lactose em ácido láctico, usualmente estão incluídas *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ou *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Quando compostos envolvidos em sabor e aroma são desejados nos queijos, as bactérias lácticas utilizadas incluirão heteroláticas, tais como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ou *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (JAY, 2000).

O interesse no caráter único de um produto tradicional e fabricado de forma artesanal, especialmente aqueles com a Denominação de Origem Protegida (DPO), tem aumentado o interesse na caracterização das cepas endógenas envolvidas na produção de queijos (DELGADO & MAYO, 2004). Na avaliação de bactérias lácticas em queijos do Azeitão, Évora, Serpa, Serra da Estrela e La Serena, as espécies mais freqüentes foram *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis* e *Pediococcus* spp. (FREITAS & MALCATA, 2000). A avaliação em queijos italianos produzidos com leite ovino identificou várias espécies de *Lactobacillus*, mas

Lactobacillus plantarum e *Lactobacillus paracasei* foram dominantes (CODA *et al.*, 2006).

As bactérias *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus brevis* foram as espécies isoladas em diferentes tempos de maturação de queijo Pecorino Sardo tradicional, sendo que as mesmas haviam sido identificadas em leite cru de ovelha (MADRAU *et al.*, 2006).

2.6.2 Culturas Iniciadoras e não Iniciadoras em Queijos

As bactérias lácticas são usadas como iniciadoras (*starter*) naturais ou selecionadas nos processos fermentativos em alimentos, onde produzem acidificação, devido à produção dos ácidos láctico e acético, e compostos relacionados ao sabor. As culturas iniciadoras produzem uma ampla variedade de metabólitos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, diacetil, acetoína, peróxido de hidrogênio, compostos antifúngicos (ácidos graxos ou ácido fenilacético) e bacteriocinas. Esta atividade antimicrobiana pode contribuir para a melhoria da qualidade de alimentos fermentados, por exemplo, no controle de patógenos, aumentando a vida de prateleira e melhorando as características sensoriais (CORSETTI *et al.*, 2004; O'SULLIVAN *et al.*, 2002; BLAIOTTA *et al.*, 2001; JAY, 2000).

As bactérias iniciadoras podem ser divididas em dois grupos: iniciadoras primárias e iniciadoras secundárias. A rota das culturas iniciadoras primárias é garantir um desenvolvimento consistente de ácido durante a produção do queijo. Este grupo está envolvido na degradação de proteína e gordura durante a maturação. As culturas neste grupo também desenvolvem um papel importante na produção biológica do produto, por exemplo, diminuindo o pH e produzindo bacteriocinas (EL SODA *et al.*, 2000). As iniciadoras secundárias representam culturas que são adicionadas a uma variedade limitada de queijos a fim de desempenhar funções bem definidas. Como exemplos, a *Propionibacterium shermanii* subsp. *freudenreichii* em queijo tipo Suíço para

assegurar a produção de gás, e *Brevibacterium linens* para contribuir na coloração de queijos maturados superficialmente. *Penicillium roqueforti* e *Penicillium camemberti* também podem ser considerados como microrganismos iniciadores secundários. Além disso, bactérias iniciadoras secundárias, através de seus sistemas enzimáticos diversos, podem estar também altamente envolvidas no processo de maturação. Suas contribuições são indispensáveis para o desenvolvimento do sabor de muitos queijos, tais como Roquefort, Emmental, Camembert e Limburger (SOUSA *et al.*, 2001; EL SODA *et al.*, 2000).

A diversidade de culturas iniciadoras usadas na fermentação láctea industrial é baixa e existe um aumento na demanda de novas cepas (bactérias lácticas iniciadoras e não iniciadoras) para produção de queijos, já que podem apresentar efeitos benéficos sobre as características dos queijos. Embora a composição e desempenho possam ser variáveis, as culturas iniciadoras naturalmente encontradas têm propriedades interessantes: são relativamente imunes ao ataque por fagos; são capazes de produzir bacteriocinas; são uma fonte rica de biotipos diferentes, contribuindo para a produção do sabor e aroma dos queijos típicos (DELGADO & MAYO, 2004; FORTINA *et al.*, 2003). Por outro lado, a presença de quantidades relevantes de aminas biogênicas pode estar relacionada à atividade de bactérias lácticas iniciadoras em queijos, onde as peptidases liberadas por estes microrganismos seriam essenciais para fornecer os aminoácidos precursores para a produção das aminas (MARTUSCELLI *et al.*, 2005).

As culturas iniciadoras podem consistir em linhagens isoladas ou mistas. Os *Lactococcus* geralmente correspondem a 90% de culturas iniciadoras mistas para produtos lácteos e uma boa cultura converte a maior parte da lactose a ácido láctico. A acidez titulável pode aumentar a 0,8-1%, calculado como ácido láctico, e o pH normalmente diminui para 4,3-4,5 (JAY, 2000). As culturas iniciadoras comumente utilizadas na fabricação de queijos incluem as espécies mesofílicas de *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e as espécies termofílicas de *Lactobacillus* e *Streptococcus thermophilus*. A principal rota está na produção de ácido láctico e diminuição do pH. Embora as bactérias lácticas

tenham limitada atividade proteolítica, possuem um sistema proteinase/peptidase muito abrangente, capaz de hidrolisar oligopeptídeos a pequenos peptídeos e aminoácidos (SOUSA *et al.*, 2001).

A seleção da cultura iniciadora pode diferir de acordo com o tipo de queijo, em função da quantidade de calor aplicada à massa coalhada. *S. thermophilus* é utilizado para produção de ácido em coalhadas que passam por cocção, devido a sua maior tolerância ao calor. Podem ser utilizadas ainda combinações entre *Streptococcus thermophilus* e *L. lactis* subsp. *lactis* em coalhadas que recebem cocção intermediária (DELGADO & MAYO, 2004; FORTINA *et al.*, 2003). O *S. thermophilus* foi identificado em queijo Pecorino Sardo e pode ser inoculado em leite termizado para produção deste queijo em escala industrial (MADRAU *et al.*, 2006). As bactérias lácticas em leite cru de ovelha e queijo Pecorino Sardo fabricado de maneira tradicional foram identificadas e selecionadas, em função da acidificação, crescimento e atividade proteolítica. Esta seleção permitiu a preparação de culturas iniciadoras autóctones para inoculação em queijos, incluindo espécies potencialmente probióticas, como *Lb. casei* subsp. *casei* (MADRAU *et al.*, 2006).

As cepas de *Lactococcus* vêm sendo usadas como iniciadoras para a fabricação de queijos e outros produtos lácteos fermentados. Dentre as diferentes espécies incluídas, somente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* têm importância tecnológica (DELGADO & MAYO, 2004). Durante o período inicial de processamento de queijo de leite de ovelha, predominam os *Lactobacillus* mesofílicos, sendo *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus plantarum* como os mais frequentemente isolados (DE ANGELIS *et al.*, 2001).

O envolvimento das bactérias lácticas não iniciadoras durante a maturação dos queijos ainda não está elucidado, embora se saiba que a inclusão de culturas auxiliares ou o uso de leite cru durante a fabricação dos queijos aumenta o nível de aminoácidos, peptídeos, e ácidos graxos livres,

acentuando o sabor e o aroma e acelerando o período de maturação (DE ANGELIS *et al.*, 2001; RODRIGUÉZ *et al.*, 2000). Os níveis de bactérias lácticas em leite cru têm diminuído na Europa, devido à refrigeração do leite e à aplicação das normas de higiene. Por outro lado, o número de cepas usadas na fermentação láctica industrial é relativamente baixo. O leite cru representa uma importante fonte de novas cepas com potencial para inibir a microbiota indesejada e para ser usado na biopreservação de laticínios (RODRIGUÉZ *et al.*, 2000).

As bactérias lácticas não iniciadoras normalmente encontram-se em pequeno número na coalhada fresca, sendo a microbiota dominante do queijo após maturação. Em contraste às culturas iniciadoras, estas bactérias toleram o ambiente desfavorável do queijo durante a maturação (CODA *et al.*, 2006; DE ANGELIS *et al.*, 2001). Durante esta fase, observa-se umidade de 32 a 39%, com 4 a 6% de sal, pH entre 4,9 e 5,3 e uma deficiência de nutrientes (DE ANGELIS *et al.*, 2001). Estas bactérias crescem em temperaturas baixas, são ácido-tolerantes, suportam a perda de carboidratos fermentáveis, baixa a_w e a presença de bacteriocinas. As bactérias lácticas não iniciadoras encontram componentes para seu crescimento no período de maturação de queijos maturados (ex.: lactato, citrato, glicerol, aminoácidos e outros metabólitos) (CODA *et al.*, 2006).

As bactérias lácticas não iniciadoras têm demonstrado contribuir no desenvolvimento de sabor em algumas variedades de queijos e podem ser consideradas como um contaminante desejável. Cepas de *Lactobacillus* são os mais comuns e encontradas em grandes quantidades. *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* e *L. curvatus* são as espécies predominantes. *Pediococcus* e *Enterococcus* também são membros do grupo de bactérias não iniciadoras, mas normalmente presentes em menor número (EL SODA *et al.*, 2000). Dentre as bactérias não iniciadoras encontradas em queijo Cheddar, 64% foram espécies de *Lactobacillus*, 32% *Streptococcus thermophilus* e 4% espécies de *Lactococcus* (SWEARINGEN *et al.*, 2001).

Culturas adjuntas podem ser definidas como linhagens selecionadas de microrganismos relacionados aos queijos e que são adicionados durante a produção destes alimentos para melhorar a qualidade sensorial ou acelerar o processo de maturação, diminuindo assim o custo de processamento. Ao contrário das bactérias não iniciadoras que estão naturalmente presentes, as culturas adjuntas são especificamente selecionadas e intencionalmente adicionadas para suplementar a microbiota e aprimorar a qualidade do queijo pronto (EL SODA *et al.*, 2000).

As pesquisas com culturas adjuntas têm estudado a aplicação de culturas não viáveis (atenuadas) ou viáveis (não atenuadas) em queijos. No segundo caso, buscam-se formas de aplicar as enzimas microbianas intracelulares e garantir sua distribuição e rápida liberação durante o processo. A seleção das culturas adjuntas apropriadas deve estar baseada na capacidade de desenvolvimento das características sensoriais, mas principalmente nos perfis enzimáticos (nível e especificidade das enzimas) e propriedades autolíticas. As culturas podem ser selecionadas em função de possuir aminopeptidases altamente específicas, garantindo a redução de sabor amargo em queijos, por exemplo. Já a autólise de culturas iniciadoras e adjuntas durante o processo de maturação resulta na liberação de enzimas intracelulares na matriz da coalhada, intensificando o desenvolvimento de sabor e aroma (EL SODA, *et al.*, 2000).

Os queijos Cheddar produzidos com culturas adjuntas, que incluíam *Lactobacillus*, apresentaram valores significativamente menores de dureza, fraturabilidade e elasticidade. A utilização da cepa *Lb. bulgaricus* UL12 aliada à outra cepa produtora de nisina causou um aumento na proteólise do queijo e um melhora na textura do queijo Cheddar (SALLAMI *et al.*, 2004).

O *Lactobacillus helveticus* tem sido usado como cultura adjunta na produção de queijos semi-duros com baixo teor de gordura, promovendo aumento dos níveis de proteólise, diminuição do sabor amargo e intensificação dos sabores desejáveis (BARROS *et al.*, 2006).

Embora a maioria dos queijos maturados seja resultado de atividades metabólicas de bactérias lácticas, várias queijos tradicionais possuem características particulares devido à utilização de outros tipos de microrganismos. Em queijo Suíço, uma cultura mista de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* é aliada a uma cultura de *Propionibacterium shermanii*, adicionada em função do desenvolvimento de sabor e da formação de olhaduras no queijo. Para produção de queijos azuis, como o Roquefort, a coalhada é inoculada com esporos de *Penicillium roqueforti*, que afeta a maturação do queijo e é responsável pelo aparecimento das veias verde-azuladas características deste tipo de queijo. De uma maneira similar, o leite ou a superfície do queijo Camembert é inoculada com esporos de *Penicillium camemberti* (JAY, 2000).

2.6.3 Bacteriocinas produzidas por Bactérias Lácticas

Estudos demonstram que as bacteriocinas podem ser isoladas a partir de diferentes alimentos contendo bactérias lácticas, indicando muitas destas substâncias vem sendo consumidos há tempos e que sua reintrodução em alimentos não estaria associada a problemas de segurança dos alimentos ou toxicológicos (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). Recentemente, o foco tem sido no uso de bactérias lácticas como probióticos, sendo que os benefícios deste uso podem ser atribuídos às bacteriocinas produzidas por elas (YAMATO *et al.*, 2003). Várias cepas de bactérias lácticas associadas a alimentos produzem bacteriocinas, definidas como compostos protéicos com atividade antimicrobiana contra espécies relacionadas (RODRIGUÉZ *et al.*, 2000).

As bacteriocinas são compostos antimicrobianos produzidos por diferentes espécies bacterianas. São peptídeos ou pequenas proteínas que inibem microrganismos através do modo de ação bactericida ou bacteriostático. Um microrganismo produtor de bacteriocina fica protegido contra seu próprio composto antimicrobiano por um sistema de imunidade, que é expresso concomitantemente ao peptídeo antimicrobiano (CORSETTI *et al.*, 2004; O'SULLIVAN *et al.*, 2002; YAMATO *et al.*, 2003).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são divididas em classes. A Classe I consiste de pequenos peptídeos termoestáveis que são caracterizados pela presença de aminoácidos sulfurados modificados, como lantionina, β -metil-lantionina e deidrobutirina, normalmente referidos como lanbióticos. A Classe II compreende um grupo de peptídeos não-modificados, hidrofóbicos e termoestáveis, com tamanhos menores que 10 kDa. A Classe III consiste em bacteriocinas termolábeis e hidrofílicas, com tamanhos acima de 30 kDa (NASCIMENTO *et al.*, 2008; CORSETTI *et al.*, 2004; O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* que foi patenteada em 1954, na Inglaterra, para ser utilizada em queijos para controlar defeitos causados por *Clostridium* (JAY, 2000). É efetiva contra patógenos presentes em alimentos, como a *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, e muitos outros microrganismos Gram-positivos que deterioram alimentos. A nisina é uma bacteriocina considerada com *status* GRAS de FDA para utilização em alimentos, sendo a mais estudada e com aplicação ampla na indústria alimentícia (JAY, 2000; CARIDI, 2003; O'SULLIVAN *et al.*, 2002). É usada como aditivo alimentar em mais de 40 países, particularmente, em queijo processado, produtos lácteos e alimentos enlatados. Nestes casos, a bacteriocina é incorporada ao produto como um pó concentrado (CARIDI, 2003; O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

A nisina é utilizada na prevenção da formação de olhaduras defeituosas em queijos, sendo que sua aplicação inclui a inibição de *Listeria monocytogenes* em queijo Camembert ou em queijos tipo Ricotta, e de *L. innocua* em queijo Manchego (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que nisina adicionada ao leite na produção de queijo branco, ou produzida *in situ* por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* em queijo semi-duro, mostrou efeito bactericida sobre *S. aureus*, mas a completa eliminação do patógeno foi obtida com a adição de nisina em diferentes etapas do processo (ARQUÉS *et al.*, 2005). Uma alternativa para introduzir as bacteriocinas nos alimentos seria o uso de culturas vivas, que produziriam os compostos *in situ* (CARIDI, 2003; O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

Uma cepa produtora de nisina, *Lactococcus diacetylactis* UL719, aumentou mais rapidamente os níveis de aminoácidos livres durante a maturação de queijo Cheddar, comparada a cepas de *Lactobacillus*. Isso pode ser atribuído à autólise da subpopulação de culturas iniciadoras sensíveis à nisina (SALLAMI *et al.*, 2004).

A lacticina 3147 tem sido eficiente na inibição de *L. monocytogenes* em queijo Cottage e controle do crescimento de bactérias lácticas não iniciadoras em queijo Cheddar. A pediocina PA-1 produzida por cepas de *Pediococcus* e *Lactobacillus* reduziu os níveis de *L. monocytogenes* sobre a superfície de queijo Munster (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Este efeito de controle de *L. monocytogenes* por pediocina produzida por *Lactococcus lactis* também foi observado em queijo Cheddar (JAY, 2000).

As bacteriocinas de *Enterococcus* têm demonstrado uma forte atividade anti-*Listeria* em leite e queijos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* estão envolvidos na produção de bacteriocinas em queijos produzidos com leite ovino (CARIDI, 2003).

A atividade antibacteriana de peptídeos obtidos a partir dos extratos solúveis em água de nove variedades de queijos italianos foi testada por Rizzello *et al.* (2005). Os queijos manufaturados a partir de leite de ovelha, vaca ou cabra apresentaram potencial para gerar peptídeos similares com atividade antimicrobiana (RIZZELO *et al.*, 2005). Outros peptídeos bioativos já haviam sido encontrados em queijos: a α_{S1} -casoquinina atua no controle da pressão arterial (fragmento 22-30 da α_{S1} -CN ovina em Pecorino Romano, e fragmento 24-33 da α_{S1} -CN bovina em Canestrato Pugliese); a isracidina (fragmento 10-21 da α_{S1} -CN ovina em Pecorino Romano) e a kappacina (fragmento 106-169 da k-CN bovina em Canestrato Pugliese e Crescenza), ambas com atividade antibacteriana; a casoplatelina com atividade antitrombótica (fragmento 106-115 da κ -CN bovina, em Canestrato Pugliese e Crescenza); e a β -casomorphina-11 que atua como opióide (fragmento 60-68

da β -CN caprina, em queijo Caprino del Piemonte) (RIZZELO *et al.*, 2005; SPADOTI & MORENO, 2008).

2.6.3.1 Fatores que afetam as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas

Há um interesse crescente no uso das bacteriocinas como conservantes naturais em alimentos, o que tem levado à pesquisa destas proteínas inibidoras. A aplicação é limitada por propriedades individuais, tais como espectro de inibição, estabilidade térmica, solubilidade, entre outras. Para aplicação em alimentos, deveriam ser considerados os seguintes pontos na seleção de cepas produtoras de bacteriocinas: a cepa produtora ser reconhecida como segura; a bacteriocina ter um amplo espectro de inibição, incluindo *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*, ou ser específica contra um patógeno particular; ser estável ao calor; não estar associada com riscos à saúde; proporcionar efeitos benéficos ao produto, como segurança, qualidade e sabor; e ter uma atividade altamente específica (O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

As condições ambientais ideais para que a bactéria produtora produza bacteriocinas devem ser observadas, considerando-se temperatura, pH, atmosfera e composição do meio de cultura ou do alimento. As temperaturas de incubação e os valores de pH aos quais as bactérias estão expostas podem afetar a produção de bacteriocinas, sendo que devem ser testadas diferentes faixas de temperaturas e pH. Podem ser avaliados os valores padrão para crescimento da bactéria citados na literatura, bem como as condições às quais o alimento será submetido, como no caso da maturação de queijos. Esta avaliação torna-se necessária, porque a temperatura e pH ótimos para crescimento bacteriano podem não ser os mesmos que para a produção de bacteriocinas (CARIDI, 2003; GÄNZLE *et al.*, 2000). As condições ótimas de produção das bacteriocinas não coincidiram com as do crescimento bacteriano para *Leuconostoc mesenteroides* L124 e *Lactobacillus curvatus* L442. Para crescimento das bactérias, os valores de pH foram 6 a 6,5, em temperatura de

30°C, e para a produção de bacteriocina foram pH 5,5 a 25°C (BROMBERG *et al.*, 2006).

Como as bacteriocinas possuem natureza protéica, a composição nutricional do meio deve fornecer compostos nitrogenados para a produção destas substâncias (BROMBERG *et al.*, 2006; GÄNZLE *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ, 2000). A presença de substâncias inibidoras pode afetar o metabolismo das bactérias lácticas, comprometendo seu desenvolvimento e a síntese de bacteriocinas. A atmosfera gasosa pode atuar como um fator estimulante ou limitante para crescimento das bactérias lácticas e, conseqüentemente, para produção de bacteriocinas. A literatura relata ainda que algumas bactérias produzem bacteriocinas em condições de estresse e que a presença de microrganismos competidores pode ser um fator para estimular a produção de bacteriocinas, já que estas atuam como um mecanismo de defesa das bactérias produtoras (NEYSENS *et al.*, 2003).

Outro fator que pode interferir na avaliação real da atividade da bacteriocina é a presença de outros compostos produzidos pelas bactérias lácticas, que possuem ação antimicrobiana, como ácidos, peróxido de hidrogênio, gás carbônico, álcool e aldeído. Alguns reagentes devem ser adicionados ao meio, para que estes compostos não gerem erros de interpretação dos resultados atribuídos às bacteriocinas (CARIDI, 2003; BROMBERG *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

2.6.3.2 Fatores que influenciam a eficácia da bacteriocina no alimento

A contaminação inicial do produto influenciará a atividade das bacteriocinas, já que os microrganismos presentes poderão produzir enzimas ou metabólitos que afetem a integridade destes compostos. A presença de microrganismos proteolíticos, ou mesmo de enzimas proteolíticas isoladas, poderia afetar a eficácia da bacteriocina, devido a sua natureza protéica. Por este motivo, os estudos para verificar a eficácia da bacteriocina devem utilizar diferentes enzimas proteolíticas e verificar se acarretam perda de sua atividade antimicrobiana (GÄNZLE *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ, 2000; YAMATO *et al.*, 2003).

As condições de temperatura empregadas no processamento do alimento devem ser definidas tendo como base a termoestabilidade da bacteriocina aplicada neste alimento e a combinação de tempo e temperatura que a bacteriocina suporta. Geralmente, são testadas temperaturas de congelamento, de refrigeração e de aquecimento que chegam até 121°C para avaliar a estabilidade térmica da bacteriocina (BROMBERG *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; YAMATO *et al.*, 2003). Da mesma forma, o pH da formulação do alimento é um limitante, já que pode afetar a estabilidade ou diminuir o efeito das bacteriocinas. Os valores de pH normalmente testados para avaliar a estabilidade e atividade das bacteriocinas variam na faixa entre 2 e 12 (BROMBERG *et al.*, 2006; GÄNZLE *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; YAMATO *et al.*, 2003).

As bacteriocinas podem ainda ser precipitadas, complexadas ou inativadas na presença de alguns metais, sais, resíduos de solventes, emulsificantes ou detergentes presentes em compostos que entrem em contato com o alimento (BROMBERG *et al.*, 2006). Deve-se observar também que sua eficácia depende da utilização de concentrações adequadas para o alimento em teste, sendo necessária a determinação da curva dose-resposta frente a diferentes bactérias (GÄNZLE *et al.*, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; YAMATO *et al.*, 2003). Além disso, a susceptibilidade dos microrganismos presentes (O'SULLIVAN *et al.*, 2002), a fase da curva de crescimento microbiano onde se encontram e o grau de injúria dos microrganismos interferem em sua redução ou eliminação pelas bacteriocinas. Estes parâmetros podem ser avaliados, simulando diferentes condições de temperatura, de pH e de composição de meio, frente a diferentes microrganismos, para avaliar a atividade em cada uma das condições isoladas ou combinadas (GÄNZLE *et al.*, 2000). A literatura cita que agentes quelantes como EDTA, ácidos graxos ou aplicação de estresse subletal, como calor ou congelamento, pode romper a camada de lipossacarídeo da parede celular das bactérias gram-negativas, aumentando sua sensibilidade às bacteriocinas (GÄNZLE *et al.*, 2000).

A nisina é uma molécula solúvel na fase aquosa e liga-se aos fosfolipídios da membrana celular bacteriana, podendo atuar através da

formação canais iônicos. Sua atividade pode ser afetada pelas características físico-químicas do alimento, como umidade, pH, gordura, concentração, ou ainda pela utilização da bacteriocina nisina purificada ou sua produção *in situ* pela aplicação da bactéria que a produz (GLASS & DOYLE, 2005). As bactérias produtoras de nisina apresentam menores taxas de desenvolvimento de acidez no alimento, atividade proteolítica limitada e menor capacidade de fermentar sacarose (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). No caso da atividade antibotulínica em queijos (GLASS & DOYLE, 2005; O'SULLIVAN *et al.*, 2002), observou-se que o efeito é diminuído em pH neutro, provavelmente porque sua solubilidade é muito maior em pH 2 do que em pH 8. Os teores elevados de gordura também afetaram negativamente o efeito antimicrobiano da nisina. A explicação provável para o efeito da gordura poderia ser a formação de um ambiente seguro para a bactéria, protegendo-a dos antimicrobianos presentes na fase aquosa do produto. Além disso, a porção lipofílica dos compostos antimicrobianos poderia interagir com as moléculas de gordura em maior grau, do que com os fosfolípidios das membranas bacterianas, diminuindo assim seu efeito sobre estas (GLASS & DOYLE, 2005).

A utilização de nisina em queijos interfere na eficácia da cultura iniciadora e na maturação do queijo, o que diminui o interesse para utilização nestes produtos (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). Além disso, um estudo comparativo entre lacticina, enterocina e nisina, em queijo produzido com leite cru, observou que após 60 dias a atividade da nisina diminuiu, provavelmente devido à elevação do pH no queijo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que a nisina apresenta baixa atividade em temperaturas inferiores a 7°C, porque, nestas condições, ocorre a alteração da disposição das moléculas presentes na membrana citoplasmática de alguns microrganismos, ocasionando diminuição da fluidez e podendo inibir a inserção deste composto (BROMBERG *et al.*, 2006). Este resultado indicaria ser inadequada sua utilização em alimentos refrigerados.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados na forma de artigos enviados para publicação em revistas científicas, sendo que cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos.

3.1 Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal produzido com leite de ovelha

Cássia Regina Nespolo, Jaslin Alexandra Settin Taffarel, Adriano Brandelli

- Submetido ao *Acta Scientiae Veterinariae*

3.2 Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese

Nespolo, Cássia Regina; Brandelli, Adriano

- Submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology*

3.3 Characterization of ovine Fascal cheese produced with autochthonous cultures

Cássia Regina Nespolo, Ana Paula Folmer Correa, Ana Carolina Ritter and Adriano Brandelli

- Submetido ao *Journal of Dairy Research*

3.4 Effect of calcium on ovine caseinate functional properties

Cássia R. Nespolo, Anselmo D. Reggiardo, Manuel A. Mancilla Canales, Estela M. Alvarez, Adriano Brandelli, Patricia H. Risso

- Submetido ao ***Food Hydrocolloids***

3.5 Acid Aggregation and Gelation of Ovine Caseinate. Effect of Sucrose and Lactose

Cássia R. Nespolo, María E. Hidalgo, Jorge R. Wagner, Adriano Brandelli, Patricia H. Risso

- Submetido ao ***Journal of Agricultural and Food***

3.1 ARTIGO 1

3.1.1 *Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal produzido com leite de ovelha*

Microbiological and physicochemical parameters during the production and ripening of Fascal cheese from ewe's milk

3.1.2 *Resumo*

A produção de produtos lácteos de ovelha pode proporcionar uma alternativa rentável, em relação aos produtos de leite bovino, devido ao sabor e textura específicos. Leites ovino e caprino podem ser utilizados em diferentes aplicações e tem-se tornado um meio muito importante para a economia em regiões geográficas subdesenvolvidas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade o leite de ovelha e do queijo Fascal produzido com este leite, na região metropolitana de Porto Alegre, RS. As amostras de queijo foram analisadas no 1º, 30º, 60º e 90º dias de maturação para verificar possíveis alterações nos parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Estas amostras foram mantidas em câmara refrigerada durante o período de maturação. Os resultados indicaram ausência de *Salmonella* spp. em todas as amostras analisadas. As contagens de aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e coliformes fecais obtiveram resultados considerados aceitáveis, de acordo com a legislação brasileira para cada alimento. Os parâmetros físico-químicos em leite ovino apresentaram valores semelhantes aos encontrados em amostras de leite de ovelha provenientes do sul do Brasil. Em função dos resultados, concluímos que as características físico-químicas do queijo foram modificadas durante a maturação, com diminuição no conteúdo de umidade e aumento nos teores de proteína e gordura. O produto final foi classificado como um queijo gordo e de baixa umidade.

Descritores: queijo; leite de ovelha; maturação; avaliação da qualidade.

3.1.3 Abstract

Production of dairy products from ewes can provide a profitable alternative to cow milk products owing to their specific taste and texture. Sheep and goat milks can be used for different purposes and has become a very important mean for the economy in undeveloped geographic areas. The main objective of this study was to evaluate the quality of ewe milk and Fascal cheese produced in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. Cheese samples were analyzed on the 1st, 30th, 60th and 90th days to detect possible microbiological and physicochemical changes. They were kept refrigerated during ripening. The results indicated the absence of *Salmonella* spp. in all the samples evaluated. The counts of aerobic mesophilic, coagulase-positive staphylococci, total coliforms and faecal coliforms conformed to the Brazilian official requirements for these products. The physicochemical parameters showed that in general the ovine milk analyzed had similar values to those observed in the south of Brazil. According to the results, it was concluded that the physicochemical characteristics of the cheese were altered during the ripening, showing moisture losses and a rise in the concentrations of protein and fat. The final product was classified as a cheese with high fat content and low moisture.

Keywords: cheese; ovine milk; ripening; quality evaluation.

3.1.4 Introdução

O rebanho ovino é o quarto no Brasil e o Rio Grande do Sul é principal produtor [11]. O leite de ovelha corresponde a 1,3% da produção mundial [7], com destaque para a produção de queijos finos na Europa [19]. No Brasil, os primeiros ovinos da raça Lacaune foram introduzidos em 1992 e estão bem adaptados às condições de clima e alimentação do sul do país, com produção de leite média diária de 1,3 L por ovelha [2]. O leite de ovelha é uma matéria-prima valores de proteína, gordura, cinzas e densidade maiores, em comparação ao leite bovino [18].

A produção de queijos com leite não submetido ao tratamento térmico é permitida pela legislação brasileira, desde que o período de maturação seja

maior que 60 dias [12]. O leite de ovelha cru contém um número muito maior de cepas diversas [5] e constitui boa fonte de bactérias lácticas, que desempenham importante papel na fermentação e nas características sensoriais dos produtos lácteos [6]. Por outro lado, a utilização deste leite cru pode favorecer patógenos contaminantes, como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* [3], e levar a surtos associados com *Staphylococcus* nestes produtos [1].

A criação de ovelhas para produção de leite e de queijos no RS despertou o interesse no acompanhamento ao longo das etapas de fabricação do queijo Fascal, o primeiro desenvolvido no Brasil, produzido com leite cru de ovelha da raça Lacaune e comercializado no mercado regional. O estudo foi realizado durante a produção e ao longo de seu período de maturação, com o objetivo de avaliar parâmetros químicos e microbiológicos e classificar o produto final, com base nos parâmetros estabelecidos na legislação vigente para queijos.

3.1.5 Materiais e Métodos

3.1.5.1 Material

O trabalho foi realizado em uma indústria de laticínios no município de Viamão/RS, que processa leite produzido por ovelhas da raça Lacaune. O município participa com 35,7% do rebanho ovino e com 21,2% da produção de leite microrregionais [11]. Foram coletadas amostras do leite de ovelha utilizado para a produção do queijo e amostras do queijo Fascal durante a produção e ao longo do período de maturação, até obtenção de um produto maturado por noventa dias. No total, foram feitas quatro coletas: coleta 1 (1° dia), coleta 2 (30° dia), coleta 3 (60° dia) e coleta 4 (90° dia). O queijo foi obtido de acordo com o protocolo de produção adotado pela indústria, utilizando leite de ovelha cru, adição de acidificante e de *starter* comercial, com maturação em câmara refrigerada a 10°C. A indústria seguiu os procedimentos de boas práticas de fabricação, desde a ordenha até a obtenção do produto final. As amostras foram colocadas em embalagens estéreis, identificadas e transportadas em condições refrigeradas até o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

(ICTA) / UFRGS, onde foram realizadas todas as análises microbiológicas e físico-químicas.

3.1.5.2 Análises microbiológicas

As análises foram selecionadas com base nas análises microbiológicas exigidas pela legislação brasileira para leite cru e para queijo [12, 13, 16]. Foram realizadas as de coliformes a 30°C, coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp e Contagem Padrão em Placas. As metodologias seguiram os procedimentos descritos nos “Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água” [14].

3.1.5.3 Análises físico-químicas

Foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: umidade, gordura, proteína, cinzas, glicídios, acidez e densidade. A proteína foi avaliada pelo método de Kjeldahl (fator de conversão 6,38). A determinação do teor de umidade foi feita pela secagem até obtenção de peso constante. A determinação do teor de gordura ou matéria gorda foi realizada com o auxílio do butirômetro de Gerber, em amostras de leite, ou através do método de Soxhlet. O teor de glicídios redutores em lactose foi obtido através do método de Lane-Eynon. Todas as metodologias seguiram os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos [15]. A determinação do índice de acidez titulável foi expressa em ácido láctico e a leitura de densidade foi em termolactodensímetro a 15°C [10]. As análises foram realizadas em triplicata.

3.1.5.4 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises físico-químicas foram avaliados através da análise de variância, complementado com o teste de comparações múltiplas de

Student-Newmann-Keuls. As diferenças estatisticamente significativas foram para $p < 0,05$.

3.1.6 Resultados

3.1.6.1 Análises microbiológicas

Os resultados verificados no leite de ovelha cru, utilizado para o preparo do queijo analisado, indicaram o valor de $5,0 \times 10^4$ UFC/mL para Contagem Padrão em Placas. Os demais resultados foram ausência de *Salmonella* sp em 25g e $3,3 \times 10^3$ UFC/mL para *Staphylococcus* coagulase positiva. Para coliformes a 30°C e Coliformes a 45°C, os valores foram de $2,2 \times 10^2$ NMP/mL e $1,1 \times 10^2$ NMP/mL, respectivamente.

As avaliações microbiológicas no queijo Fascal foram realizadas mensalmente, a partir do momento da fabricação até o período final da maturação. A primeira coleta foi realizada na massa coalhada colocada na forma e após completar o tempo de prensagem padrão para este queijo. Os resultados das coletas são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 (5). Análises microbiológicas realizadas no queijo Fascal ao longo do período de maturação.

Análise Microbiológica	Queijo (1° dia)	Queijo (30° dia)	Queijo (60° dia)	Queijo (90° dia)	Padrão
Coliformes a 30°C (NMP/g)	$2,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^1$	$2,6 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$ ^(a)
Coliformes a 45°C (NMP/g)	$1,1 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	0,9	<0,3	$5,0 \times 10^2$ ^(a, b)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)	$2,5 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$ ^(a, b)
<i>Salmonella</i> sp (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente ^(a, b)

^aPadrões para Queijo de Baixa Umidade [12]; ^b Padrões para Queijo de Baixa Umidade [16].

3.1.6.2 Análises físico-químicas

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos do leite cru e nos diferentes tempos de maturação do queijo de leite de ovelha estão expressos na Tabela 2. Além dos resultados para leite ovino cru apresentados na Tabela 2, foram ainda obtidos o valor médio de densidade a 15°C de 1,037g/mL e o valor médio de acidez de 0,15g de ácido láctico por 100mL de leite.

Os valores médios para umidade, proteína, gordura, cinzas e glicídios, no queijo Fascal recém-produzido e ao longo de seu período de maturação, estão apresentados Tabela 2. O conteúdo de umidade do queijo, ao final de noventa dias de maturação, foi de 32,14%, o que fez com fosse classificado como queijo de baixa umidade, geralmente conhecido como queijo de massa dura. No cálculo do teor de gordura no extrato seco, o valor obtido foi de 54,92%, classificando-o como um queijo gordo [12].

Tabela 2 (6). Análises físico-químicas realizadas no leite cru e no queijo Fascal, ao longo do período de maturação.

Análise Físico-Química	Leite de Ovelha Cru	Queijo (1º dia)	Queijo (30º dia)	Queijo (60º dia)	Queijo (90º dia)
Umidade (g/100g)	82,55 ± 0,51	57,33 ± 3,66 ^a	46,07 ± 3,60 ^b	40,34 ± 2,07 ^{b, c}	32,14 ± 1,17 ^c
Proteína (g/100g)	5,52 ± 0,09	14,42 ± 1,27 ^a	19,71 ± 1,30 ^b	19,15 ± 1,31 ^b	24,55 ± 0,94 ^c
Gordura (g/100g)	6,47 ± 0,36	23,00 ± 1,71 ^a	26,33 ± 2,08 ^a	33,56 ± 1,82 ^b	37,27 ± 1,11 ^b
Cinzas (g/100g)	0,70 ± 0,03	2,33 ± 0,58 ^a	3,19 ± 0,32 ^a	3,66 ± 0,57 ^a	3,62 ± 0,61 ^a
Glicídios (g/100g)	4,41 ± 0,13	1,21 ± 0,16 ^a	2,18 ± 0,45 ^a	1,92 ± 0,20 ^a	1,35 ± 0,03 ^a

Resultados expressos como média ± erro padrão da média; Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem significativamente ($p < 0,05$).

3.1.7 Discussão

Os resultados das avaliações microbiológicas e físico-químicas realizadas no leite de ovelha cru foram comparados com os padrões contidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado [13]. Para o queijo produzido com leite de ovelha cru, foram utilizados o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos [12] e Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos [16].

O valor observado para a Contagem Padrão em Placas indicou alta contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, porém não superior ao permitido pela legislação, que é de $7,5 \times 10^5$ UFC/mL [13]. Para esta amostra, não foi utilizada a legislação da ANVISA, pois esta inclui apenas padrões para leite processado termicamente.

A avaliação de *Salmonella* sp em queijos indicou que as amostras estavam de acordo com o que está estabelecido na legislação brasileira. Uma revisão sobre queijos de leite ovino e caprino demonstrou que não houve detecção de *Salmonella* spp. em queijos Castelo Branco e Idiazabal, ambos produzidos com leite cru de ovelha, sendo que *Salmonella arizonae* foi a única espécie detectada ao longo do tempo de maturação do queijo La Serena [9].

Os resultados obtidos para Coliformes a 30°C e Coliformes a 45°C indicaram que a contaminação por estes grupos manteve-se abaixo dos níveis máximos permitidos pela legislação brasileira para queijos de baixa umidade (Tabela 1). Resultados encontrados na literatura apresentam uma quantificação de coliformes e *Escherichia coli* em queijo Serpa acima de $2,5 \times 10^6$ UFC/g e $1,4 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente, com presença também em queijo Serra da Estrela [9]. Foi observada a diminuição gradual nos níveis de Coliformes a 30°C e Coliformes a 45°C, ao longo da maturação do queijo. Um estudo com queijo de leite de ovelha, observando contaminações altas por coliformes fecais e *E. coli* no início do período de maturação, sendo que esta não foi quantificada ao final deste [3].

Dentre os parâmetros analisados neste trabalho, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi o que demonstrou resultados

preocupantes até a Coleta 3. O valor observado nesta coleta foi acima do máximo permitido pela legislação, verificando-se valores aceitáveis no queijo maturado por 90 dias, mesmo sendo permitida sua comercialização a partir de 60 dias de maturação. Em amostras de queijos produzidos com leite de ovelha na Europa, denominados Castelo Branco e Idiazabal, não foi detectada a presença de *S. aureus*. Já para queijo Serpa, alguns autores não detectaram a presença de *S. aureus*, resultado contrário obtido por outros que quantificaram acima de 2×10^3 UFC/g no mesmo tipo de queijo [9]. Nas amostras avaliadas, observou-se um aumento inicial nas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva da primeira para a segunda coleta, seguida por uma diminuição gradual até o final da maturação. Salienta-se que o produto final para o consumidor apresentou contagens abaixo do máximo permitido pela legislação brasileira.

Conforme ressaltado anteriormente, foram utilizadas bactérias lácticas *starter* comerciais na fabricação deste queijo. Além de desenvolverem uma rota essencial na produção de laticínios, estes microrganismos contribuem para a qualidade do produto [17]. Sua capacidade de produzir ácido láctico a partir da lactose auxilia na redução do pH, o que provoca a expulsão de soro da coalhada, a diminuição do conteúdo de umidade e do risco de deterioração microbiológica. Durante a maturação do queijo, microrganismos patogênicos são normalmente inibidos por bactérias lácticas [3], devido à produção dos ácidos láctico e acético e de uma ampla variedade de metabólitos antimicrobianos [3,17]. Aliado ao uso de bactérias *starter*, a própria utilização do leite cru contribui para o aumento na contagem de bactérias lácticas no queijo e para que ocorra a superação da microbiota patogênica pela microbiota benéfica na produção do queijo, desenvolvimento de sabor e características de qualidade no produto final.

O queijo produzido com leite de ovelha apresentou variações nas contagens microbiológicas ao longo do período de produção e de maturação, demonstrando que os valores para coliformes a 30°C, Coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva diminuem durante o tempo de maturação, atingindo os menores valores ao final de noventa dias. Considerando a

diminuição observada ao longo da maturação e a ausência de *Salmonella* spp. em todas as coletas, bem como os limites estabelecidos para o produto, pode-se dizer que o produto final apresentou qualidade microbiológica adequada.

Considerando os valores de densidade, acidez, gordura, proteína e o cálculo de extrato seco desengordurado, pode-se dizer que o leite utilizado para a produção do queijo estava dentro dos requisitos físicos e químicos estabelecidos para leite cru refrigerado [13]. Deve-se levar em conta que estes limites são estabelecidos para leite bovino.

Os valores observados nos parâmetros físico-químicos para o leite de ovelha cru foram semelhantes aos descritos nas amostras do período de lactação de 140 dias, e inferiores nos tempos de lactação de 7, 30 ou 60 dias, para ovelhas da mesma raça Lacaune na região da Serra Gaúcha [2]. A densidade apresentou valores semelhantes, entre 1,035 e 1,038 g/mL, e o teor de lactose foi superior em todos os períodos de lactação, com um máximo de 5,04%. Os resultados obtidos para leite de ovelhas da raça Corriedale, demonstraram teores de gordura bem inferiores em todas as semanas de lactação estudadas, com percentual médio de 3,5%, e um valor médio semelhante para densidade de 1,036 g/mL [20].

Os valores descritos em uma revisão para leite ovino indicaram um percentual médio para gordura de 7,9%, proteína de 6,2%, cinzas de 0,9%, lactose de 4,9% [18], todos superiores aos listados na Tabela 2. O valor de acidez em ácido láctico varia entre 0,22 e 0,25%, também superior ao observado no leite ovino analisado [18].

O conteúdo de umidade de 32,14%, quantificado ao final do período de maturação do queijo analisado, pode ser comparado com o valor observado em queijo ovino Piacentinu Ennese, com maturação entre 60 e 120 dias [8]. Uma comparação com nove queijos italianos produzidos com leite de ovelha apresentou valores médios de umidade superiores ao do queijo em estudo, com variações entre 35 e 38,2% [4]. Em um estudo com queijos de leite de ovelha produzidos em Portugal e Espanha, a maioria dos queijos apresentou

valores de umidade superiores, com exceção do queijo de Évora e do Idiazabal maturado por 180 dias [9].

O teor médio de proteína no queijo maturado foi inferior ao de 26,83% observado aos 60 dias de maturação do queijo Piacentinu Ennese [8]. Valores superiores para proteína também foram observados em nove queijos ovinos italianos analisados [4], bem como em queijos da Península Ibérica [9].

O conteúdo de gordura no extrato seco de 54,92% foi superior aos observados em todos os períodos de maturação do queijo Piacentinu Ennese [8]. Os teores médios de gordura em queijos italianos variaram entre 27,5 e 29,5% [4], valores inferiores ao observado ao final da maturação do queijo em estudo, que foi de 37,27%. Já os queijos ovinos portugueses e espanhóis apresentaram valores superiores, compreendidos entre 43 e 59,83% [9].

Os resultados das análises físico-químicas permitiram a classificação do queijo maturado, de acordo com o conteúdo de umidade e de matéria gorda no extrato seco [12].

3.1.8 Conclusões

O queijo e o leite de ovelha analisados neste estudo apresentaram os resultados dentro dos limites microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para estes tipos de alimentos. A avaliação físico-química do leite indicou que a composição nutricional foi semelhante à de leite ovino produzido no Brasil, mas inferior à de leite ovino produzido no continente europeu. Os valores indicaram que o leite cru ovino possuía a composição nutricional mínima exigida pela legislação brasileira, porém os limites utilizados para comparação não eram específicos para leite ovino. Os resultados físico-químicos observados no queijo indicaram, conforme esperado, a perda de umidade ao longo da maturação, concentração de proteínas e alto teor de gordura ao final da maturação. O queijo de leite de ovelha maturado por um período de noventa dias foi classificado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos como um produto de baixa umidade ou de massa dura e gordo, em função do conteúdo de gordura no extrato seco.

Agradecimentos. Este trabalho recebeu suporte financeiro da CAPES-CDBA e do CNPq.

3.1.9 Referências

1. Arqués J.L., Rodríguez E., Gaya P., Medina M., Guamis B. & Nuñez M. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 98: 254-260.
2. Brito M.A., González F.D., Ribeiro L.A., Campos R., Lacerda L., Barbosa P.R. & Bergmann G. 2006. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**. 36(3): 942-948.
3. Caridi A. 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from de artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. **International Journal of Dairy Technology**. 56(2): 105-110.
4. Coda R., Brechany E., De Angelis M., De Candia S., Di Cagno R. & Gobbetti M. 2006. Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses. **Journal of Dairy Science**. 89(11): 4126-4143.
5. De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M.R. & Gobbetti M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(5): 2011-2020.
6. Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C. & Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tool for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. 16: 1058-1071.
7. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). 2005. Embrapa Gado de Leite: **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em 12 mai 2005.
8. Fallico V., Tuminello L., Pediliggieri C., Horne J., Carpino S. & Licitra G. 2006. Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese Made Using Different Farm Technologies. **Journal of Dairy Science**. 89(1): 37-48.
9. Freitas C. & Malcata F.X. 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protegéé and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. **Journal of Dairy Science**. 83(3): 584-602
10. Instituto Adolfo Lutz (IAL). 2006. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2006. 1018p.

11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2006. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2006**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2008.
12. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). 1996. **Portaria Nº. 146**, de 07/03/1996. D.O.U., Brasília, 11/03/1996. p. 3977.
13. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2002. **Instrução Normativa Nº. 51**, de 18/09/2002. D.O.U., Brasília, 20/09/2002. p. 13.
14. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2003. **Instrução Normativa Nº. 62**, de 26/08/2003. D.O.U., Brasília, 18/09/2003. p. 14.
15. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2006. **Instrução Normativa Nº. 68**, de 12/06/2006. D.O.U., Brasília, 14/12/2006, Seção 1, p. 8.
16. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MS). 2001. **Resolução RDC Nº. 12**, de 02/01/2001. D.O.U., Brasília, 02/01/2001. p. 1-54.
17. O'Sullivan L., Ross R.P. & Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**. 84: 593-604.
18. Park Y.W., Juárez M., Ramos M. & Haenlein G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**. 68: 88-113.
19. Prata L.F., Ribeiro A.C., Rezende K.T., Carvalho M.R.B., Ribeiro S.D.A. & Costa R.G. 1998. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 18(4): 428-432.
20. Souza A.C.K.O., Osório M.T.M., Osório J.C.S., Oliveira N.M., Vaz C.M.S., Souza M. & Corrêa G.F. 2005. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociência**. 11(1): 73-77.

3.2 ARTIGO 2

3.2.1 Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese

3.2.2 Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) were isolated from ovine milk and cheeses manufactured in the Southern Region of Brazil. Among the 112 LAB strains

investigated, 21% showed antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities. On basis of this screening, *Lactobacillus plantarum* LCN 17 and *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 were selected and tested for the production of bacteriocins. The bacteriocins produced by both strains showed antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* whereas that produced by *L. plantarum* LCN 17 presented higher stability to different temperature, pH and enzyme treatments. These strains present potential for production of bacteriocins and development of starter cultures.

Key Words: lactic acid bacteria; bacteriocin; ewe's raw milk; Brazilian ovine cheese

3.2.3 Resumo

Bactérias lácticas foram isoladas de leite e queijos de ovelha produzidos na região sul do Brasil. Entre as 112 linhagens de bactérias lácticas estudadas, 21% apresentaram atividades antimicrobiana, proteolítica e lipolítica. Baseando-se nesta avaliação, *Lactobacillus plantarum* LCN 17 e *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 foram selecionados e examinados para a produção de bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas por ambos isolados exibiram atividade contra *Listeria monocytogenes*, enquanto a produzida por *L. plantarum* LCN 17 apresentou maior estabilidade aos tratamentos em diferentes temperaturas, pH e presença de enzimas. Estas linhagens apresentam potencial para produção de bacteriocinas de uso alimentar e para desenvolvimento de culturas iniciadoras.

Palavras-Chave: bactérias lácticas; bacteriocinas; leite cru de ovelha; queijo de ovelha brasileiro

3.2.4 Introduction

A broad group of microorganisms eventually gain access to the curd from the cheese making environment, and will consequently contribute to the ripening process. Lactic acid bacteria (LAB) are largely predominant in such microbial group, and are believed to play a key role in the characteristics of the

final cheese. The products of LAB catabolism contribute not only to preservation but also to the flavor and texture, thereby helping to determine unique product characteristics (22). LAB are used as natural or selected starters in food fermentations, especially for the manufacture of dairy products with functional and probiotic properties. The indigenous microbial contents of cheeses, which are selected by the raw milk and cheese-making environment and technology, could be considered some of the main factors in determining the typical cheese features (3,8).

The ability to produce lactic acid from lactose is probably the most important property of dairy LAB. It helps to reduce pH, which in turn increases the expulsion of whey from the curd, thus lowering the moisture content (3). Protection of food from spoilage and pathogenic microorganisms by LAB is associated to production of organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, antifungal compounds, and bacteriocins (11,24).

Numerous strains of LAB associated with food systems produce bacteriocins, defined as proteinaceous substances that exhibit bactericidal activity against closely related organisms (2). Considering that bacteriocin-producing LAB are mostly isolated from foods like dairy and meat products, these antimicrobial substances have been consumed for a long time. These compounds have attracted increasing attention, since they are active in a nanomolar range and have no toxicity (21). Several bacteriocins from Gram-positive bacteria are very effective, have wide inhibitory spectra and may be used as antimicrobial agents in various practical applications (9,11).

Addition of the bacteriocin producing culture rather than the isolated bacteriocin presents an attractive alternative for food improvement in some cases. The cultivation of LAB strains for inoculation purposes is in many ways relatively inexpensive. An alternative approach to introduce bacteriocins to food is the use of live cultures, which will produce bacteriocins *in situ* in the food (9,11).

Production of typical dairy products from ewes can provide a profitable alternative to cow milk products owing to their specific taste, texture and their

natural and healthy properties. The production of cheese and other sheep milk products with particular characteristics can be protected by the legislation, in some countries. The designations of origin and geographic indications constitute an element for the protection of the biodiversity of a territory, plants, animals and microbes, practices and production systems, linked to the history and the local culture (26). The production of the ewe's cheese is recent in Brazil and located in the southern most region, for climatic and geographic reasons. The aim of this study was to determine the evolution of LAB and bacteriocin-producing strains in Fascal cheese, a typical Brazilian ovine cheese.

3.2.5 Materials and Methods

3.2.5.1 Samples

The LAB used in this work were isolated from raw ovine milk and cheeses produced without addition of the starter culture, obtained from a commercial cheese plant located at Viamão, Brazil. Milk samples were collected from the refrigerated tank, before cheese production. This dairy farm produced a hard ewe's cheese, made from raw milk without the addition of lactic starters, in a cylindrical shape, with ripening time of up to 3 months. Cheeses were sampled after 1, 30, 60 and 90 days of ripening.

3.2.5.2 Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB)

Samples (25 mL or 25 g) were diluted in 225 mL of sterile saline for 2 min in a blender. After filtering through sterile gauze, the homogenate was decimally diluted in sterile saline and selected dilutions were plated on MRS agar (Vetec) or M17 agar (Difco). Mesophilic lactobacilli were isolated after anaerobic incubation on MRS agar acidified to pH 5.5, at 30°C for 72 h. Coccal-shaped LAB were isolated on M17 agar incubated anaerobically at 30°C for 72 h. Plate counts were done after incubation. At least 10 colonies, with possibly different morphologies, were isolated from the greatest plate dilutions. Working cultures were grown in appropriate (MRS or M17) broth media, at 30°C for 72 h. The organic acid production by the screened strains was determined by measuring the pH. All isolates were tested for their Gram reaction, cell morphology, and

catalase reaction. The LAB selection was carried out by the exclusion of those strains producing a pH above 5.0, Gram-negative stain and catalase-positive reaction. Growth of the coccal-shaped bacteria was examined in M17 broth after incubation at 10°C for 7 days and at 45°C for 2 days, excluding those strains growing at 45°C (5). Bacteria were maintained as stock cultures frozen at -21°C in 15% (v/v) glycerol. Strains were propagated twice before used in experiments.

3.2.5.3 Proteolytic and Lipolytic Activities

All selected isolates were tested for the production of proteolytic or lipolytic activity by agar diffusion assays at 22°C for 72 h and 120 h, respectively. Proteolytic activity was tested using 1% (w/v) skim milk agar. The presence of clear zones around the colonies, after using 1% (v/v) HCl for 1 min, was indicative of proteolysis (19). Lipolytic activity was evaluated in tributyrin agar plates. Colonies surrounded by clear zones were deemed to evince lipolytic activity (19).

3.2.5.4 Antibacterial Activity

The antibacterial activity was previously tested against *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 by agar disk diffusion assay (20). An aliquot of 20 µL cell-free culture supernatant was applied on cellulose disks (6 mm) on BHI agar (Difco) plates previously inoculated a swab submerged in a *L. monocytogenes* suspension, which corresponded to a 0.5 McFarland turbidity standard solution. Plates were incubated aerobically at 37°C for 24 h and the diameters of the inhibition zones around the disks were measured.

After performing proteolytic, lipolytic and antibacterial trials, isolates that presented positive results were selected to test their antimicrobial spectra. The antagonistic activity was detected against 23 indicator strains (Table 1). A 24-h culture of the LAB grown in appropriate broth (MRS or M17) was 10-fold diluted and 20 µL aliquots were spotted in triplicate onto M17 and MRS agar. Plates were incubated anaerobically at 35°C for 24 h, and then overlaid with 5 mL of

Brain Heart Infusion (BHI) soft-agar (0.7% agar) seeded with 0.1 mL of an overnight culture of the indicator strains. To exclude the effect of lactic acid, sodium- β -glycerophosphate (Merck) was incorporated to a final concentration of 2% (w/v) in the overlay agar (25). Plates were incubated aerobically for an additional 24 h and then checked for clear zones around spots of the presumed producers, measured in millimeters. Sterile MRS broth was spotted as a control. Results considered positive when diameter of inhibition halo were ≥ 8 mm (25).

3.2.5.5 Identification of Selected LAB

The selected strains were further identified and characterized by API 50CHL (BioMérieux), as recommended by the manufacturer. The APILAB Plus software (BioMérieux) was used to analyze the fermentation profiles obtained with the identification strips.

3.2.5.6 Production of Crude Bacteriocin-like Substances (BLS)

Selected cultures were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of MRS broth incubated for 48 h at 30°C in shaker at 125 rpm. Production of BLS was determined at 4 h interval for 48 h and tested for cell-free culture aliquot following spot-on-lawn method. Aliquots of culture media were centrifuged at 10,000 g for 10 min, at 4°C. Correction of the cell-free supernatant to pH 6.0 with 1 M NaOH prevented the inhibitory effect of organic acids. Supernatants were filtered through 0.22 μ m membranes (Millipore) and stored in sterile flasks at 4°C until used for anti microbial assay. The resulting filtrates were used to evaluate antimicrobial activity.

3.2.5.7 BLS Activity Assay

For a semiquantitative assay of BLS two fold serial dilution of supernatant were tested using *L. monocytogenes* ATCC 7466 as indicator strain. The antibacterial activity was detected on plates by agar disk diffusion assay, previously described. Plates were incubated aerobically at 35°C for 24 h. The diameters of the inhibition zones around the disks were measured. The

activity of BLS was defined as the reciprocal of the highest dilution yielding a zone of growth inhibition and expressed as activity units (AU) per mL (20).

3.2.5.8 Growth Determination

Bacterial growth was developed at 30°C in rotary shaker. At 8 h intervals, an aliquot of the bacterial suspension was diluted to 10^{-8} in sterile saline. Samples were homogenized and then loaded (20 μ L) in triplicate onto nutrient agar plates. Plates were incubated for 3 days at 30°C and counts were done to determinate the number of viable cells. Optical density (O.D.) of the cultures was measured at 600 nm with a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi).

3.2.5.9 Susceptibility to pH, temperature, and enzymes

The effect of enzymes, temperature, and pH on BLS activity was determined as described elsewhere (1). Cell-free culture supernatants of isolates LCN 17 and LCN 43 with pH adjusted to 6.0 with sterile 1 M NaOH were used. Proteolytic enzymes tested were trypsin (Sigma) and proteinase K (Merck) at 2 mg mL⁻¹. Heat sensitivity was checked by heating supernatants at 25°C, 37°C and 60°C for 60 min, 100°C for 20 min, autoclaving (121°C for 15 min) and frozen for 30 days. Samples were incubated at different pH values (pH 2-11) and evaluated for residual activity (24). After the treatments, samples were filtered through 0.22 μ m membranes (Millipore) and tested for antimicrobial activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644.

3.2.6 Results and Discussion

Elevated counts of lactic acid bacteria were found during the whole ripening time in the tested cheese. The total number of LAB in samples of ovine cheese increased from 6.0 log CFU g⁻¹ after producing to 6.7 log CFU g⁻¹ after 60 days, and decreased to 6.3 log CFU g⁻¹ after 90 days of ripening (Figure 1a). The counts of LAB were lower than those observed for ewe cheeses produced in Portugal and Spain (10) and in Pecorino Sardo cheese (18). Presumptive

mesophilic lactobacilli quantified at the end of ripening of nine Italian ewes' milk cheeses varied from 3.2 to 8.27 log CFU g⁻¹ (4).

One hundred twelve strains were isolated from ovine milk and unpasteurised ewe's milk cheese during ripening (Figure 1b). Isolates were submitted to the proteolytic activity assay and 51% presented this activity. Although LAB are often weakly proteolytic, they possess a very comprehensive proteinase/peptidase system capable of hydrolyzing oligopeptides to small peptides and amino acids (27). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* showed proteolytic activity in skim milk greater than that of *Lactobacillus casei*, but such activity was very low in *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Majorero cheese, manufactured with caprine milk (10). The two wild strains assessed of *L. lactis* and *Lactobacillus brevis* were similar in terms of proteolytic patterns in cheese, and they clearly improved release of free amino acids upon incorporation in cheesemaking milk (22).

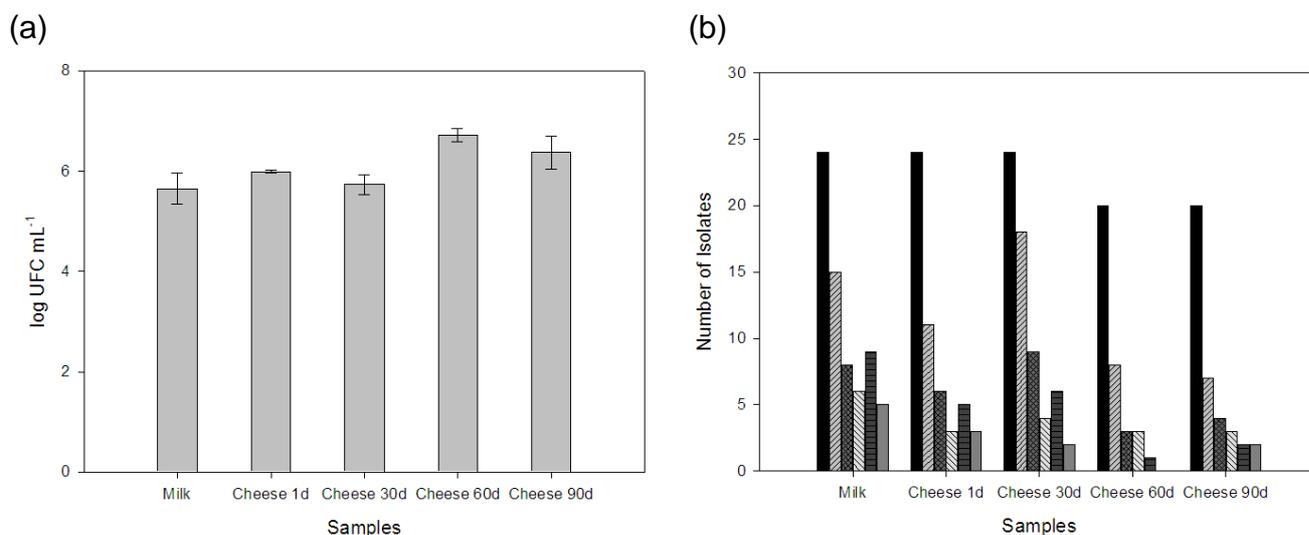


Figure 1 (2). Isolation and selection of lactic acid bacteria (LAB) from Brazilian ovine cheese. (a) Viable counts of LAB in ovine milk and during the cheese ripening. (b) Selection of LAB from ovine milk and during the cheese ripening: isolates from MRS and M17 plates (black bars); Gram and catalase test (right diagonal bars); proteolytic activity (squared bars); lipolytic activity (left diagonal bars); antibacterial activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644 (stripped bars); proteolytic, lipolytic and antibacterial activity (gray bars). Values are the means \pm SE of three independent determinations.

The isolates showing lipolytic activity corresponded to 32% (Figure 1b). LAB are generally acknowledged to be weakly lipolytic and their lipases display substrate specificity which is both strain and species dependent (19). During cheese ripening, starter lactococci and lactobacilli or secondary adventitious bacterial flora may cause a moderate accumulation of short- and long-chain free fatty acids, presumably by hydrolysis of either triacylglycerols or especially of the partial acylglycerols present in milk (16). Not all strains isolated from ewe's milk and cheeses that showed esterase activity exhibited high activity on triglycerides. The *L. plantarum* O236 and *L. plantarum* O186 were able to hydrolyze tributyrin, whereas *L. lactis* O233, *L. plantarum* O155, and *Lactobacillus casei* O190 did not hydrolyze triglycerides (17). The criteria for selection of adjuncts used in cheese manufacturing are often not defined and frequently isolates from a good-quality cheese have been selected for evaluation. However, there is a need to identify the proteolytic and lipolytic enzyme systems of the nonstarter LAB that could potentially contribute to the overall maturation process (27).

The results of the antibacterial test against *L. monocytogenes* are shown in Figure 1b. Antilisterial activity was observed in 39% of the selected LAB. Isolates obtained during the ripening of Alentejo's traditional cheeses demonstrate that 39.2% presented antilisterial activity, but bacteriocin production was not observed. The activity against *Listeria* was caused by production of organic acids and hydrogen peroxide (14). The effect of isolates against *L. monocytogenes* is very important for dairy industry, because this bacterium was detected in cheeses manufactured with raw milk, ripened cheeses and in the wash water for cheese production (13).

Isolates showing lipolytic, proteolytic and antibacterial activities achieved 21% (Figure 1b). Three isolates showed similar activities and the greatest clear zones around the colonies. The sensitivity of 23 bacterial strains from different genera to the LCN 17, LCN 20 and LCN 43 isolates is presented in Table 1. Results demonstrate that all isolates presented antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and against spoilage and pathogenic bacteria. It was also observed antimicrobial activity against

microorganisms involved in mastitis and other diseases of sheep flock (6,23,30).

Table 1 (7). Antimicrobial spectrum of lactic acid bacteria isolated from Brazilian ovine cheese.

Indicator Strain ^a	Inhibition zone (mm) ^b		
	LCN 17	LCN 20	LCN 43
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9634	9.0 ± 0.5	5.0 ± 0.0	5.8 ± 0.3
<i>Bacillus subtilis</i> (food isolate)	6.8 ± 0.3	6.3 ± 0.3	7.3 ± 0.3
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	10.3 ± 0.3	5.5 ± 0.5	11.0 ± 0.5
<i>Clostridium perfringens</i> type B	5.8 ± 0.3	6.0 ± 0.0	6.8 ± 0.3
<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547	10.0 ± 0.0	4.3 ± 0.3	9.3 ± 0.3
<i>Enterobacter aerogenes</i> (food isolate)	8.8 ± 0.3	6.0 ± 0.0	8.3 ± 0.3
<i>Enterococcus faecalis</i> (food isolate)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.0 ± 0.0	8.3 ± 0.3	9.5 ± 0.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	8.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3	10.3 ± 0.3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.3 ± 0.3	3.5 ± 0.5	4.5 ± 0.5
<i>Listeria innocua</i> (food isolate)	11.5 ± 0.5	8.3 ± 0.3	10.3 ± 0.3
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10.5 ± 0.5	6.5 ± 0.5	10.0 ± 0.0
<i>Listeria seeligeri</i> AC 8214	9.3 ± 0.3	4.5 ± 0.5	10.5 ± 0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate)	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (clinical isolate)	8.3 ± 0.3	8.0 ± 0.0	8.3 ± 0.3
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	9.3 ± 0.3	8.3 ± 0.3	8.3 ± 0.3
<i>Salmonella</i> Gallinarum (clinical isolate)	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (food isolate)	8.8 ± 0.3	8.3 ± 0.3	8.5 ± 0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.3 ± 0.3	8.0 ± 0.0	8.3 ± 0.3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (clinical isolate)	10.5 ± 0.5	6.3 ± 0.3	11.5 ± 0.5
<i>Staphylococcus intermedius</i> (clinical isolate)	6.0 ± 0.5	8.0 ± 0.0	6.8 ± 0.3
<i>Streptococcus agalactiae</i> (clinical isolate)	6.5 ± 0.5	-	7.3 ± 0.3
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (clinical isolate)	11.3 ± 0.3	-	12.3 ± 0.3

^aIndicator strains were grown on BHI agar plates for 24h; ^bzone of growth inhibition ≥ 8 mm was considered as positive, lack of inhibition zone as negative (-), and a weak inhibition when the diameter was < 8 mm. Values are the means ± SE of three independent determinations.

LCN 17 and LCN 43 isolates demonstrated similar spectra of activity, broader than that produced by the isolate LCN 20 (Table 1). The inhibition of *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria seeligeri* was observed in ewe cheeses produced in the Castelo Branco region and only *L. monocytogenes* in La Serena cheese (10). During the ripening of Alentejo's traditional cheeses, one isolate of *L. plantarum*, seven isolates of *L. lactis* subsp. *lactis* and seven isolates of *Lactobacillus rhamnosus* with antilisterial activity were identified (14).

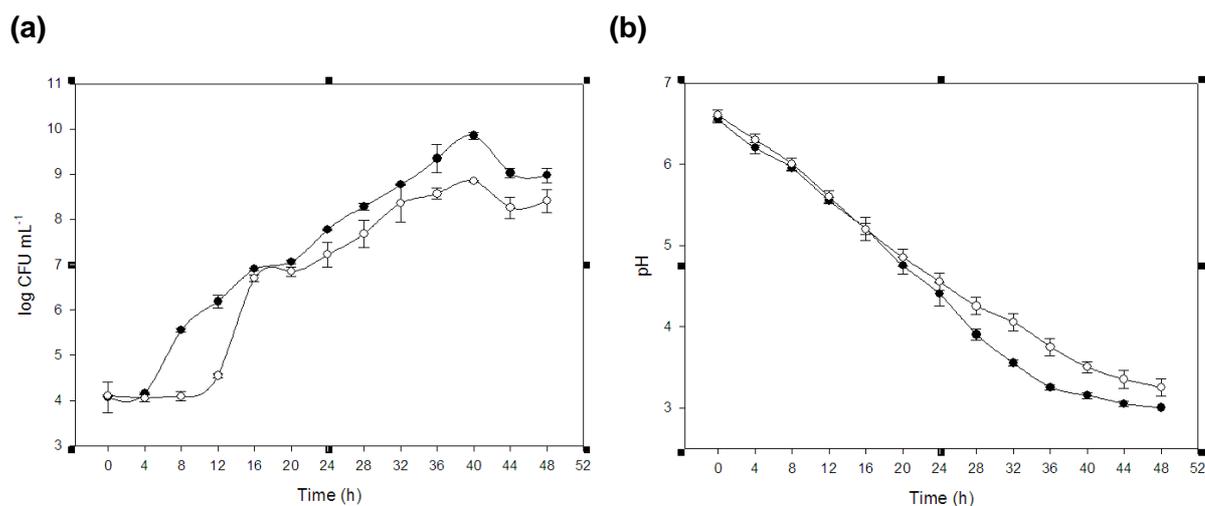
All isolates showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, bacteria already found in ewe cheeses as Serra da Estrela, Serpa (10) and Pecorino del Poro cheeses (3). Caridi *et al.* (3) observed higher counts of *E. coli* at the beginning of the ripening period, however this bacteria could not be detected at the end of ripening. This fact could be explained by the utilization of raw ovine milk in cheese manufacturing and by the presence in raw milk of bacteriocin-producing bacteria. Antimicrobial activity of isolates was observed against *Salmonella* Enteritidis but not against *Salmonella* Gallinarum (Table 1).

Similar results were observed for all selected isolates on indicator strains of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* (Table 1). The inhibitory effect by indigenous LAB of Fascal cheese is important since *S. aureus* and *Clostridium* spp. have been described as common contaminants of dairy products and were detected in ovine milk samples and cheeses produced in Iberian Peninsula and France (10,13,30). On the other hand, antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* was not observed (Table 1). Enterococci were found in artisanal cheeses produced with pasteurized or raw milk from sheep, goat, buffalo and cow, observing that *E. faecalis* and *Enterococcus faecium* were the most frequently detected in cheeses (12). Similar absence of activity was observed against *Pseudomonas aeruginosa*, however all isolates presented antimicrobial activity against *Pseudomonas fluorescens*, a microorganism detected in Serra da Estrela cheese curd (10).

The isolates were identified with API 50CHL system and were classified as *L. plantarum* (LCN 17), *Lactococcus* sp. (LCN 20), and *L. rhamnosus* (LCN

43). Among these, *L. rhamnosus* was not cited as a usual LAB detected in ewe's cheeses (10). Non-starter LAB were isolated from Italian ewe cheeses, produced by different manufacturers. Phenotypically, the cheese isolates included 32% *L. plantarum* isolates and 1% *L. rhamnosus* isolates (8). *L. plantarum* and *L. paracasei* were the species found most frequently in Pecorino cheeses, with 56 and 29 isolates over the total of 99 isolates (4).

Strains LCN 17 and LCN 43 were selected for BLS production during a 48 h period. Viable cell counts, pH and antibacterial activity were monitored during cultivation (Figure 2). Exponential cell growth reached the stationary phase after 36 h of cultivation. The pH decreased during cultivation reaching values nearly pH 3.0 (Figure 2b). The activity against *L. monocytogenes* ATCC 7644 was detected from 16 hours of BLS production. The maximum values were observed from 32 hours for both isolates (Figure 2c). Maximum bacteriocin production was 6400 AU mL⁻¹ for both LCN 17 and LCN 43 isolates, which was not coincident with minimum pH values. Production of bacteriocins by *L. plantarum* AMA-K isolated from a fermented milk product was observed between 10 and 34 h, with the maximum bacteriocin activity reaching 12,800 AU mL⁻¹ (28).



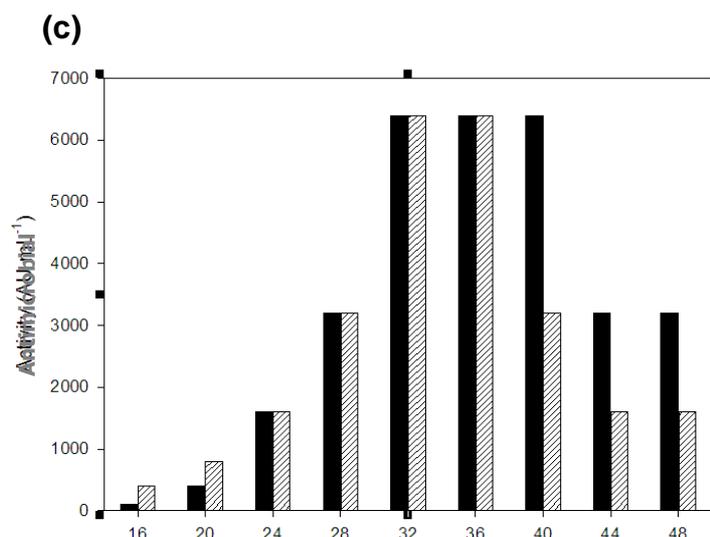


Figura 2 (3). Production of antimicrobial activity during growth of selected lactic acid bacteria. Strains LCN 17 (black circles) and LCN 43 (white circles) were grown in MRS broth and monitored for viable cell counts (a), pH (b), and antibacterial activity (c). In panel (c), LCN 17 (black bars) and LCN 43 (striped bars). Values are the means \pm SE of three independent determinations.

The antimicrobial substances (6400 AU mL^{-1}) were incubated at various temperatures and at different values pH. The antibacterial activity was measured against *L. monocytogenes* and results are expressed as the percentage of residual activity (Table 2). Both compounds were sensitive to trypsin and proteinase K, indicating the activity is associated to a bacteriocin-like substance. LCN 43 was more sensitive to the different temperature or pH treatments. BLS produced by LCN 17 or LCN 43 isolates were stable for up to 60°C for 60 min, and BLS produced by LCN 17 remained stable after freezing for 30 days. The treatment at 100°C for 20 min or autoclaving presented the same effects on the antibacterial activity, for both BLS, with 47.5% of residual activity. After autoclaving, BLS produced by LCN 17 showed greater residual activity than that observed for the other sample. No decrease in antibacterial activity was recorded after 90 min at 100°C or 20 min at 121°C for bacteriocins produced by *L. plantarum* (29). *L. plantarum* isolated from Turkish dairy products showed antibacterial activity due to bacteriocin-like substances. The substances were resistant to heat and the inhibitory activity was not lost after 10 and 20 min at 100°C (21).

Table 2 (8). Stability of BLS after different treatments.

Treatment	Residual Activity (%)	
	LCN 17	LCN 43
Temperature		
25°C / 60 min	100 ± 0	100 ± 0
37°C / 60 min	100 ± 0	100 ± 0
60°C / 60 min	100 ± 0	100 ± 0
100°C / 20 min	47 ± 0	47 ± 0
121°C / 15 min / 15lb in ⁻²	15 ± 6	8 ± 0
-20°C / 30 days	100 ± 0	74 ± 26
pH		
2	34 ± 13	74 ± 16
4	100 ± 0	100 ± 0
5	100 ± 0	100 ± 0
7	100 ± 0	100 ± 0
9	100 ± 0	74 ± 26
11	34 ± 13	15 ± 6
Enzymes		
Trypsin	83 ± 12	42 ± 8
Proteinase K	6 ± 0	0 ± 0

Values are the means ± SE of three independent determinations.

The effect of pH on stability was observed for values of 2.0 and 11.0, for both isolates. Results demonstrated that BLS produced of LCN 43 had lower stability to the variations of pH, including values of pH 9.0. At pH 2.0 and 11.0, BLS produced by LCN 17 and 43 isolates had partial lost of antibacterial activity. Bacteriocins ST28MS and ST26MS produced by *L. plantarum* remained stable after incubation for 2h at pH values between 2.0 and 12.0, without reduction in antimicrobial activity (29). *L. plantarum* TF711 isolated from raw Tenerife goat's cheese produced a bacteriocin-like substance, which was called plantaricin TF711. This substance was stable to heat and highest antimicrobial activity was found between pH 1 and 9 (15,21). Acid adapted *L. monocytogenes*

was more tolerant to nisin and other ionophores than was the non-adapted counterpart. It is suggested that the composition of the straight chain fatty acids associated with acid adaptation may be responsible for this enhanced resistance to bacteriocins as well as, to some extent, the cross-protective effects of acid adaptation in general (7).

3.2.7 References

1. Bizani, D.; Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J. Appl. Microbiol.* 93, 512-519.
2. Bromberg, R.; Moreno, I.; Zaganini, C.L.; Delboni, R.R.; Oliveira, J. (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Braz. J. Microbiol.* 35, 137-144.
3. Caridi, A. (2003). Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from de artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. *Int. J. Dairy Technol.* 56, 105-110.
4. Coda, R.; Brechany, E.; De Angelis, M.; De Candia, S.; Di Cagno, R.; Gobbetti, M. (2006). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. *J. Dairy Sci.* 89, 4126-4143.
5. 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. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.* 64, 409-421.
6. Contreras, A.; Sierra, D.; Sánchez, A.; Corrales, J.C.; Marco, J.C.; Paape, M.J.; Gonzalo, C. (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Rum. Res.* 68, 145-153.
7. Cotter, P.D.; Hill, C. (2003). Surviving the acid test: Responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 429-453.
8. De Angelis, M.; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J.; Corbo, M.R.; Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2011-2020.
9. De Martinis, E.C.P.; Alves, V.F.; Franco, B.D.G.M. (2002) Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Rev. Int.* 18, 191-208.
10. Freitas, C.; Malcata, F.X. (2000). Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protegéé and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *J. Dairy Sci.* 83, 584-602.

11. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-70.
12. Gelsomino, R.; Vancanneyet, M.; Cogan, T.M.; Condon, S.; Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3560-3565.
13. Glass, K.; Doyle, M.E. (2005). Safety of Processed Cheese: A Review of the Scientific Literature. Food Research Institute, Madyson, pp. 1-11.
14. Guerra, M.M.M.; Bernardo, F.M.A. (2001). Characterization of the inhibitors effects of *L. monocytogenes* Scott A produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses. *Rev. Port. Cienc. Vet.* 96, 65-69.
15. Hernández, D.; Cardell, E.; Zárate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.* 99, 77-84.
16. Holland, R.; Coolbear, T. (1996). Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8. *J. Dairy Res.* 63, 131-140.
17. Katz, M.; Medina, R.; Gonzalez, S.; Oliver. G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria from ewe's milk and cheese. *J. Food Protec.* 65, 1997-2001.
18. Madrau, M.A.; Mangia, N.P.; Murgia, M.A.; Sanna, M.G.; Garau, G.; Leccis, L.; Caredda, M.; Deiana, P. (2006). Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *Int. Dairy J.* 16, 876-885.
19. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. (2003). Instrução Normativa Nº. 62, de 26/08/2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. D.O.U., Brasília, 18/09/2003. 14 p.
20. Motta, A.S.; Brandelli, A. (2002). Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J. Appl. Microbiol.* 92, 63-70.
21. Parada, J.L.; Caron, C.R.; Medeiros, A.B.P.; Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Tech.* 50, 521-542.
22. Pereira, C.I.; Gomes, E.O.; Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. (2008). Proteolysis in model portuguese cheeses: effects of rennet and starter culture. *Food Chem.* 108, 862-868.
23. Raynal-Ljutovac, K.; Pirisi, A.; Crémoux, R.; Gonzalo, C. (2007). Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Rum. Res.* 68, 126-144.
24. Rodríguez, E.; González, B.; Gaya, P.; Nuñez, M.; Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10, 7-15.

25. Schillinger, U.; Lucke, F. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
26. Scintu, M.F.; Piredda, G. (2007). Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Rum. Res.* 68, 221-231.
27. Sousa, M.J.; Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 327-345.
28. Torodov, S.D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Braz. J. Microbiol.* 39, 178-187.
29. Torodov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enz. Microb. Tech.* 36, 318-326.
30. Vautor, E.; Abadie, G.; Guibert, J.M.; Huard, C.; Pépin, M. (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 96, 69-79.

3.3 ARTIGO 3

3.3.1 *Characterization of ovine Fascal cheese produced with autochthonous cultures*

3.3.2 *Abstract*

Lactic acid bacteria (LAB) were isolated during a screening of raw ovine milk and Fascal cheese samples for antimicrobial, proteolytic and lipolytic activities. Selected LAB were used as inoculum for production of this Brazilian ovine cheese, manufactured with raw milk from Lacaune sheep. Microbiological and chemical changes occurring during cheese ripening were studied. Microbiological counts and moisture content of these cheeses were comparable to those observed in cheese made with a commercial starter. All cheeses showed adequate counts of coliforms, but coagulase positive staphylococci counts exceeding the standard values. Cheeses produced with a combination of *Lactobacillus plantarum* LCN 28 and *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 showed better results than those observed for the other experimental combinations. The

use of autochthonous LAB cultures could be beneficial to the manufacture of high quality typical raw milk cheese.

Key words: ovine milk, Fascal, typical cheese, lactic acid bacteria

3.3.3 Introduction

The microorganisms involved in cheese making and cheese ripening can be divided into microorganisms that are added to the cheese milk after being carefully selected by the starter manufacturer or the cheese-making company, and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) (El Soda *et al.*, 2000). A broad group of microorganisms eventually gain access to the curd from the cheese making environment, and will consequently contribute to the ripening process. However, studies pertaining to model cheeses under strictly controlled conditions are relatively scarce, thus the knowledge on the specific effect of individual factors upon the final cheese is still poor (Pereira *et al.*, 2008). The indigenous microbial contents of cheeses, which are selected by the raw milk and cheese-making environment and technology, could be considered some of the main factors in determining the typical cheese features (De Angelis *et al.*, 2001; Pisano *et al.*, 2007).

Even if the qualitative aspects of milk can be kept constant, the quantitative milk characteristics are subjected to variability as a result of diverse factors such as genetic make-up, breed, and age of animals, climate, diet, and time of manufacture within the lactation period (Mendia *et al.*, 2000). In the traditional Italian dairy industry, milk is processed for typical products such as long-ripening cheeses and these cheese-making processes involve different traditional stages that give specific features to the final product quality (Abeni *et al.*, 2005). The traditional technology for Ragusano cheese production, providing for the use of raw milk and wooden cheese-making equipment, generates cheeses having unique features but also a great variability in cheese quality. This is associated to the contribution of native microbiota from the local milk and environment to the cheese ripening, differing from farm to farm (Fallico *et al.*, 2004). Furthermore, the natural microbiota of the raw milk will eventually

play a relevant role, not only in the sensory characteristics, but also in the safety hazards of that product (Pisano *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2008).

Typical products are the unique result of the adaptation of technical skills to local resources, which make them strongly linked to the area of production (Scintu and Piredda, 2007). As often happens with traditional dairy products, cheeses exhibit considerable variability among dairies (Pinto *et al.*, 2008). Cheeses from ovine and caprine milk are often specialty rather than competing with larger plants in the production of less expensive commodity cheeses made from bovine milk (Casper *et al.*, 1998).

The sheep flock appeared as the fourth most important in Brazil, being the Rio Grande do Sul (RS), the main state in this economic activity (IBGE, 2006). Despite this fact, the ovine chain is focused on meat and wool production, since dairy products from small ruminants are considered expensive. However, there is a growing market for special high-quality cheese in Brazil. This has been particularly beneficial to small farmers that begun producing cheeses from ovine milk in RS. In this context, Fascal is a typical Brazilian semi-hard cheese, traditionally made using ovine raw milk. This cheese is produced at industrial plant by international technology adapting typical features and commercialized in the regional market. It is desirable the diffusion of its consumption beyond the southern region and also to define a standard product and the accepted range of variability. The main concern is to provide acceptable safety and standard levels of quality in this cheese, according to the increasing attention by the Brazilian policies toward food hygiene and safety aspects (ANVISA 2001). The objective of this study was to investigate the microbiological and chemical of Fascal cheese produced with different starter cultures, during the ripening period.

3.3.4 Materials and Methods

3.3.4.1 Isolation and Selection of Lactic Acid Bacteria (LAB)

Lactic acid bacteria were isolated from raw ewe's milk and ewe's milk cheese produced without addition of starter culture, obtained from a commercial

cheese plant located in Viamão city, 30°04'52" S and 51°01'24" W, Southern Brazil. The dairy farm has 117 hectares and 250 Lacaune breed sheep, with a monthly milk production around 5,000 liters. Milk samples were collected from the refrigerated tank, before cheese production. Cheese samples were collected at 1, 30, 60 and 90 days of ripening.

Samples (25 mL or 25 g) were diluted in 225 mL of sterile saline solution (8 g L⁻¹ NaCl) for 2 min in a blender. After filtering through sterile gauze, the homogenate was decimally diluted in sterile saline and plated on Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Vetec Química) or M17 agar (Difco). Counts were performed according to Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Marshall, 1992). Mesophilic lactobacilli were isolated after anaerobic incubation (Jar JA0401, Permution) at 30°C for 72 h on MRS acidified to pH 5.5 with acetic acid. Coccal-shaped LAB were isolated on M17 agar anaerobically incubated at 30°C for 72 h. At least 10 colonies with different morphologies were isolated from the greatest plate dilutions. Working cultures were grown in appropriate (MRS or M17) broth media. The production of organic acids by the isolated LAB strains was determined by measuring the pH. All isolates were tested for Gram stain, cell morphology, and catalase using 3 g L⁻¹ H₂O₂. The LAB selection was carried out by the exclusion of those strains producing a pH above 5.0, Gram-negative or catalase-positive. Growth of the coccal-shaped bacteria was examined in M17 broth after incubation at 10°C for 7 days and at 45°C for 2 days, excluding those strains growing at 45°C (Cogan *et al.*, 1997).

All selected isolates were tested for the production of proteolytic or lipolytic activity by agar diffusion assays at 22°C for 72h and 120h, respectively. Proteolytic activity was tested using 1% (w/v) skim milk agar. The presence of clear zones around the colonies, after using 1% (v/v) HCl for 1 min, was indicative of proteolysis (MAPA, 2003). Lipolytic activity was evaluated in Tributyrin Agar (Himedia). Colonies surrounded by clear zones were deemed to evince lipolytic activity (MAPA, 2003).

The antagonistic effect against *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 was detected under conditions that excluded the inhibitory effects of lactic acid. A 24

h culture of the LAB was diluted 10-fold and 20 μL aliquots were spotted in triplicate onto M17 or MRS agar. Plates were anaerobically incubated at 35°C for 24 h, then overlaid with 5 mL of Brain Heart Infusion (BHI) soft-agar (0.7% agar) seeded with 0.1 mL of an overnight culture of the *L. monocytogenes* strain. To exclude the effect of organic acids, sodium β -glycerophosphate (Merck) was incorporated to a final concentration of 20 g L⁻¹ overlay agar. Plates were incubated for additional 24 h and then checked for clear zones around spots of the presumed producers. Sterile MRS broth was spotted as a control (Schillinger and Lucke, 1989).

The strains showing proteolytic, lipolytic and antimicrobial activities were further identified by API 50CHL (BioMérieux), as recommended by the manufacturer. The APILAB Plus software (BioMérieux) was used to analyze the fermentation profiles obtained with the identification strips. Microbial cultures were stored at -20°C in M17 or MRS broth containing containing 10% (v/v) glycerol.

3.3.4.2 Manufacture of Experimental Cheeses

Cheese was made at the commercial plant according to standard Fascal cheese-making procedures utilizing raw ewe's milk. The milk was set at 31°C to 32°C for 30 min and separated in vats. Vats were previously cleaned and sanitized thoroughly to minimize contamination during manufacture of the cheese. Four batches of Fascal cheese were simultaneously manufactured. Treatment one was a control with no adjunct culture added (Group 1). Commercial starter culture (MA, Danisco), which comprised a blend of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *L. lactis* ssp. *cremoris* strains, was added in the second batch (Group 2). Inoculation was according to the manufacturer's specifications. Previously selected LAB were inoculated into the other two batches (Formulations 3 and 4), to give a similar final concentration of the commercial starter. The cultures were thawed from frozen cultures and grown in MRS or M17 broth (24 h at 30°C). The LAB cultures were centrifuged at 15,000 x g for 15 min and resuspended in sterile saline prior to addition to the cheese vat. Treatments three and four were blend of the isolates *Lactobacillus*

plantarum (LCN28) and *Lactobacillus rhamnosus* (LCN43) (1:1 proportion); *Lactobacillus plantarum* (LCN17) and *Lactococcus* sp. (LCN20) (1:1), respectively.

Following inoculation of each milk batch, rennet (BV bovine rennet) was added with equivalent clotting power. The mixture was incubated for 20 min at 31°C to allow clotting, then set at 31-32°C for 30 min. Perpendicular vertical cuts were made in the curd. The coagulum was cut into 1-cm cubes, followed by incubation for additional 40 min. The curd was then slightly compressed for 15-20 min, in order to aid whey removal. At the moment the curd was put into the plastic molds, the forms were marked for later sampling. The molds were pressed at room temperature: 1 kg for 20 min; 2 kg for 120 min; 2.5 kg for 90 min. Cheeses were turned over three times during three hours. The process was finalized by brining the experimental cheeses for 60 min, in a sodium chloride solution (200 g L⁻¹). During ripening, the cheeses were stored in a ripening chamber at 10°C and 75% relative humidity. Three independent cheese preparations were done for each group.

3.3.4.3 Cheese Sampling

For each cheese formulation samples were removed at 1, 30, 60 and 90 days of ripening time. Each cheese was divided in parts for microbiological and physicochemical analyses. The results were compared to the levels permitted by the Brazilian legislation for cheeses (MAPA, 1996; ANVISA, 2001).

3.3.4.4 Microbiological Analyses

After removed the rind, 10 g fractions from each sample were obtained by cutting slices, each containing equal quantities of the innermost, intermediate and outermost parts. These 10 g sub-samples were aseptically handled and homogenized with 90 mL of sterile saline for 2 min in a blender. After filtering through sterile gauze, the homogenate was decimally diluted in sterile saline and selected dilutions were plated in duplicate on the specific media required

for the different microbial groups. The microbiological analyses were selected based on the Brazilian legislation for cheeses (MAPA, 1996; ANVISA, 2001).

Mesophilic aerobic bacteria were enumerated by spread plating on Plate Count Agar (PCA, Oxoid), incubated at 35°C for 48 h (MAPA, 2003). The Presumptive and Confirmed Tests for coliform group were evaluated on 3-replicate, 3 dilution tube MPN procedure, at 35°C. The faecal coliform group was determined by EC Broth MPN Method at 45°C (APHA, 2002). Coagulase-positive staphylococci were enumerated by spread plating on Baird Parker agar (Oxoid) at 35-37°C for 48 h, confirmed using coagulase test (APHA, 2002). Lipolytic microorganisms were plated on tributyrin agar (Himedia), incubated at 22°C for 5 days, and proteolytic microorganisms were determined on 1% (w/v) skim milk agar, at 22°C for 3 days (MAPA, 2003). Mesophilic lactobacilli were determined on MRS agar (pH 5.5) anaerobically incubated at 30°C for 72 h (APHA, 2002). Detection of *Salmonella* spp. was carried out on 25 g samples, and the presence-absence determination was performed based on *Salmonella* Species Presumptive and Confirmation Tests (APHA, 2002).

3.3.4.5 Physicochemical Analyses

Total N and fat analyses were carried out using macro-Kjeldahl method (conversion factor 6.38) (IDF, 1993) and Gerber Method (IDF, 1997), respectively. Cheese moisture was determined using a forced-air, oven drying method at 100°C for 24 h (AOAC, 2000). The pH determination was measured with a glass electrode (Model BT-600, Boeco) at ambient temperature (IAL, 2008). The total energy was estimated using the modified Atwater factors (Hunt *et al.*, 1987), as:

$$TE = (\text{g protein} \times 4) + (\text{g fat} \times 9) + (\text{g carbohydrate} \times 9)$$

3.3.4.6 Assessment of proteolysis

Soluble nitrogen at pH 4.6 (pH 4.6 SN) and trichloroacetic acid (TCASN) were determined and expressed as a percentage of the total N content (Bynum and Barbano, 1985). Soluble nitrogen at pH 4.6 was quantified as the total

nitrogen after separation of the soluble fraction by precipitation of the casein nitrogen in acetate buffer (pH adjusted to 4.6 using acetic acid). The non-protein nitrogen was quantified after separation of the protein fraction in a 120 g L⁻¹ TCA solution. Nitrogen in the aqueous phase was then estimated using the Kuaye method (Kuaye, 1994).

Using the experimental data generated, proteolytic indices were calculated as ratios between the various soluble fractions prepared to total nitrogen (TN): ripening extension index, pH 4.6SN/TN; ripening depth index, TCASN/TN.

3.3.4.7 Statistical analysis

ANOVA was used to assess the effects of cheeses formulations (groups 1, 2, 3, and 4) and ripening time (1, 30, 60, 90 days). Differences were tested between samples within same formulation group or samples with same ripening time. Treatment comparisons were performed using Student-Newman-Keuls test. All statistical analyses were carried out using the SPSS v.14.0.0 software (SPSS, USA) to assess statistically significant differences ($P < 0.05$).

3.3.5 Results and discussion

3.3.5.1 Microbiological characterization of Fascal cheese

The concentrations of lactobacilli during cheese ripening ranged from 6.2 to 8.4 log CFU g⁻¹ (Table 1). There were no significant differences ($P < 0.05$) in the number of lactobacilli in the freshly pressed cheese blocks. Variations were observed in cheeses produced with commercial starter, showing a significant decrease during all ripening time. Similar results were observed for the cheeses without addition of inoculum, with significant reduction between 1 and 60 or 90 day-ripening. A gradual decline in lactobacilli counts was noted as ripening progressed, resulting in a discrete reduction after 3 months. This result was in agreement with those reported by Sallami *et al.* (2004) for Cheddar cheese. Viable counts of lactobacilli were enumerated as 8 log CFU g⁻¹ in 60 days-old La Serena cheese (Freitas and Malcata, 2000).

Lactic acid bacteria were the dominant microbiota of fresh Vastedda cheese and the values were similar to the initial counts verified in Fascal cheeses, considering that Vastedda undergo a heat stress given by the stretching of the curd made from raw milk without starter addition. After 60 ripening days for both cheeses, the values remained similar (Mucchetti *et al.*, 2008). In this work selected LAB strains were identified as *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, and *Lactococcus* ssp. Evaluation of LAB in cheeses from Azeitão, Évora, Serpa, Serra da Estrela and La Serena regions revealed that *Lc. lactis*, *Lb. casei* subsp. *casei* and *pseudopantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* and *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis* and *Pediococcus* spp. were most frequently found (Freitas and Malcata, 2000).

Table 1 (9). Microbiological counts in Fascal cheeses during ripening.

Cheese age (days)	Counts (log CFU ml ⁻¹)				
	Mesophilic bacteria	Lactobacilli	Total coliforms	Fecal coliforms	Coagulase (+) staphylococci
<i>Group 1</i>					
1	6.05 ± 0.37 ^{a,b,c}	7.17 ± 0.13 ^{a,d}	2.85 ± 0.11 ^a	2.85 ± 0.11 ^a	3.45 ± 0.04 ^{a,b}
30	6.55 ± 0.38 ^{a,d}	7.73 ± 0.05 ^{a,b,c,e}	2.23 ± 0.09 ^c	1.92 ± 0.03 ^b	3.85 ± 0.36 ^{a,c}
60	5.48 ± 0.72 ^{a,b,e}	8.43 ± 0.33 ^{b,f}	1.75 ± 0.07 ^d	1.62 ± 0.15 ^{c,d}	4.43 ± 0.27 ^{a,d,e}
90	4.45 ± 0.14 ^{b,f}	6.89 ± 0.33 ^{a,c,g,h}	1.17 ± 0.07 ^f	1.00 ± 0.09 ^e	3.75 ± 0.28 ^{a,f}
<i>Group 2</i>					
1	6.64 ± 0.23 ^{c,g}	7.48 ± 0.02 ^{d,i}	2.71 ± 0.19 ^{a,h}	2.71 ± 0.19 ^a	3.19 ± 0.44 ^{b,g}
30	6.07 ± 0.32 ^{d,g,h}	8.28 ± 0.22 ^{e,i}	1.99 ± 0.11 ^{c,i}	1.46 ± 0.08 ^{b,f}	3.63 ± 0.10 ^{c,g}
60	4.56 ± 0.09 ^{e,h}	7.52 ± 0.25 ^{f,i}	2.37 ± 0.17 ^{d,e,h,i}	1.42 ± 0.22 ^{c,f}	3.49 ± 0.06 ^{d,g}
90	4.85 ± 0.14 ^{f,h}	6.15 ± 0.31 ^g	0.90 ± 0.03 ^{f,g}	0.54 ± 0.04 ^e	3.58 ± 0.10 ^{f,g}
<i>Group 3</i>					
1	5.75 ± 0.44 ^{c,i}	7.31 ± 0.18 ^{d,k}	2.06 ± 0.15 ^{b,k}	1.49 ± 0.18 ^g	3.81 ± 0.09 ^{b,h}
30	6.00 ± 0.24 ^{d,i}	7.70 ± 0.17 ^{e,k}	1.92 ± 0.03 ^{c,k}	1.80 ± 0.10 ^{b,g}	3.78 ± 0.12 ^{c,h}
60	5.07 ± 0.05 ^{e,i}	7.73 ± 0.13 ^{f,k}	2.20 ± 0.07 ^{d,k}	1.18 ± 0.08 ^{c,g,h}	3.48 ± 0.28 ^{d,h}
90	5.18 ± 0.02 ^{f,i}	7.08 ± 0.32 ^{g,h,k}	0.66 ± 0.11 ^g	0.48 ± 0.01 ^{e,h}	3.56 ± 0.25 ^{f,h}

Table 1 (9). Continuation.

Group 4					
1	6.13±0.45 ^{c,k}	7.62±0.20 ^{d,m}	2.61±0.25 ^{a,b,m}	2.56±0.28 ^{a,i}	4.42±0.01 ^{b,i}
30	6.75±0.10 ^{d,k}	7.08±0.12 ^{e,m}	1.92±0.03 ^c	1.80±0.10 ^{b,k,m}	4.46±0.30 ^{c,i}
60	5.84±0.28 ^{e,k}	8.23±0.29 ^{f,m}	2.85±0.11 ^{e,m}	2.27±0.23 ^{d,k}	5.00±0.41 ^{e,i}
90	5.18±0.08 ^{t,k}	7.93±0.35 ^{h,m}	1.34±0.27 ^t	1.14±0.38 ^{e,i,m}	4.03±0.15 ^{t,i}

Means within the same columns with different superscriptions are significantly different ($P < 0.05$). Group 1, control without starter; Group 2, commercial starter culture; Group 3, *Lb. plantarum* LCN28 and *Lb. rhamnosus* LCN43; Group 4, *Lb. plantarum* LCN17 and *Lactococcus* sp. LCN20.

Mesophilic aerobic bacteria were enumerated during the ripening time. A decline in the counts from production to whole ripening process was observed (Table 1). There were significant decrease in the group 1, between 30 and 90 days of ripening, and in the group 2, between 1 and 60 days of ripening. The counts of mesophilic aerobic bacteria ranged from 4.5 to 6.7 log CFU g⁻¹, lower than those observed in fresh or ripened Vastedda cheeses (Mucchetti *et al.* 2008) and in cheeses produced in Portugal and Spain (Freitas and Malcata, 2000; Kongo *et al.* 2009).

Counts of proteolytic microorganisms were variable during the ripening period (Fig. 1). Significant reduction was observed in all groups, comparing the beginning and the end of the ripening period. At day 90, group 3 displayed significant lower values for this parameter relative to other groups. During ripening of Serpa cheese, the values ranged from 4 to 5 log CFU g⁻¹ (Freitas and Malcata, 2000). *Lc. lactis* subsp. *lactis* showed proteolytic activity in skim milk greater than that of *Lb. casei*, but such activity in *Lb. plantarum* was very low. All of these bacteria were isolated from traditional Majorero, a cheese manufactured with caprine milk (Freitas and Malcata, 2000). Besides, enumeration of lipolytic microorganisms revealed the same tendency. The initial rise in counts was observed for all groups, in the period between 1 and 30 days, and then a significant decrease occurred during the ripening time (Fig. 1).

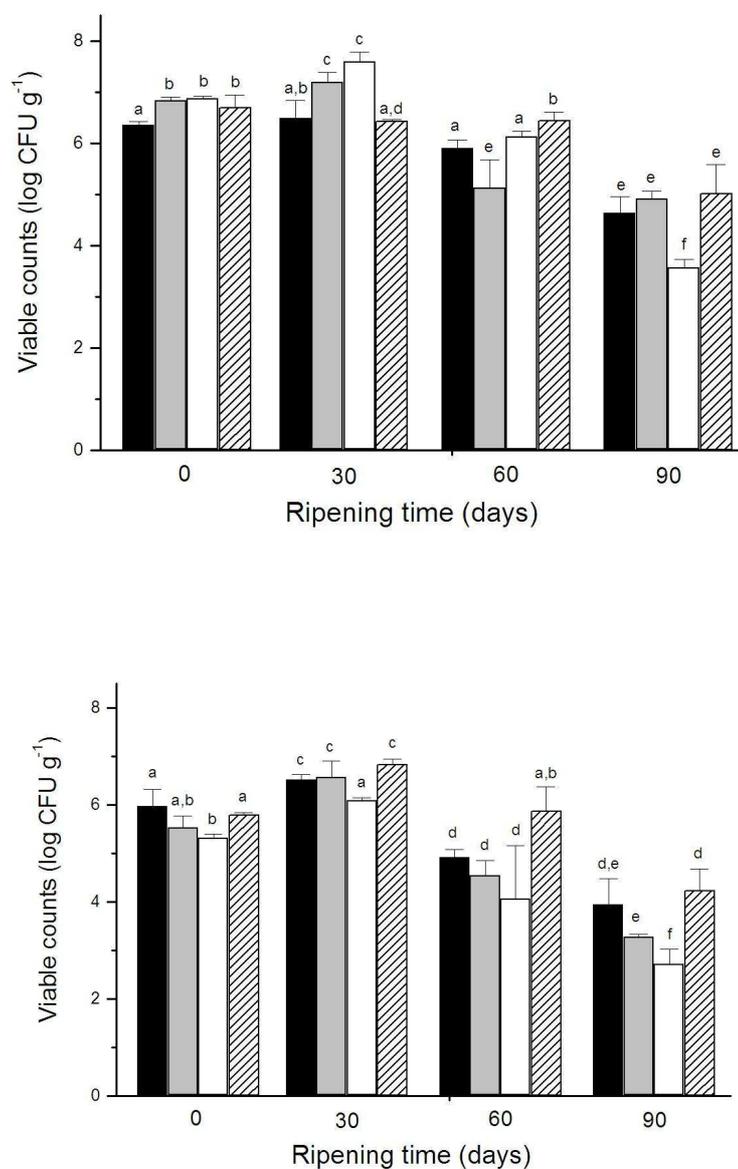


Figure 1 (4). Viable counts of proteolytic microorganisms on Milk Agar (upper panel) and lipolytic microorganisms on Tributyrin Agar (lower panel) in Fascal cheeses. Group 1 (black bars); Group 2 (gray bars); Group 3 (white bars); Group 4 (dashed bars). Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Salmonella spp. could not be detected in 25 g of cheese, for all samples and ripening times. This pathogen is used as a marker of food safety according to Brazilian food standards for cheeses and these results were considered adequate (MAPA, 1996; ANVISA, 2001). All 3 month-ripened cheeses

contained low numbers of total and faecal coliforms (Table 1), within the limits established for Brazilian legislation (MAPA, 1996; ANVISA, 2001), and lower than those cited for other ewe's cheese (Mucchetti *et al.*, 2008). Detection of total coliforms, faecal coliforms and *Escherichia coli* in Portuguese and Spanish ovine cheeses were extremely variable (Freitas and Malcata, 2000), in general higher than those observed for Fascal cheese samples. On the other hand, values observed for coagulase positive staphylococci (Table 1) were greater than those established for Brazilian legislation (MAPA, 1996; ANVISA, 2001). Similar values were reported in fresh curd of raw milk Manchego cheese, with coagulase positive staphylococci commonly found at levels of 4 to 5 log CFU g⁻¹ (Freitas and Malcata, 2000). At the end of ripening, higher counts of coliforms and coagulase positive staphylococci were verified in group 4.

3.3.5.2 Chemical characterization of Fascal cheese

Aging time had the largest impact on cheese composition, significantly affecting the changes in chemical parameters ($P < 0.05$) (Table 2). The pH values differed slightly at the beginning of ripening, and ranged from 5.0 to 5.4 during this period. De Angelis *et al.* (2001), Mendia *et al.* (2000), Rizzello *et al.* (2005), and Fallico *et al.* (2006) found similar values for other ewe's cheeses. There were no significant differences between the pH values in day 0 and the same was observed in experimental Portuguese cheeses manufactured with different inoculums (Pereira *et al.*, 2008). The incorporation of LAB in Fascal cheeses caused significant effect ($P < 0.05$) on cheese pH values after 90 days ripening. Higher values were observed in group 1 and group 4, and lower value was verified in group 3. Data pertaining to pH indicate the influence of inoculum upon acidification of model cheeses. The mixture with *Lb. plantarum* (LCN 28) and *Lb. rhamnosus* (LCN 43) was most effective in reducing pH than those with the mixture with *Lb. plantarum* (LCN 17) and *Lactococcus* sp. (LCN 20). Pereira *et al.* (2008) observed that *Lc. lactis* and *Lb. brevis* showed statistically different behaviours upon acidification as single cultures. However, the pH profile in the mixture was similar to that obtained for *Lc. lactis* alone, thus indicating its higher acidification capacity.

Table 2 (10). Chemical composition of Fascal cheeses during ripening.

Cheese age (days)	pH	Moisture (g 100g ⁻¹)	Protein (g 100g ⁻¹)	Fat (g 100g ⁻¹)	Ash (g 100g ⁻¹)	Caloric Value (kcal 100g ⁻¹)
<i>Group 1</i>						
1	5.03 ± 0.02 ^a	41.46±0.98 ^a	18.13±0.70 ^{a,b}	30.87±0.11 ^a	1.57±0.33 ^{a,c}	382.23±2.04 ^a
30	5.15 ±0.02 ^{b,c}	38.94±0.45 ^{a,b}	20.20±0.66 ^{a,c}	31.35±1.00 ^{a,d}	1.78±0.04 ^{a,d}	393.89±6.61 ^{a,d}
60	5.19±0.02 ^{b,d,e}	37.56±0.79 ^{b,d,e}	22.46±0.06 ^{d,e}	35.91±0.97 ^b	3.01±0.07 ^{b,e}	417.25±8.29 ^{b,g}
90	5.32±0.01	34.99±1.05 ^{b,f}	25.51±0.43 ^f	36.68±0.33 ^{b,h}	2.72±0.14 ^{b,g}	435.20±3.41 ^{b,i}
<i>Group 2</i>						
1	5.00±0.01 ^a	46.98±0.10 ^g	16.87±0.88 ^{b,h}	24.30±0.30 ^c	2.82±0.22 ^h	322.32±0.23 ^c
30	5.13±0.01 ^c	42.49±0.83 ^c	18.25±0.80 ^{c,h}	28.45±0.40 ^{e,j}	2.93±0.07 ^h	360.57±5.01 ^e
60	5.25±0.02 ^d	36.57±0.99 ^d	24.00±0.47 ^{d,i}	30.11±0.84 ^{f,j}	2.22±0.05 ^{e,f,h}	395.41±7.98 ^h
90	5.23±0.03	31.88±1.09 ^h	24.59±0.09 ^{f,g,i}	33.75±0.16 ⁱ	2.49±0.17 ^{g,h}	431.29±5.83
<i>Group 3</i>						
1	5.00±0.01 ^a	49.65±0.48 ^g	15.27±0.54 ^j	25.46±0.88 ^c	1.81±0.21 ^{c,i,j}	321.50±7.16 ^c
30	5.08±0.01 ^{c,f}	43.40±0.94 ^c	18.63±0.36 ^c	28.94±0.12 ^e	1.27±0.03 ^{d,j}	366.04±4.20 ^{e,f}
60	5.15±0.03 ^{e,f,g}	36.67±0.73 ^d	24.39±0.01 ^d	32.20±0.47 ^{f,g}	2.27±0.27 ^{e,f,i}	405.28±0.47 ^{g,h}
90	5.14±0.01 ^g	29.99±0.65 ^h	29.08±0.16	36.54±0.10 ^h	2.35±0.17 ^{g,i}	453.36±1.41 ⁱ
<i>Group 4</i>						
1	5.00±0.02 ^a	47.22±0.65 ^g	18.94±0.43 ^{b,l}	27.39±0.65	1.61±0.19 ^{c,k}	341.65±0.10
30	5.10±0.01 ^c	43.03±0.64 ^c	20.23±0.78 ^{c,l,m}	31.85±0.19 ^{d,k}	1.94±0.11 ^{d,k}	379.37±1.17 ^{d,f}
60	5.31±0.03	40.16±0.75 ^e	21.51±0.01 ^{e,m,n}	33.24±0.70 ^{g,k,l}	1.42±0.07 ^{f,k}	399.88±0.22 ^h
90	5.38±0.01	36.93±0.74 ^f	22.73±0.41 ^{g,n}	35.05±0.12 ^{h,i,l}	1.92±0.22 ^{g,k}	419.83±1.47 ⁱ

Means within the same columns with different superscriptions are significantly different ($P < 0.05$). Group 1, control without starter; Group 2, commercial starter culture; Group 3, *Lb. plantarum* LCN28 and *Lb. rhamnosus* LCN43; Group 4, *Lb. plantarum* LCN17 and *Lactococcus* sp. LCN20.

The moisture values varied greatly from 29.9 to 49.6 g 100g⁻¹, depending on the ripening period and cheese treatment (Table 2). The final values for groups 1, 2 and 3 were 35.0, 31.9 and 30.0 g 100g⁻¹, respectively, being classified as low moisture or hard cheeses under Brazilian Identity and Quality Standards of Cheeses. The value of group 4 was slightly above, 36.9 g 100g⁻¹, being classified as medium moisture or semi-hard cheese (MAPA, 1996). A study with Portuguese cheeses produced without or with different inoculum demonstrated that the type of inoculum had no significant impact on the levels of moisture (Pereira *et al.*, 2008).

The dry matter (DM) values were similar than those observed in Pecorino Sardo (Madrau *et al.*, 2006) and Idiazabal cheeses (Mendia *et al.*, 2000). The initial values of DM in Fascal cheeses were similar than the values evaluated in freshly made Vastedda cheese (Mucchetti *et al.*, 2008).

Protein content increased during cheese ripening as a result of the significant decrease in moisture content (Table 2). Three months-ripened Ragusano cheeses were analyzed in four layers (rind, external, middle, and internal) and the protein values were inversely related to moisture values (Fallico *et al.*, 2004). The final values of protein concentration in Fascal cheeses were similar than those observed in Vastedda cheese obtained from renneting vat (Mucchetti *et al.*, 2008). There were no variations in the protein content in cheeses manufactured with either *Lc. lactis*, *Lb. brevis* or both mixed culture strains, or without inoculum (Pereira *et al.*, 2008).

The fat concentration ranged from 24.3 to 36.7 g 100g⁻¹, depending on the ripening time and cheese formulation (Table 2). Final values for the amount of fat in dry matter ranged from 49.6 to 56.4 g 100g⁻¹, approaching those reported for Piacentinu Ennese (Fallico *et al.*, 2006) and Idiazabal (Mendia *et al.*, 2000), and exceeding those for Pecorino Sardo (Madrau *et al.*, 2006), Ragusano (Fallico *et al.*, 2004) and Vastedda cheeses (Mucchetti *et al.*, 2008). Because such high values were observed, all 3 month-ripened Fascal cheese was classified as fatty cheese under Brazilian Identity and Quality Standards of Cheeses (MAPA, 1996).

3.3.5.3 Soluble nitrogen and proteolysis

The content of nitrogen soluble in pH 4.6 of all experimental cheeses increased over the ripening period (Fig. 2). Group 4 cheeses produced with *Lb. plantarum* (LCN 17) and *Lactococcus* sp. (LCN 20) produced significantly more pH 4.6SN than Group 3 *Lb. plantarum* (LCN 28) and *Lb. rhamnosus* (LCN 43), during the ripening period. Production of pH 4.6SN in Group 1 and Group 2 cheeses differed only slightly. The results are in agreement with the study of Sallami *et al.* (2004), who reported no obvious differences in pH 4.6SN for

Cheddar cheeses manufactured with or without adjunct cultures. The larger discrepancies found in Portuguese cheeses, especially at the end of ripening, were found mainly between control cheeses (without inoculum) and those inoculated with any form of starter culture. Significantly higher pH 4.6SN/TN values for model cheeses inoculated with a combination of *Lb. brevis* and *Lc. lactis* were apparent, when compared to the other model cheeses and especially with control cheeses (Pereira *et al.*, 2008).

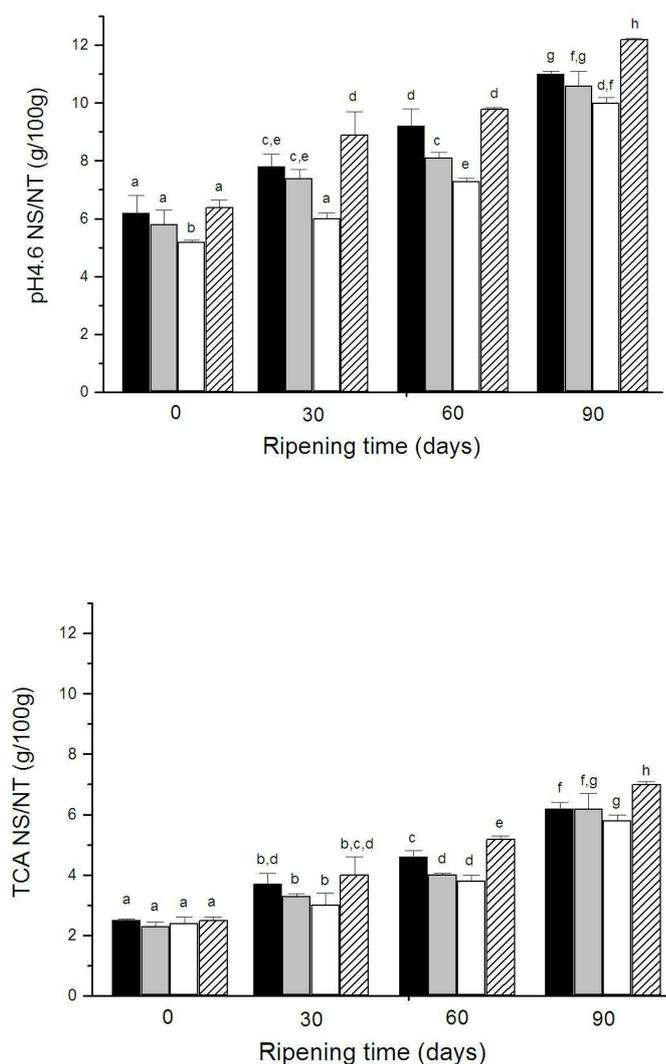


Figure 2 (5). Evolution of soluble nitrogen (SN) at pH 4.6 (upper panel) and trichloroacetic acid (lower panel), in relation to total nitrogen (TN), in Fascal cheeses. Group 1 (black bars); Group 2 (gray bars); Group 3 (white bars); Group 4 (dashed bars). Means with common letters are significantly different ($P < 0.05$).

The TCASN content ranged from 2.5 to 6.9 g 100g⁻¹. The initial values were lower than observed in recently manufactured Cheddar cheese (Emmons *et al.*, 2003). The values in 4 months-ripened Pecorino Sardo (Madrau *et al.*, 2006) and 3 months-ripened Idiazabal (Mendia *et al.*, 2000) were much higher than those observed in Fascal after 3 months of ripening. Considering the effects of type of inoculum, the TCA SN/TN ratio progressively increased with time, in a similar fashion to that of pH 4.6 SN/TN until the end of the ripening period.

The cheese proteolysis measured by the ratio of TCASN to pH 4.6SN, increased with the age of Fascal cheese. Proteolysis in cheese is often measured by means of quantification of cheese WSN and TCASN buffers. Milk proteinases could contribute to primary proteolysis, and the increment during the later stage of ripening is associated with bacterial proteinases, which are extensively released via lysis of their microbiota (Pereira *et al.*, 2008). TCASN consists primarily of small peptides, free amino acids (FAA), and other minor nitrogenous compounds produced by both starter and non-starter bacteria (Sousa *et al.*, 2001).

Both pH 4.6SN and TCASN, expressed as a percentage of total N, increased in the different Fascal formulations as the cheese aged (Fig. 2). Both proteolysis indices were comparable to other ewes' milk cheese, such as Piacentinu Ennese (Fallico *et al.*, 2006), and much higher compared with Parmigiano-Reggiano and Serra da Estrela (Sousa *et al.*, 2001). Piacentinu Ennese cheese undergoes a very low extent of proteolysis during aging; chymosin plays a major role in regulating the primary hydrolysis of caseins and peptidases from microbiota contribute to the slow formation of small peptides and FAA (Fallico *et al.*, 2006). In Ragusano cheese produced with cow's milk, proteolysis was significantly affected by cheese layer and age. Significant increases in nitrogen soluble in WSN and TCASN were found from rind to core and throughout ripening (Fallico *et al.*, 2004). The season of the year exerted a marked influence on proteolysis in Idiazabal cheese. Higher levels of α - and β -casein degradation, higher soluble nitrogen and non-protein nitrogen contents,

and higher total FAA contents were recorded in summer (Mendia *et al.*, 2000), the same season when Fascal cheese were manufactured.

The combination of *Lb. plantarum* (LCN 17) and *Lactococcus* sp. (LCN 20) was the most effective at increasing the pH 4.6SN content. As shown by the viable cell counts (Table 1), these cheeses showed higher values for lactobacilli. Lactobacilli cell lysis released intracellular proteolytic enzymes in cheese slurry, decreasing the residual percentage of α s₁- and β -CN fractions within 30 d of incubation (Sousa *et al.*, 2001). Sallami *et al.* (2004) studied the effect of incorporating a highly autolytic lactobacilli (*Lb. bulgaricus* UL12), a highly proteolytic lactobacilli (*Lb. casei* L2A), and nisin-producing strain (*Lc. diacetylactis* UL719) into Cheddar cheese starter cultures on the properties of resultant cheeses. Results showed that proteolysis was accelerated by using autolytic lactobacilli.

3.3.6 Conclusions

Fascal cheeses manufactured with different starter cultures showed variability in microbiological and chemical parameters. The addition of cultures selected in this study (*Lactobacillus plantarum* LCN 28 and *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43) appears to be beneficial in the disappearance of undesirable microbiota. Supporting the proposal of traditional technology of Fascal cheesemaking, produced with raw milk and ripening period longer than 60 days, the use of autochthonous LAB cultures could be used to ensure the manufacture of typical raw milk cheese.

Authors thank Confer Foods for facilitating the access to dairy plant. This work was supported by CNPq and CAPES (Brazil).

3.3.7 References

Abeni F, Degano L, Calza F, Giangiacomo R & Pirlo G 2005 Milk quality and automatic milking: fat globule size, natural creaming, and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 88 3519-3529

ANVISA 2001 Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Resolução RDC N° 12, 02/01/2001*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA 2002 *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washington: American Public Health Association

AOAC 2000 *Official Method of Analysis*, 17th ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists

Bynum DG & Barbano DM 1985 Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese manufacture: chemical changes during aging. *Journal of Dairy Science* 68 1-10

Casper JL, Wendorff WL & Thomas DL 1998 Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science* 81 3117-3122

Cogan TM, Barbosa M, Beuvier E, Bianchi-Salvadori B, Cocconcetti PS, Fernandes I, Gomez J, Gomes R, Kalantzopoulos G, Ledda A, Medina M, Rea MC & Rodriguez E 1997 Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64 409-421

De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR & Gobbetti M 2001 Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 67 2011-2020

El Soda M, Madkor SA & Tong PS 2000 Adjunct cultures: recent developments and potential significance to the cheese industry. *Journal of Dairy Science* 83 609-619

Emmons DB, Dube C & Modler HW 2003 Transfer of protein from milk to cheese. *Journal of Dairy Science* 86 469-485

Fallico V, McSweeney PLH, Siebert KJ, Horne J, Carpino S & Licitra G 2004 Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science* 87 3138-3152

Fallico V, Tuminello L, Pediliggieri C, Horne J, Carpino S & Licitra G 2006 Proteolysis and microstructure of Piacentinu Ennese cheese made using different farm technologies. *Journal of Dairy Science* 89 37-48

Mucchetti G, Bonvini B, Remagni MC, Ghiglietti R, Locci F, Barzaghi S, O'Sullivan L, Ross RP, Hill C, Francolino S, Perrone A, Rubiloni A, Campo P, Gatti M & Carminati D 2008 Influence of cheese-making technology on composition and microbiological characteristics of Vastedda cheese. *Food Control* 19 119-125

Freitas C & Malcata FX 2000 Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protegéé and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science* 83 584-602

Hunt C, Burn P & Adamezuk ZC 1987 Proximate composition and fat type of three popular take away meal. *International Journal of Food Science and Technology* 22 669-675

IAL 2008 *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 4th ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz

IBGE 2006 *Pesquisa da Pecuária Municipal 2006*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Retrieved August 20, 2008, from: <http://www.ibge.gov.br>.

IDF 1993 Milk. Determination of nitrogen content. *IDF Standard 20B*. Brussels: International Dairy Federation

IDF 1997 Milk and Milk Products. Determination of fat content. *IDF Standard 152A*. Brussels: International Dairy Federation

Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX & McSweeney PLH 2009 Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry* 112 207-211

Kuaye AY 1994 An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry* 49 207-211

Madrau MA, Mangia NP, Murgia MA, Sanna MG, Garau G, Lecci L, Caredda M & Deiana P 2006 Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal* 16 876-885

Marshall RT 1992 *Standard methods for the examination of dairy products*. 16th ed. Washington: American Public Health Association

Mendia C, Ibañez FC, Torre P & Barcina Y 2000 Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal cheese. *Journal of Dairy Science* 83 1899-1904

MAPA 2003 Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Instrução Normativa Nº. 62*, 26/08/2003. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MAPA 1996 Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Portaria Nº. 146*, 11/03/1996. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Pereira CI, Gomes EO, Gomes AMP & Malcata FX 2008 Proteolysis in model Portuguese cheeses: effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry* 108 862-868

Pisano MB, Fadda ME, Deplano M, Corda A, Casula M & Cosentino S 2007 Characterization of Fiore Sardo cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Journal of Dairy Research* 74 255-261

Rizzello CG, Losito I, Gobbetti M, Carbonara T, De Bari MD & Zambonin PG 2005 Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science* 88 2348-2360

Sallami L, Kheadr EE, Fliss I & Vuilleumard JC 2004 Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 87 1585-1594

Schillinger U & Lucke FK 1989 Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55 1901-1906

Scintu MF & Piredda G 2007 Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research* 68 221-231

Sousa MJ, Ardo Y & McSweeney PLH 2001 Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11 327-345

3.4 ARTIGO 4

3.4.1 *Effect of calcium on ovine caseinate functional properties*

3.4.2 *Abstract*

The solubility of colloidal particles of ovine caseinate in the presence of calcium was followed comparing the colloidal particle size and the protein composition of colloidal particles remaining in suspension. A comparison with the behaviour of bovine caseinate was carried out. A sequential salting-out process due to progressive Ca^{2+} binding to at least two kinds of sites was observed to both caseinates. The precipitation curves were fitted and the affinity constants and binding site numbers were calculated with an equation based in the concept of Wyman's linked functions. Ovine caseinate colloidal aggregates formed in the presence of calcium turned out to be less stable and bigger than bovine ones. The binding of calcium to protein residues modifies the composition and the conformation of caseinates. An aggregation process at low ovine caseinate concentration and a gelation process at high protein concentration induced by the hydrolysis of glucono- δ -lactone were studied in presence of calcium concentration which no precipitation occur. The presence of calcium affects the kinetic of both processes and the final state of aggregates or gels formed. The degree of compaction and average size of the aggregates and rheological properties of gels formed at the end of the acidification process depend on the calcium concentration added.

Keywords: Ovine caseinate, calcium, solubility, acid aggregation and gelation, glucono-delta-lactone

3.4.3 Introduction

Production of typical dairy products from ewes can provide a profitable alternative to cow milk products owing to their specific taste, texture and their natural and healthy properties. Some major reviews exist concerning the biochemical composition of sheep milk. In fact it is well known that sheep milk contains approximately a double concentration of proteins, fats and a higher energetic value than cow milk (Park *et al.*; 2007). It also contains vitamins and an important source of macro-minerals and oligoelements. In ewes cheese, the amount of these nutrients is even higher than the one observed in sheep milk due to their concentration during the cheese manufacture process (Suárez and Buseti, 2006). Sheep milk is a more suitable source for cheese production compared to cow milk since ovine milk is characterized by a lower colloidal stability (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

The main protein fraction in ovine milk is represented by caseins (76-83% of total proteins). These proteins and its derived caseinates are extensively used in food industry because of their physicochemical, nutritional and functional properties, and make them useful ingredients in complex food preparations (Park *et al.*, 2007). Caseinates are added to different products because of their high emulsifying, water-binding and gelation capacities, their resistance to heat treatments and their contribution to the food texture and juiciness. Some of these properties make caseinates helpful ingredients in the preparation of bakery and confectionery products, where they can be used as milk substitutes (Gaucheron *et al.*, 1997). Cheese making, i.e. renneting properties, of sheep milk are affected by its physicochemical properties, including pH, larger casein micelle, more calcium per casein weight, and other mineral concentration in milk, which cause differences in coagulation time, coagulation rate, curd firmness, and amount of rennet needed (Ramos and Juárez, 2003; Park *et al.*, 2007). However, these physicochemical properties of ovine caseins have still need be matter of further research.

From a nutritional point of view, caseins have all the essential aminoacids and an important function in the transport of calcium and phosphate, representing an easily digestible source of nutrients, contributing to a carefully balanced diet (Linde, 1982). Caseins occur in milk as stable colloidal aggregates known as casein micelles, mainly composed by α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -casein (α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -CN) linked together with the contribution of colloidal calcium phosphate, a mineral complex involving mainly calcium and phosphate ions (Holt, 1997). Regarding the aminoacidic composition of ovine and bovine caseins, no difference is observed between the number of α_{S1} -CN residues, while α_{S2} and κ -CN possess a higher number of residues. In the other hand, ovine β -CN contains a lesser number of residues than the bovine counterpart (Park *et al.*, 2007).

Industrial caseinates are obtained from milk caseins in different ways, and are generally associated with sodium, potassium, calcium or magnesium ions. Their functional properties are different according to the associated cations. Particularly, calcium ions produce a number of important effects on casein solubility and colloidal stability. Therefore, calcium binding to caseins is important in food processing when calcium caseinate is used as ingredient (Mora-Gutierrez *et al.*, 1993b). Studies with purified caseins showed that individual α_{S1} -, α_{S2} - and β -CN are readily precipitated by calcium ions, whereas κ -CN is not. On the contrary, this latter component is able to stabilize the other casein components against the flocculating action of calcium ions by the formation of stable colloidal aggregates (Mora-Gutierrez *et al.*, 1993a). Although solubility and colloidal stability of bovine caseins in the presence of calcium ions have been studied by different authors from thermodynamic and kinetic approaches (Farrel *et al.*, 1988; Horne, 1979), research regarding ovine caseins has merited lower attention.

Dissociation and aggregation of casein fractions due to caseinate acidification results in the formation of a gel structure. A possible explanation to this phenomena is that as pH is adjusted toward the isoelectric point causes a decrease of the repulsive interactions, resulting in a destabilization of the

system as pH drops below approximately 5 at a given temperature (Braga *et al.*, 2006; Ruis *et al.*; 2007). One acidification process that has gained the attention of food industry is direct acidification by the addition of a lactone, such as glucono- δ -lactone (GDL) which avoids some of the difficulties associated with the traditional process of using bacteria. In fact the final pH of the system is a function of the amount of GDL added whereas starter bacteria produce acid until they are inhibited by the low pH (Braga *et al.*, 2006).

Casein gels are responsible for most of the rheological/textural properties (i.e. stretch, fracture) of ewe cheese and other dairy products. Rheological properties are examined as a quality control method in food industry to perform research on the structure/texture of food products. Although rheological characteristics and functional properties of cow milk and its dairy products have been extensively studied, the documentation on those of sheep milk products are scarce (Park, 2007).

In this work, an overall study of the physicochemical parameters of whole ovine caseinates in presence of calcium was performed. Solubility of ovine casein in presence of calcium was studied from a thermodynamic approach using the concept of Wyman's linked functions (Wyman, 1964). Using the fluorescence technique, the possible conformational changes exhibited by casein due to the effect of calcium was investigated. Acid aggregation of calcium caseinate (Ca-Cas) was analyzed on the basis of spectrophotometric measures and a particle size analysis, whereas gelation was investigated by following the rheological properties of the system.

3.4.4 Materials and methods

3.4.4.1 Precipitation of ovine casein

The procedure was followed for the preparation of ovine casein from milk of Lacaune breed sheep from Southern Brazil. After centrifugation at 10,000 *g* for 10 min at 4°C, the skim milk was acidified at pH 4.5 with 1 M acetic acid under continuous stirring at 25°C. After 30 min at 40°C, the mixture was filtered through Whatman N°40 paper using a vacuum pump. The precipitated casein

was washed with distilled water, dissolved with the addition of 10 g L^{-1} NaOH until it reached pH 7.0 and precipitated again. Four successive cycles of precipitation and washing were carried out. The final precipitate was washed with acetone and chloroform if necessary, to remove the residual fat globules (Moatsou *et al.*, 2004; Shalichev and Tanev, 1972).

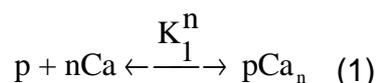
3.4.4.2 Colloidal stability test

Sodium caseinate (10 g L^{-1}) was prepared from the previously obtained ovine casein, by dissolving 1 g casein in 50 ml 0.1 M NaOH. Dissolution of ovine casein was adjusted to a final pH 6.8 by adding 0.1 M HCl and taken to a final volume of 100 ml with distilled water (Gatti *et al.*, 1999).

Two millilitres of desired concentration (0 to 30 mM) of calcium chloride in 0.2 M imidazole buffer pH 6.8, were added to 2 mL of protein solution in thick-walled centrifuge tubes. The tubes were inverted three times and allowed to stand in a 25°C water bath for 1 hour. Tubes were centrifuged at 1500 g for 20 minutes (Mora-Gutierrez *et al.*, 1993a; 1993b). Precipitates (insoluble casein aggregates) and supernatant (casein colloidal aggregates, CCA) were obtained. Each experiment was replicated at least twice.

3.4.4.3 Precipitation of casein by Ca^{2+}

Caseinate precipitation by Ca^{2+} was interpreted by Farrell *et al.* (Farrell *et al.*, 1988; Mora-Gutierrez *et al.*, 1993a; 1993b) using the concept of Wyman's linked functions (Wyman, 1964), assuming that the cation binding to the protein is followed by the precipitation or salting-out of the less soluble calcium caseinate formed:



where p is the unbound protein, n is the number of Ca^{2+} moles bound to the specie $p\text{Ca}_n$ and K_1^n is the equilibrium constant of the process of precipitation

or salting out. The mathematical relationship representing the above stoichiometry will be:

$$S_{\text{app}} = S_0 f(p) + S_1 f(pCa_n) \quad (2)$$

where S_{app} is the apparent protein solubility at a given Ca^{2+} concentration, $f(i)$ are the protein fractional components of species i , S_0 the initial concentration of soluble caseinate and S_1 is the apparent solubility of pCa_n .

According to Alvarez *et al.* (2007), the following equation was developed, which is used to fit the experimental data of solubility as a function of concentration of Ca^{2+} :

$$S_{\text{app}} = \frac{S_0}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]^n} + \frac{S_1 K_1^n [Ca^{2+}]^n}{1 + K_1^n [Ca^{2+}]^n} + \frac{(S_1' - S_1)(K_1')^m [Ca^{2+}]^m}{1 + K_1' [Ca^{2+}]^m} \quad (3)$$

where S_1' is the apparent solubility of pCa_nCa_m and K_1' corresponds to the second salting-out process. The parameters involved were calculated as follows: in a first step, the Ca^{2+} induced solubility profiles were analyzed by fixing the value of n and calculating the values of K_1 and S_1 , which gave the best least-squares to fit equation (3) in the first moiety of the curve; n was then fixed to a new value and the whole process was repeated. The values of n , which gave the minimum root mean square and the lowest K_1 error, and the correspondent S_1 and K_1 values were introduced in equation (3), and the same approach was applied for m , S_1' and K_1' calculation.

3.4.4.4 Urea-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Urea-SDS-PAGE)

The CCA supernatants obtained from the colloidal stability test were analyzed by Urea-SDS-PAGE using a vertical gel system, according to the method of Laemmli (1970). The protein bands were identified using commercial α_S -, β - and κ -CN (Sigma Chemical Co.).

The relative intensity of the bands was determined by scanning the stained gels and analyzing the pixel densities of the digitized protein bands, using specially designed software for this purpose (X-GEL).

3.4.4.5 Composition of the precipitates

The precipitates of insoluble casein aggregates obtained from the colloid stability test were separated at 25°C by centrifugation at 1500 g for 30 min. The amount of the different components in the solid phase was obtained from the difference between the total concentrations and the average concentrations in the supernatants. These last concentrations were calculated from the solubility values of the correspondent precipitation curves, obtained by fitting these ones using the equation (3), in order to interpret the experimental curves obtained, and the relative concentration of each of the components determined by PAGE.

3.4.4.6 Size variations of the CCA

The changes in the CCA size were followed by the wavelength (λ) dependence of turbidity (τ) of the suspensions, measured as $\beta = 4.2 + d(\log\tau) / d(\log\lambda)$. β is a parameter which has a direct relationship to the average size of the particles, and can be used to detect and easily follow rapid size changes and was obtained from the slope of $\log \tau$ vs. $\log \lambda$ plots, in the 450 to 650 nm range, where the absorption due to the protein chromophors is negligible (Horne, 1987; Risso *et al.*, 2007).

On the other hand, it has been shown that β , for a system of aggregating particles of the characteristics of caseinates, tends, upon aggregation, towards an asymptotic value that can be considered as a fractal dimension (D_f) of the aggregates.

τ was measured as absorbance using a Spekol 1200 spectrophotometer with a diode arrangement. Determinations of β were the average of at least duplicate measures.

3.4.4.7 Casein determination

Casein concentration was determined in the initial caseinate solution and in the supernatants of the colloidal stability test. Casein was measured according to the Kuaye's method (Kuaye, 1994). All the values used were the average of at least two determinations.

3.4.4.8 Effect of calcium in acid aggregation of casein

Ovine sodium caseinate was prepared from whole ovine casein previously obtained by using the same method described in the section 2.2 (Gatti *et al.*, 1999). Calcium chloride was added to the ovine sodium caseinate solution in order to obtain a final Ca^{+2} concentration ranging from 0 to 2.5 mM. After the addition of calcium chloride, the system was maintained under continuous stirring for about 1-2 hours.

Acid aggregation of ovine caseinate

A previously prepared solution of caseinate (5 g L^{-1}) was used. Kinetics of calcium caseinate acid aggregation by using GDL was analyzed by measuring of turbidity (τ) in the range 450-650 nm, in a Spekol 1200 spectrophotometer (Carl Zeiss Jena) with a thermostated cell.

The amount of GDL added was calculated using the following relation:

$$R = \frac{\% \text{ w / w GDL}}{\% \text{ w / w protein}} \quad (4)$$

R used for this experiment was 0.5, at temperature of 35°C.

Acidification was initiated by the addition of solid GDL to 10 g of calcium caseinate suspension. Absorption spectra (450-650 nm) and absorbance at 650 nm (A_{650}) was measured as a function of time until a maximum and constant value of A_{650} was reached; simultaneously pH decrease was measured. Values of parameter β were calculated using the equation mentioned in the item 2.2.4.

3.4.4.9 Analysis of conformational changes of Ca-Cas

Excitation and emission spectra of the calcium caseinate (5 g L^{-1}) were carried out with the purpose of detecting any spectral shift and/or changes in the intensity of fluorescence (FI). Previously, the λ_{ex} and the range of concentration with a non significant internal filter effect were determined. The samples (3ml) used for the spectral analysis and FI measures were transferred into a fluorescence cuvette with a light path length of 1 cm and placed into a cuvette holder keeping the temperature at desired fixed values. Values of FI were registered within the range of 300-400 nm at 35°C using a λ_{ex} of 286 nm.

3.4.4.10 Surface hydrophobicity (S_0)

S_0 was estimated according to Kato and Nakai method (Kato and Nakai, 1980; Haskard and Li-Chan, 1998) using the ammonium salt of amphiphilic 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) as a fluorescent marker, in a spectrofluorometer (Aminco Bowman Series 2). The measurements were carried out using wavelengths of excitation (λ_{exc}) and emission (λ_{em}) fixed at 396 and 474 nm, respectively, at a constant temperature of 35°C . Both wavelengths were previously determined by performing the measurements of emission and excitation spectra.

Fluorescence intensity (FI) was determined in a sample of calcium caseinate (5 g L^{-1}) prepared according to the method described in section 2.3. FI of the sample containing ANS and different concentrations of calcium caseinate (FI_b) as well as the intrinsic FI of the calcium caseinate (FI_p) were measured. The difference between FI_b and FI_p (ΔF) was calculated and S_0 was determined as the initial slope in the ΔF vs. Ca-Cas concentration (% w/v) curve.

3.4.4.11 Size distribution of Ca-Cas particles

Average size of Ca-Cas particles and size distribution measurements were carried out in a Mastersizer 2000 HYDRO 2000 MU model (Malvern

Instruments). This instrument is based on Low Angle Laser Light Scattering (LALLS) which determines that diffraction angle is inversely proportional to size particle.

Experimental data were obtained as a function of diameters size vs. volume distributions and De Brouckere mean diameter ($D_{4,3}$) was also calculated by software processing.

To carry out this determination an amount of solid GDL was added to a 550 mL of 2 g L^{-1} Ca-Cas solution in order to obtain a relation GDL/protein of 0.5. This mixture was maintained at a constant and slow stirring of 600 rpm. Measurements at different times were performed until the maximum of obscuration (turbidity) allowed by the instrument was reached. Simultaneously pH monitoring was followed.

3.4.4.12 Rheological properties of acid gels of Ca-Cas

Rheological properties of Ca-Cas samples (30 g L^{-1}) were determined in a stress and strain controlled rheometer TA instruments, AR G2 model (Brookfield Engineering Laboratories) using a cone geometry (diameter: 40 mm, cone angle: 2° , cone truncation: 55 mm) and a system of temperature control with a bath recirculator (Julabo model ACW 100) connected to a Peltier plate. An amount of solid GDL according to a proportion GDL/protein of 0.5 was added to initiate the acid gelification.

Measurements were performed each 20 sec during 100 min with a constant oscillation stress of 0.1 Pa and a frequency of 0.1 Hz. The Lissajous figures at various times were plotted to ensure that the measurements of storage or elastic modulus (G') and loss or viscous modulus (G'') were always obtained within the linear viscoelastic region.

The $G'-G''$ crossover times (t_g) of acidified caseinate systems were considered here as the gel times, since most studies of milk/caseinate gelation have adopted this criterion (Curcio *et al.*, 2001; Braga *et al.*, 2006). pH at t_g was also determined considering the pH value at the $G'-G''$ crossover (pH_g).

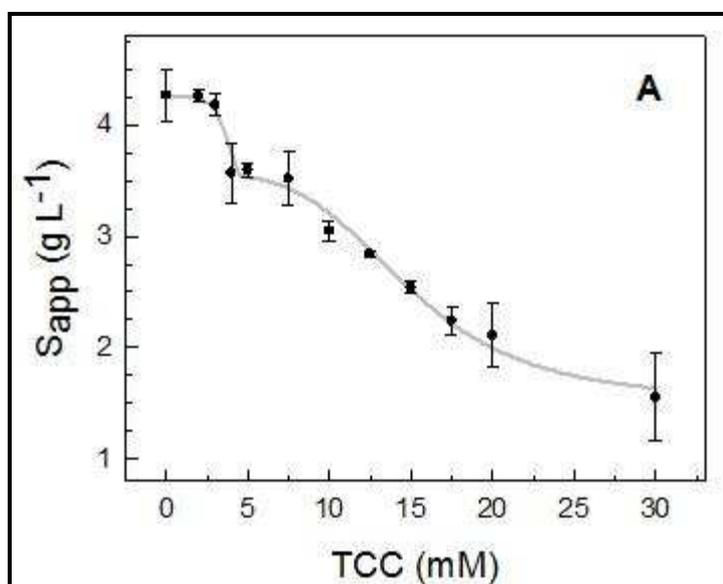
3.4.4.13 Statistical Analysis

Several determinations were performed at least in duplicate. The data were reported as the average value \pm their standard deviation. The statistical analysis was performed with Sigma Plot 10.0 software. The relationship between variables was statistical analyzed by correlation analysis using Pearson correlation coefficient (r). The statistical significant was considered for $p < 0.05$ values.

3.4.5 Results and discussion

3.4.5.1 Colloidal stability test

The protein concentration remaining in the supernatant, when ovine sodium caseinate was precipitated by increasing total calcium concentration (TCC) and centrifuged at 1500 g, is shown in Fig. 1A.



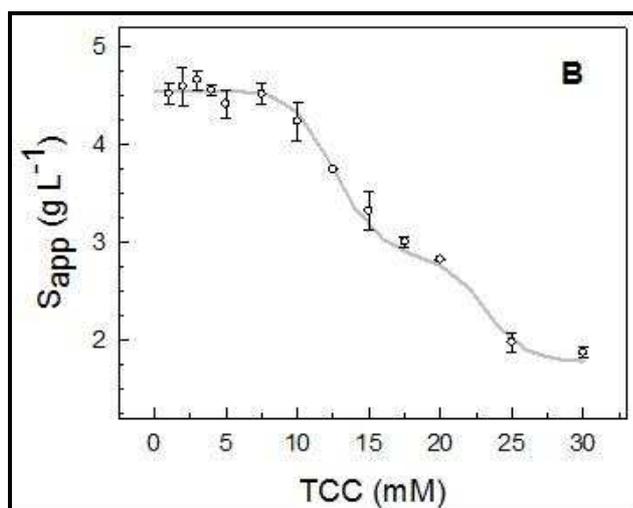


Figure 1 (6). Remnant caseinate concentration (S_{app}) in the supernatants of mixtures of 5 g L⁻¹ ovine (A) or bovine (B) sodium caseinate with Ca²⁺ in a range of 0 to 30 mM, as a function of the total calcium concentration (TCC), pH 6.8, temperature 25°C.

Precipitation started at low TCC (~3 mM) and progressed until an important protein fraction was precipitated (50% of total protein at 20 mM of TCC) (Fig. 1A and 2A). Comparing these results with those obtained to bovine caseinate (Fig. 1B), we can observe that the caseinate precipitation starts approximately at twofold TCC values. Besides this, only 35% of bovine caseinate was precipitated at 20 mM of TCC (Fig. 2A). The shape of the curves obtained for both caseinates presented certain similarities; they showed the presence of a two steps salting-out process well defined.

The curves obtained after processing the solubility data were fitted using equation (3) and the affinity constants (K_1 , K_1') and binding site numbers (n , n') were calculated with a model based on the concept of Wyman's linked functions by using the Gauss-Newton algorithm (Table 1).

Table 1 (11). Calcium binding parameters for sodium caseinates.

	K_1 (M ⁻¹)	n	K_1' (M ⁻¹)	n'
Ovine Caseinate	306 ± 6	23	67 ± 2	4
Bovine Caseinate	78 ± 1	8	43 ± 1	18

Sodium caseinate concentration 5 g L⁻¹, pH 6.8, temperature 25°C.

It was possible to observe that in the first stage these parameters (affinity constants, number of binding sites) exhibited higher values for ovine caseinate. Two kinds of Ca^{2+} binding sites were observed in the precipitation plots (Fig. 1), presenting apparent average binding constants differing in one order of magnitude, the stronger ones (K_1) corresponding to the initial step of the precipitation process. Since the affinity of Ca^{2+} to phosphoserine residues is higher than to the other binding sites (Farrell *et al.*, 1988; Alvarez *et al.*, 2007), we assume that this first step of Ca^{2+} binding involves mainly casein phosphoserine residues. However, we cannot exclude the participation of other anionic residues, such as carboxylate groups, in this stage. Lower values were obtained for the average association constant for the second step of salting-out (Table 1), suggesting the participation of weaker affinity sites in this process. K_1 and K_1' values were higher to ovine caseinate than bovine ones.

On the other hand, in the first step, when the TCC is equal to the inverse of K_1 , the apparent solubility (S_{app}) is determined by the equation 5:

$$S_{\text{app}} = \frac{S_0 + S_1}{2} \quad (5)$$

The value obtained for ovine caseinate (3.2 mM) was much lower than that achieved for bovine caseinate (12.8 mM).

The values of the S_{app} fractional change, τ and β for the CCA suspensions in the supernatants were plotted (Fig. 2 A, B and C respectively). For a given TCC, the S_{app} of ovine caseinate is always lower than the ones for bovine caseinate (Fig. 2A). The average size of particles remaining in suspension, as estimated by β values, decreased during the precipitation at increasing TCC (Fig. 2C). On the contrary, bovine CCA β values diminish at low TCC, rising again when both the precipitation and the amount of colloidal particles in suspension were maximal. Nevertheless, it can be observed that average sizes of the ovine CCA were always highest, especially at low TCC values.

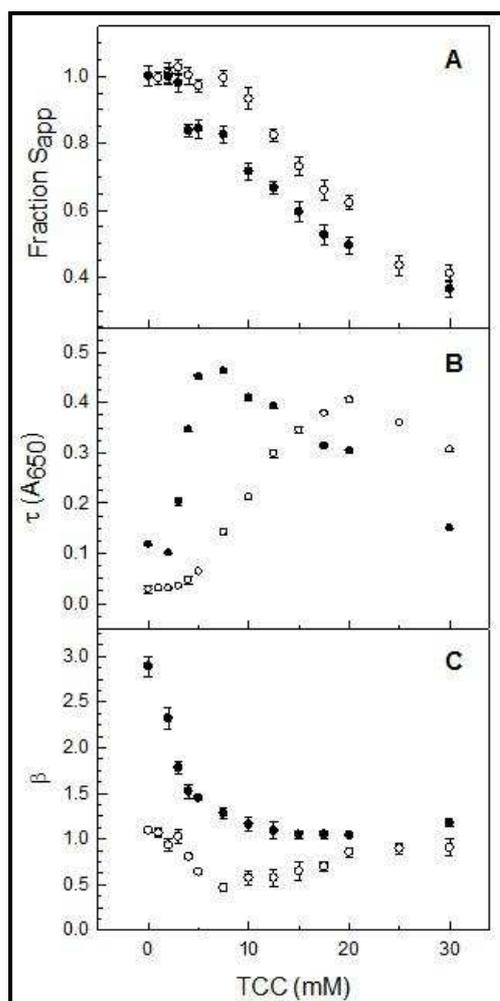


Figure 2 (7). S_{app} fractional change (A), turbidity (τ) as absorbance at 650 nm (B) and parameter β (C), in the supernatants of mixtures of ovine (\bullet) and bovine (\circ) sodium caseinate (5 g L^{-1}) with Ca^{2+} in a range of 0 to 30 mM, as a function of the total calcium concentration (TCC), pH 6.8, temperature 25°C .

β (Fig. 2B) increased to reach a maximum at 20 mM TCC in the case of bovine caseinate and at 7.5 mM TCC in the case of ovine caseinate, then decreasing faster. For ovine caseinate, β values decreased sharply until ~ 5 mM of TCC and then continued decreasing slower (Fig. 2C). These results would indicate the disappearance of the biggest CCA at high TCC. For bovine caseinate, β values showed an initial formation of a low amount of relatively small particles, followed by a second step with further formation of progressively bigger particles.

A qualitative and quantitative analysis of SDS-PAGE showed, for all TCC, a higher amount of α - and β -CN in the CCA, compared to the amount of

κ -CN, in the case of ovine caseinate (Fig. 3). On the other hand, the ovine κ -CN fraction is always lower than bovine ones, thus justifying the higher average size of ovine CCA for all TCC. These results are coherent with studies on the protein composition of bovine casein micelles fractionated by different methods. They showed that the κ -CN content increased when the size of the casein micelles decreased (Dalgleish *et al.*, 1989; Risso *et al.*, 2007).

According to the results reported in Fig. 3, at a given temperature and pH, ovine calcium CCA seems to be less stable than the bovine counterparts. The differences observed might be related to the composition and different proportion of caseins in cow (Alvarez *et al.*, 2007) and sheep milk. Sheep milk presents a higher amount of α - and β -casein that in turn have a higher amount of phosphoserine residues capable of Ca^{2+} binding (Park *et al.*, 2007), which increases the chances of precipitating of ovine casein.

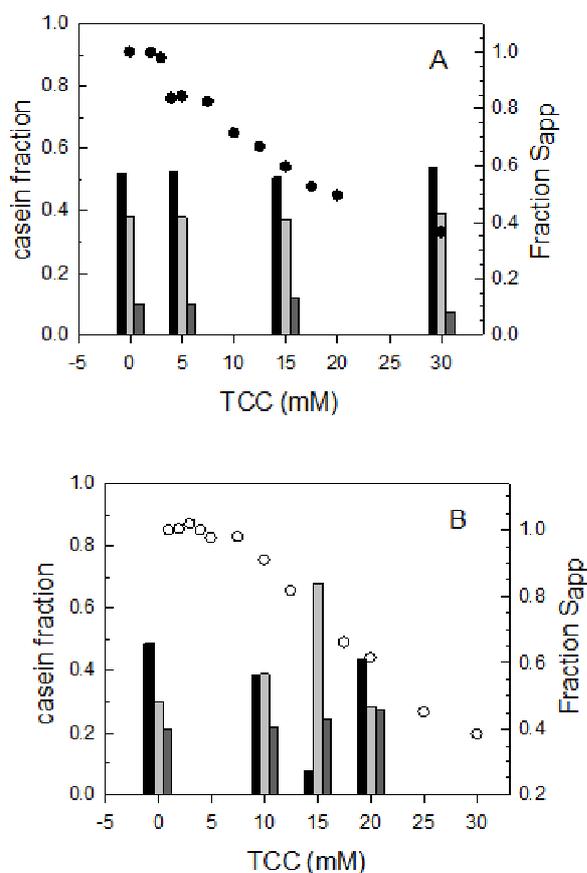


Figure 3 (8). Protein composition (bars) and protein solubility (●) of CCA versus TCC for ovine (A) and bovine (B) caseinate at 5 g L^{-1} . (■) α -CN, (■) β -CN and (■) κ -CN.

3.4.5.2 Analysis of conformational changes and surface hydrophobicity

The intrinsic fluorescence of sodium caseinate and mixtures at different proportions Ca:Cas are presented in the Fig. 4. A fluorescence blue shift as well as an increase in the fluorescence intensity can be seen as the relation Ca:Cas becomes higher. It can be assumed that this is a consequence of a change to a more hydrophobic environment around the fluorophores groups in caseins.

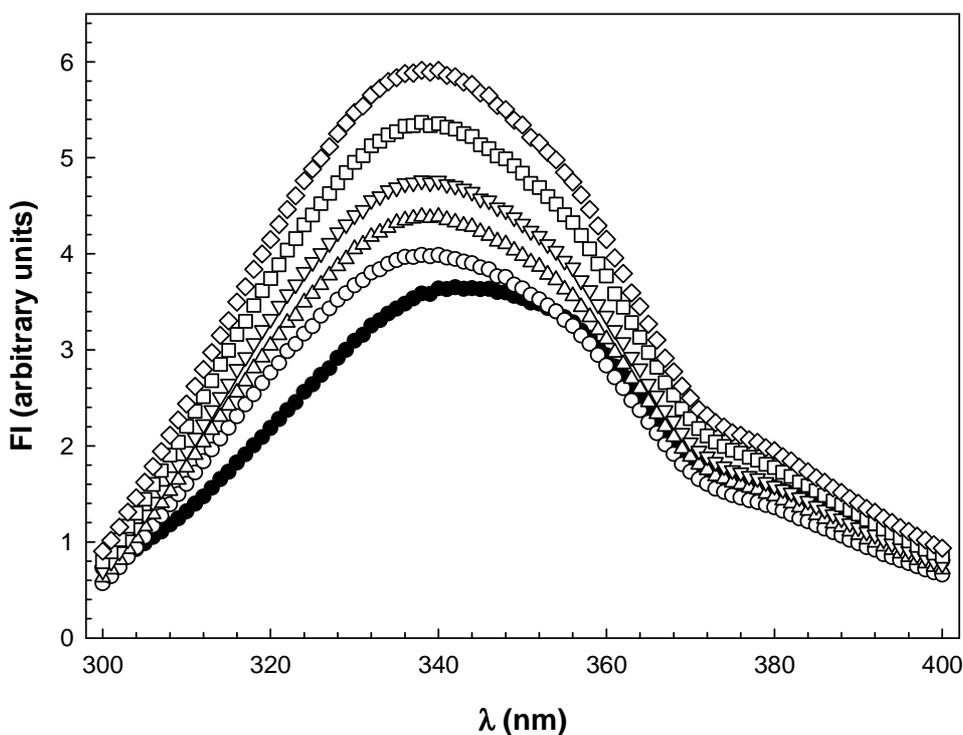


Figure 4 (9). Fluorescence intensity (FI) vs. wavelength in mixtures of 5 g L^{-1} sodium caseinate: (●) without Ca; (○) 0.5 mM Ca; (△) 1.0 mM Ca; (▽) 1.5 mM Ca; (□) 2.0 mM Ca; (◇) 2.5 mM Ca. Temperature was fixed at 35°C .

Surface hydrophobicity of the CCA was determined for diverse Ca^{2+} additions and it is listed in Table 2. S_0 was higher in absence of Ca, varying with the calcium concentration, but with trend to diminish when Ca^{2+} increases.

These results would indicate the formation of CCA with more compact structure when no calcium is present, according to reported in section 3.1.

Table 2 (12). Surface hydrophobicity (S_0) in mixtures of 5 g L⁻¹ sodium caseinate containing different calcium concentrations, at 35°C.

Calcium Concentration (mM)	S_0 (% w/v ⁻¹)
0	154 ± 12
0.5	86 ± 3
1.0	74 ± 2
1.5	106 ± 2
2.0	85 ± 1
2.5	60 ± 3

3.4.5.3 Acid aggregation and gelation of ovine caseinate: effect of calcium

The acid aggregation was evaluated by following how the parameter β is modified as the pH varies after adding GDL, in absence and in presence of Ca²⁺ concentrations where no caseinate precipitation is observed (< 3 mM). The variation of the parameter β as a function of pH and time is presented in Fig. 5A.

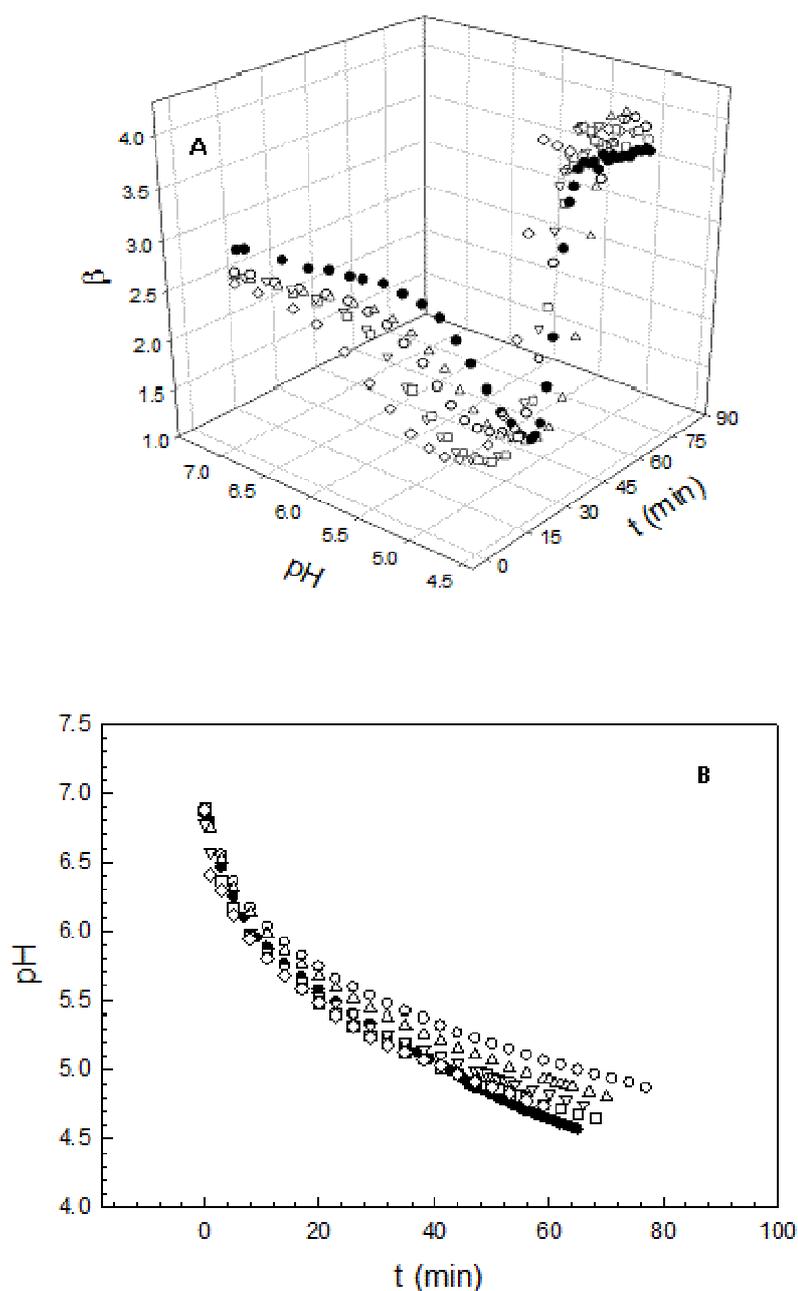


Figure 5 (10). Parameter β variations as a function of the time (t) and the pH, after the addition of GDL (A) and variations of pH as a function of time (B) during the acid aggregation (R 0.5, 35°C) of sodium caseinate solutions (5 g L^{-1}) in absence (\bullet) and in presence of different calcium concentrations: (\circ) 0.5 mM Ca; (Δ) 1 mM Ca; (∇) 1.5 mM Ca; (\square) 2 mM Ca; (\diamond) 2.5 mM Ca.

Results showed, in all of cases, the existence of two well defined steps. At the beginning, a slow phase with a decrease of β values is observed. The second step presents a sharp increase of average size of particles due to

formation of colloidal aggregates (t_{ag}) that grow until a time in which β reaches D_f value.

In presence of calcium, it can be observed TCC-dependent changes on t_{ag} . The t_{ag} increased in the presence of up to 1 mM calcium concentration, and decreased at higher TCC. This may be partly linked to the reduction of the rate at which pH becomes lower in the presence of calcium (Fig. 5B), but could also be related to the decrease of the aggregation rate of caseinate particles in the presence of the cation. We have found that calcium does not alter the hydrolysis rate of GDL (data not shown), therefore we assume that the presence of this cation alters the initial state of the colloidal particles leading to changes in the aggregation process.

Moreover, the presence of calcium increases the pH_{ag} . Because the colloidal particles of caseinate in suspension have negative net charge, an addition of calcium would decrease its electrostatic stability favouring aggregation of them by reduction of net charge of particles and by increasing of ionic strength of the medium. In addition, as described in item 3.1, the average size of initial colloidal particles decreases as TCC becomes higher. Since the rate of aggregation is limited by the diffusion of particles, hence larger particles diffused more slowly, thus increasing t_{ag} .

It was observed that in presence of calcium the aggregates formed showed a higher compactation degree (higher D_f). In order to verify the direct relationship between the parameter β and the average size of particles, we have performed measures of the $D_{3,4}$ and the distribution of sizes of the same ones using an Mastersizer 2000 HYDRO 2000 equipment.

Fig. 6 depicts the variation of the turbidity (τ) as a function of time, evaluated by visible spectrophotometry and LALLS. It is possible to observe the same behaviour of acid aggregation of caseinate, independently of the method applied to carry out the measures and considering that different concentrations and temperatures were used. Therefore the use of parameter β can be an accessible and easy technique to follow an aggregation process.

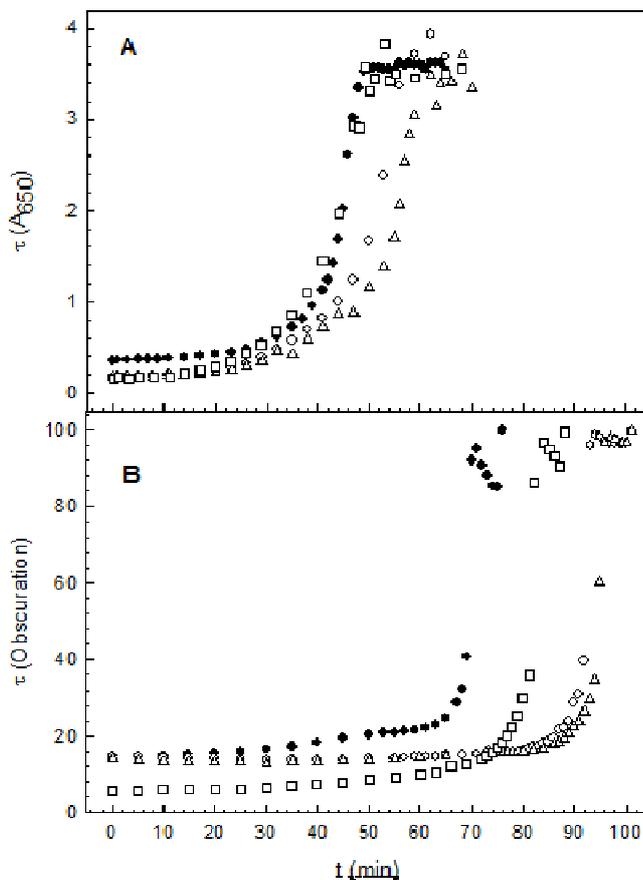


Figure 6 (11). Variations of turbidity (τ) as a function of time, after the addition of GDL, using different methods. (A) Spectrophotometry (A_{650}), in mixtures of 5 g L^{-1} sodium caseinate, R 0.5, 35°C ; (B) LALLS (Obscuration), in mixtures of 2 g L^{-1} sodium caseinate, R 0.5, 25°C ; TCC: (●) 0.0 mM, (○) 0.5 mM Ca, (Δ) 1 mM Ca, (\square) 2 mM Ca.

As shown in Fig. 7, the curves for the size distribution showed to be also dependent on the Ca^{2+} concentrations. Before the addition of GDL, the estimation of size distribution of caseinate particles confirmed the predominance of increasingly small particles as a result of the TCC raise (Fig. 7A). After adding GDL and while turbidity increases slightly and very slowly, a decrease of particles average size (Fig. 8) and a shift towards minor values of size distributions were observed (Fig. 7B and 7C). From the moment when a sharp increase of turbidity begins (denoted as t_{ag}), a consistent increase of $D_{4,3}$ was also observed. This t_{ag} was minor in absence of calcium (Fig. 7D and 8).

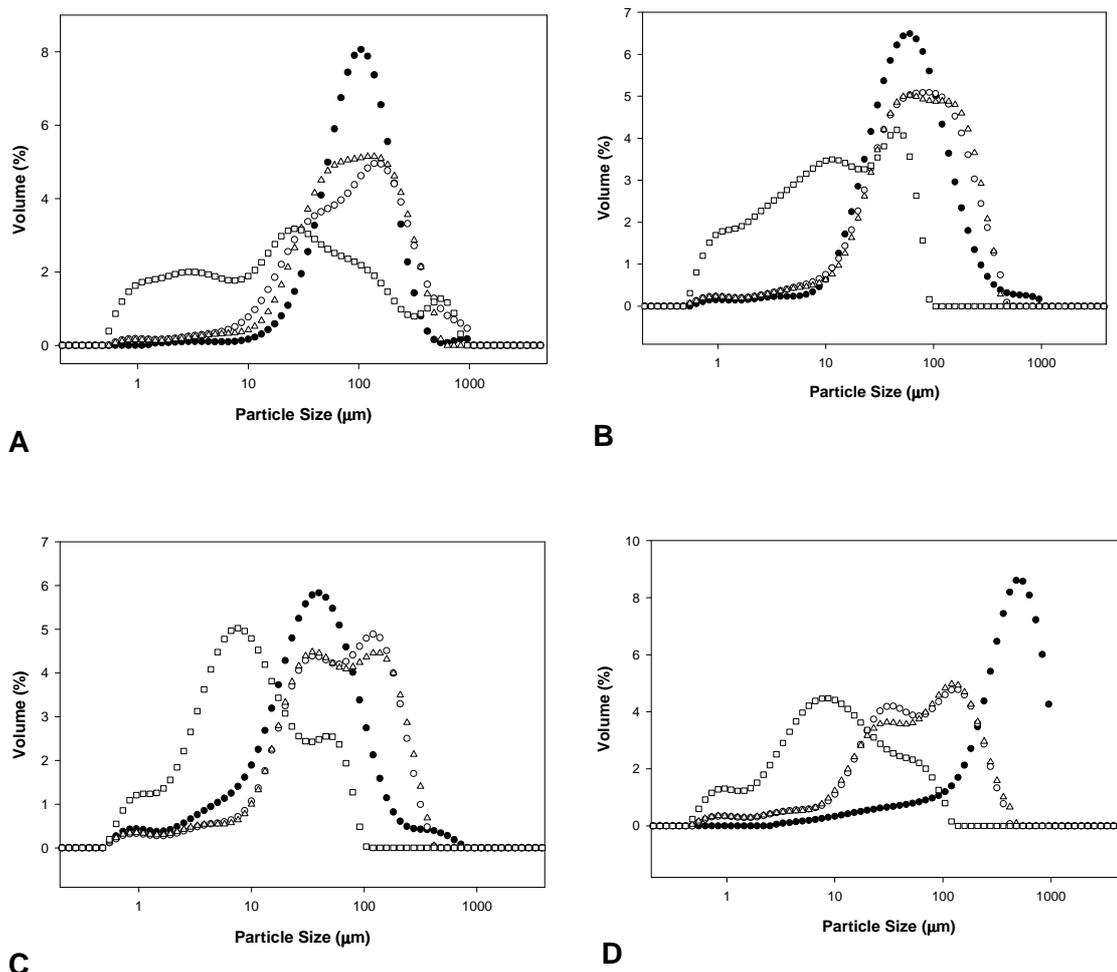


Figure 7 (12). Laser diffraction derived size frequency distribution (presented as volume percentage) of particles during the acidified aggregation (R 0.5, 25°C) of sodium caseinate solutions (2 g L⁻¹) in absence (●) and in presence of different calcium concentrations: (○) 0.5 mM, (Δ) 1 mM, (□) 2 mM; at distinct times after GDL addition: (A) 0 min; (B) 20 min; (C) 60 min; (D) 74 min.

As it is defined $D_{4,3}$ only indicates the mean diameter in volume of particles in a system, where concentration of calcium, pH and time were modified. Fig. 8 shows that among samples with calcium, it can be evaluated that, at a Ca^{2+} concentration of 2 mM, the aggregation process is even faster than with the other concentrations. The parameter t_{ag} became higher in presence of Ca up to 1 mM and decreased at higher concentrations but always being higher than the values in absence of Ca.

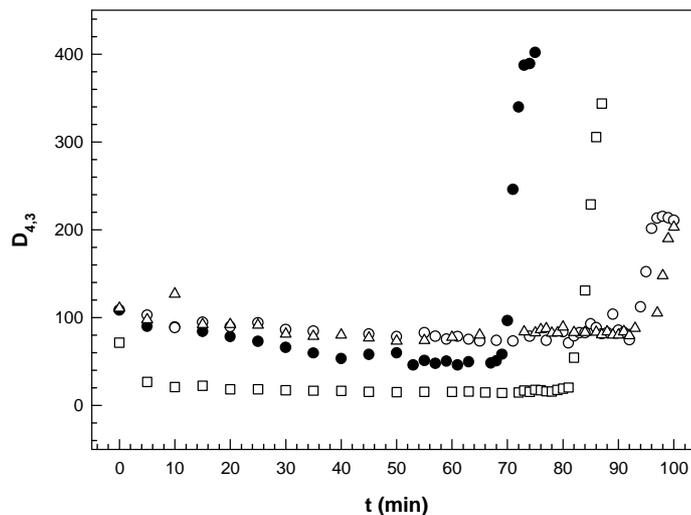


Figure 8 (13). Parameter $D_{4,3}$ as a function of time after the addition of GDL (R 0.5, 25°C) in mixtures of 2 g L⁻¹ sodium caseinate (●), 0.5 mM Ca (○), 1mM Ca (Δ), 2 mM Ca (□).

Fig. 9 shows, as an example, curves obtained for variations of G' and G'' during the time of acidification. There is a slow stage where both modulus have very low values following by a sharply increment of G' before $G'-G''$ crossing. Results of rheological properties during gelation of caseinate samples (30 g L⁻¹) revealed that the t_g , pH_g and G'_{max} varied depending on the system (Table 3).

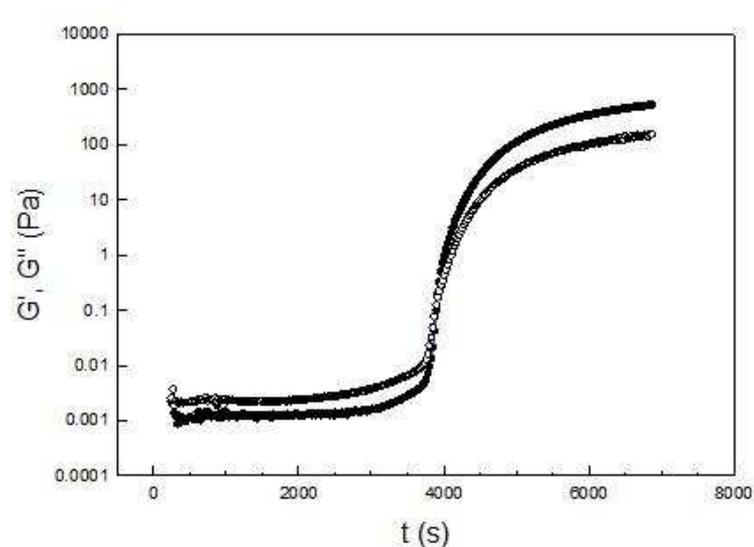


Figure 9 (14). Variations of elastic modulus G' (●) and viscous modulus G'' (○) during acidification process after addition of GDL (R: 0.5). Caseinate concentration 30 g L⁻¹, TCC: 0.5 mM, temperature: 35°C.

In presence of calcium, an increase in its concentration was related to an increase of pH_g and a decrease of t_g (Table 3), probably due to the net charge loss of the particles, which makes them less stable and more prone to flocculate. These gels reached higher values of G'_{max} than gels formed in absence of Ca^{2+} at the same protein concentration and amount of GDL. Therefore calcium would favour the intermolecular forces during the formation of the gel mesh.

Table 3 (13). The $G'-G''$ crossover times (min) and pH_g for formulations containing sodium caseinate (30 g L^{-1}) with different calcium concentrations, after adding GDL (R 0.5) at a temperature of 35°C .

Ca^{2+} Concentration (mM)	t_g (min) \pm 0.1	$pH_g \pm 0.01$	G'_{max} (Pa) ± 1
0	31.5	4.99	167
0.5	65.4	4.56	518
1.0	32.0	4.99	277
2.0	26.8	5.14	228

The decrease in gelation time among different samples containing calcium was 51.6-59%, indicating that the gel time was also governed by the higher intensity of association/dissociation of casein particles, which depends on the change in the ionic and solubility characteristics of the casein molecules (Braga *et al.*, 2006).

3.4.6 Conclusions

Two steps salting-out process well defined with apparent average binding constants differing in one order of magnitude were observed when calcium was added to sodium caseinate suspensions. Precipitation started at low calcium concentrations ($\sim 3 \text{ mM}$) and progressed with an important protein fraction precipitated at higher calcium concentrations while the average size of particles remaining in suspension decreased.

At constant temperatures and pH, ovine casein colloidal aggregates formed in presence of cation calcium are less stable and bigger than bovine ones. These differences would be related with casein composition of colloidal aggregates; ovine particles have higher proportion of α and β -CN, lower fraction of κ -CN and higher amount of phosphoserin groups which can bind Ca^{2+} . Besides, the environment around the protein fluorophores in caseins becomes more hydrophobic and protein structures are more compact decreasing the exposition of hydrophobic sites at increasing cation concentration.

During aggregation or gelation processes, before GDL addition, profiles obtained from turbidity and LALLS experiments for low caseinate concentrations and from rheological measures for high caseinate concentrations present similar characteristics. They reveal two stages: the first one characterized by a diminution of particles average size, limited turbidity of suspensions and predominant viscous modulus. The second one distinguished by a sudden increase of particles average size and turbidity of suspensions, and a sharp increment of elastic modulus.

Calcium decreases the electrostatic stability of colloidal particles by diminution of its net charge and would favour the intermolecular forces during the formation of the gel mesh but it take in account that the decrease of surface hydrophobicity diminishes the participation of hydrophobic interactions in the rearrangements during gel formation. The degree of compaction and the hardness of gels depend on the balance of these two effects which depends on the Ca^{2+} concentration.

The compaction and average size of the aggregates formed at the end of the acidification process depends also on the distribution of the initial sizes and on the kinetic of the aggregation phenomena. As the aggregation process becomes slower the more easily a polypeptide chain could acquire different orientations leading to the formation of a more compact aggregates and gels with more elasticity and hardness.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Universidad Nacional de Rosario (Argentina) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), of Ministry of Education (Brazil). A.B. is research awardees of CNPq, Brazil. Thanks to Prof. Dr. Jorge Wagner, Dr. Gonzalo Palazolo and MSc. Luis Martínez of Universidad Nacional de Quilmes for their advice in the LALLS and rheological measurements.

3.4.7 References

- Alvarez, E.M.; Risso, P.H.; Gatti, C.A.; Armesto, M.S.; Burgos, M.; Relling, V.M.N. (2006). Effects of citrate on the composition and enzymic coagulation of colloidal bovine casein aggregates. *Colloid and Polymer Science*, 284(9): 1016-1023.
- Alvarez, E.M.; Risso, P.H.; Gatti, C.A.; Burgos, M.; Suarez Sala, V. (2007). Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. *Colloid and Polymer Science*, 285(5): 507-514.
- Bingham, E.W.; Farrell, H.M.Jr.; Carroll, R.J. (1972). Properties of dephosphorylated α 1-casein. Precipitation by calcium ions and micelle formation. *Biochemistry*, 11(13): 2450-2454.
- Braga, A.L.M.; Menossi, M.; Cunha, R.L. (2006). The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, 16: 389-398.
- Curcio, S.; Gabriele, D.; Giordano, V.; Calabro, V.; Cindio, B.; Iorio, G. (2001). A rheological approach to the study of concentrated milk clotting. *Rheologica Acta*, 40: 154-161.
- Dalgleish D. G.; Horne, D. S.; Law, A. J. R. (1989). Size-related differences in bovine casein micelles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 991:383-387.
- Farrell, H.M.Jr.; Kumosinski, T.F.; Pulaski, P.; Thompson, M.P. (1988). Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 265(1): 146-58.
- Gatti, C.A.; Alvarez, E.M.; Suarez Sala, V. (1999). Effect of the Anion Citrate on the Mineral Composition of Artificial Casein Micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1): 141-144.
- Gaucheron, F.; Le Graet, Y.; Boyaval, E.; Piot, M. (1997). Binding of cations to casein molecules. Importance of physicochemical conditions. *Milchwissenschaft*, 52(6): 322-327.

- Haskard, C.A.; Li-Chan, E.C.Y. (1998). Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS) fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2671-2677.
- Holt, C. (1997). In: Fox, P.F. (Ed.). *Advanced dairy chemistry*. London, UK, Chapman & Hall. vol. 3, 233–253.
- Holt, C. (2004). An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. *European Biophysics Journal*, 33(5): 421-434.
- Horne, D.S. (1979). The kinetics of the precipitation of chemically modified as1-casein by calcium. *Journal of Dairy Research*, 46(2): 265-293.
- Horne, D.S. (1987). Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 83, 259-270.
- Horne, D.S. (2002). Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5,6): 456-461.
- Kato, A.; Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624: 13-20.
- Knoop, A.M.; Knoop, E.; Wiechen, A. (1990). Sub-structure of synthetic casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 46: 347-350.
- Koppel, D.E. (1972). Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy. Method of cumulants. *Journal of Chemical Physics*, 57(11): 4814-4820.
- Kuaye, A.Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry*, 49(2): 207-211.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Linde, A. (1982). In: Anghileri, L.J.; Tuffet-Anghileri, A.M. (Eds). *The Role of Calcium in Biological Systems*. Boca Raton, CRC Press. vol. 3.
- Moatsou, G., Samolada, M., Katsabeki, A., Anifantakis, E. (2004). Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait*, 84: 285-296.
- Mora-Gutierrez, A.; Farrell, H.M., Jr.; Basch, J.J.; Kumosinski, T.F. (1993b). Modeling calcium-induced solubility in caprine milk caseins using a thermodynamic linkage approach. *Journal of Dairy Science*, 76(12): 3698-3710.
- Mora-Gutierrez, A.; Farrell, H.M.Jr.; Kumosinski, T.F. (1993a). Comparison of calcium-induced associations of bovine and caprine caseins and the relationship of as1-casein content to colloidal stabilization: a thermodynamic linkage analysis. *Journal of Dairy Science*, 76(12): 3690-3697.
- Park, Y.W. (2007). Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2): 73-87.

- Park, Y.W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G.F.W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2): p.88-113.
- Ramos, M.; Juárez, M. (2003). *Sheep milk*. In: Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. vol. 4, pp. 2539–2545.
- Raynal-Ljutovac, K.; Lagriffoul, G.; Paccar, P.; Guillet, I.; Chilliari, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79(1): 57-72.
- Risso, P.H.; Relling, V.M.; Armesto, M.S.; Pires, M.S.; Gatti, C.A. (2007). Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid and Polymer Science*, 285(7): 1435-1536.
- Ruis, H.G.M.; Venema, P.; Linden, E. (2007). Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. *Food Hydrocolloids*, 21: 545-554.
- Schmidt, D.G. (1979). Properties of artificial casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 46(2): 351-355.
- Shalichev, J., Tanev, G. (1972). Isolation, Purification, and Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alpha-s-Casein. *Journal of Dairy Science*, 6(2): 171-176.
- Suárez, V.H.; Buseti, M.R. (2006). Lechería Ovina en la Argentina. *Boletín de Divulgación Técnica INTA*, 90: 195-204.
- Van Dijk, H.J.M. (1990). The properties of casein micelles. 1. The nature of the micellar calcium phosphate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 44: 65-81.
- Van Dijk, H.J.M. (1990). The properties of casein micelles. 2. Formation and degradation of the micellar calcium phosphate. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 44:111–124.
- Van Dijk, H.J.M. (1992). The properties of casein micelles. 6. Behaviour above pH 9 and implications for the micelle model. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 46:101–113.
- Walstra, P.; Jenness, R. (Eds.). (1984). *Dairy Chemistry and Physics*. New York, USA, Wiley. pp 93-97.
- Waugh, D.F.; Slattery, C.W.; Creamer, L.K. (1971). Binding of cations to caseins. Site binding, Donnan binding, and system characteristics. *Biochemistry*, 10(5): 817-823.
- White, J.C.D.; Davies, D.T. (1963). The determination of citric acid in milk and milk serum. *Journal of Dairy Research*, 30: 171-189.
- Wyman, J. (1964). Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Advances in Protein Chemistry*, 19: 223-86.

3.5 ARTIGO 5

3.5.1 Acid Aggregation and Gelation of Ovine Caseinate. Effect of Sucrose and Lactose

3.5.2 Abstract

The purpose of this work was to evaluate the acid aggregation and gelation of ovine sodium caseinate solutions induced by glucono- δ -lactone (GDL). We investigated the effects of temperature, protein concentration, GDL amount, and presence of sugars on these processes, using spectroscopic techniques and following the rheological properties of systems. The time required to start particles aggregation decrease with the increment of temperature, amount of added GDL and ovine caseinate concentration. The addition of sugars leads to the formation of colloidal particles with more compact structures and lower surface hydrophobicity, seem increment the electrostatic stability of colloidal particles. The kinetic and compaction degree of aggregates formed at the end of acidification process were different of those of bovine ones. An increment of ovine caseinate concentration or a drop of temperature produce gels with higher storage modulus. GDL/caseinate ratio and sugars concentrations assayed did not produce appreciable changes in rheological parameters measured.

Keywords: Ovine caseinate; aggregation; gelation; glucono-delta-lactone; sucrose; lactose

3.5.2 Introduction

The composition of ovine milk, which is rich in proteins and fat, results in excellent cheesemaking properties. The sheep's milk has about twice the concentration of protein, fat and energy than that of cow (1). The unique nutritional composition of ewe's milk relative to cow's milk reflects especially in cheese yield, approximately two fold higher in ovine cheeses. This greater cheese yield is explained by the quantitatively higher content of fat (7.5%) and caseins (4.6%) of ewe's milk than cow's counterpart (3.9% of fat and 2.6% of

caseins) (2,3). Sheep milk is a more suitable source for cheese production compared to cow milk since ovine milk is characterized by a lower colloidal stability (4).

Dairy sheep industry has increased intensively during the last decade in South America. Sheep milk can be used for different purposes and has become a very important mean for the subsistence economy in geographic areas where is a major source of special high-quality products (5,6). Production of typical dairy products from ewes can provide a profitable alternative to cow milk products owing to their specific taste, texture and their natural and healthy properties. Besides this, cheeses manufactured from milk of ewes possess a much higher added value as gourmet products are in stake (2).

The main protein fraction in ovine milk are represented by caseins and caseinates (76-83% of total proteins) which are extensively used in food industries because of their physicochemical, nutritional and functional properties, which makes caseinates useful ingredients in complex food preparations (3). Caseins occur in milk as stable colloidal aggregates known as casein micelles, mainly composed by α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -casein (α_{S1} -, α_{S2} -, β - and κ -CN) (7). Regarding aminoacidic composition of ovine casein compared to bovine no difference is observed between the number of residues of α_{S1} -CN while α_{S2} and κ -CN possess a higher number of residues. In the other hand ovine β -CN contains a lesser number of residues than the bovine one (3).

These proteins are added to different products because of their high emulsifying, water-binding and gelation capacities, their resistance to heat treatments and their contribution to the food texture and juiciness (8). Cheese making, i.e. renneting properties, of sheep milk are affected by its physicochemical properties, including pH, larger casein micelle, more calcium per casein weight, and other mineral concentration in milk, which cause differences in coagulation time, coagulation rate, curd firmness, and amount of rennet needed (9,3). However, these physicochemical properties of ovine caseins have still need be matter of further research.

A wide range of food and pharmaceutical products contain both proteins and low-molecular-weight sugars. Therefore, it is safe to assume that interactions between these components are of fundamental importance to the protein functionality, and also to the general structure, stability, and rheology of the products (10,11).

Lactose (β -D-galactopyranosyl(1-4)-D-glucopyranose), the main sugar of milk and of most other dairy products, corresponds to 4.9% of sheep milk and 4.7% of cow milk, respectively (3). It is used in many industrial products, especially in food and drugs, and is the main component of milk powder.

Sucrose is a disaccharide of glucose and fructose with an α -1,2 glycosidic linkage, named β -D-fructofuranosyl-(2-1)- α -D-glucopyranoside. The interactions between sucrose and caseinate are of considerable industrial importance because both these ingredients are widely used in the formulation of such popular foods as ice-cream and yoghurt-style desserts (12).

Dissociation and aggregation of casein fractions due to caseinate acidification result in the formation of a gel structure. A possible explanation to this phenomena is that as pH is adjusted toward the isoelectric point causes a decrease of the repulsive interactions, resulting in a destabilization of the system as pH drops below approximately 5 at a given temperature (13, 14). The acidic coagulation of casein promotes a protein-protein interaction that is important in the manufacture of dairy products. Two different acidification processes could be distinguished being one by bacterial culture and the other by chemical reagents, such as glucono- δ -lactone (GDL) (15). The latter has the benefit of producing a slow reduction in pH and avoids some of the difficulties, such as variable activity and variation with type of culture used, associated with starter bacteria (13,16). In fact the final pH of the system is a function of the amount of GDL added whereas starter bacteria produce acid until they are inhibited by the low pH (13).

Rheology is a powerful tool for analysing the different steps involved in milk clotting and in gel formation, and for assessing the texture of the final product. Casein gels are responsible for most of the rheological/textural properties (i.e.

stretch, fracture) of ewe cheese and other dairy products. The most important factors controlling the rheological properties of acid-induced caseinate gels are the protein content, pH, ionic strength and presence of other components (13). Although rheological characteristics and functional properties of cow milk and its dairy products have been extensively studied, the documentation on those of sheep milk products has been scarce (17).

In this work, an overall study of the physicochemical parameters of whole ovine caseinates was performed. Acid aggregation was evaluated at different temperatures, protein concentrations and GDL amount, and the influence of sugars was verified under the chosen conditions. The possible conformational changes exhibited by casein due to the effect of sucrose or lactose were investigated using the fluorescence technique. Acid aggregation of caseinate in absence or in presence of sugars was analyzed on the basis of spectrophotometric measures and a particle size analysis, whereas gelification was investigated by following the rheological properties of the system.

3.5.3 Materials and Methods

3.5.3.1 Materials

Ovine casein was obtained from milk of Lacaune breed sheep from Southern Brazil. The procedure of precipitation was followed for the preparation of casein. After centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4°C, the skim milks were acidified at pH 4.5 with 1 M acetic acid under continuous stirring at 25°C. After 30 min at 40°C, the mixture was filtered through Whatman N° 40 paper using a vacuum pump. The precipitated casein was washed with distilled water, dissolved with the addition of NaOH 10 g L⁻¹ until it reached pH 7.0 and precipitated again. Four successive cycles of precipitation and washing were carried out. The final precipitate was washed with acetone and chloroform, to remove the residual fat globules (1, 18). The pellet of ovine casein was stored in the dark at 4 °C.

The bovine sodium caseinate powder, the acidulant glucono- δ -lactone (GDL) and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) as ammonium salt were

purchased from Sigma-Aldrich Co. Sucrose, lactose, HCl and NaOH were provided by Cicarelli SRL. Calcium chloride and sodium azide were purchased from Mallinckrodt Chemical.

3.5.3.2 Preparation of Caseinate Solutions

Ovine sodium caseinate was prepared from the ovine casein previously obtained, by dissolving the amount of wet pellet in 50 mL 0.1 N NaOH. Ovine casein solution was adjusted to a final pH 6.8 by adding HCl of different concentrations and taken to a final volume of 100 ml with distilled water (19). Bovine sodium caseinate solution were prepared from dissolution of commercial drug in distilled water (pH ~6.8) and room temperature (23-25°C).

Casein concentration was determined in the initial caseinate solutions and was measured according to the Kuaye's method (20). All the values used were the average of at least two determinations. After concentration measurements, sodium azide was added at 0.02%w/v as a bacteriostatic agent, and the solutions were stored in the dark at 4 °C.

3.5.3.3 Acid Aggregation of Casein

Kinetics of acid aggregation by using glucono-delta-lactone (GDL) was analyzed by measuring of turbidity (τ) in a Spekol 1200 spectrophotometer (Carlzeiss Jena) with a diode arrangement and a thermostated cell.

Solutions of caseinate (2 g L⁻¹ or 5 g L⁻¹) previously prepared were used. The amount of GDL added was calculated using the following relation:

$$R = \frac{\% \text{ w / w GDL}}{\% \text{ w / w protein}} \quad (1)$$

Relations tested were 0.5, 0.7 and 1.0, at temperatures of 25°C and 35°C.

Acidification was initiated by the addition of solid GDL to 10 g of caseinate suspension. Absorption spectra (450-650 nm) and absorbance at 650

nm (A_{650}) was measured as a function of time until a maximum and constant value of A_{650} was reached; simultaneously pH decrease was measured. The changes in the caseinate size were followed by the wavelength (λ) dependence of turbidity (τ) of the solutions, measured as $\beta = 4.2 + d(\log\tau) / d(\log\lambda)$, according to Risso *et al.* (21). The parameter β is related to the size, shape, and compaction degree of particles, and it can be used to detect and easily follow rapid changes in colloidal particles submitted to different conditions. β was obtained from the slope of $\log \tau$ vs. $\log \lambda$ plots, in the 450 to 650 nm range, where the absorption due to the protein chromophors is negligible (21). Determinations of β were the average of at least duplicate measures.

On the other hand, it has been shown that β , for a system of aggregating particles of the characteristics of caseinate particles tends, upon aggregation, towards an asymptotic value that can be considered as a fractal dimension (D_f) of the aggregates (22).

3.5.3.3.1 Effect of Sucrose and Lactose on Acid Aggregation of Casein. Solid sucrose or lactose was added to the ovine sodium caseinate solution (5 g L^{-1}) in order to obtain a final concentration ranging from 0.1 to 2.0% (w/v). After the addition of sucrose or of lactose, the system was maintained under continuous stirring for about 1-2 hours. R used for this experiment was 0.5, at temperature of 35°C . Determinations of β , τ and pH were performed.

3.5.3.3.2 Effect of Sucrose and Lactose on the viscosity of media. The aggregation process is limited by diffusion, and diffusion depends on the medium viscosity (η), so it is important to determine the effect of the presence of sugars on it. The viscosities were measured in triplicate, using an Ostwald's capillary viscosimeter, which can be satisfactorily used for viscosity determinations in Newtonian liquids, placed in a thermostatically controlled water bath at a temperature of $35.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$. The same viscosimeter was used for all the measurements and was mounted so that it always occupied the same position in the bath. In accordance with Poiseuille law, the time for the

meniscus solution to move between two marks was measured (t_{sol}) and the relative viscosity (η_r) was calculated as:

$$\eta_r = \frac{t_{sol} \cdot \rho_{sol}}{t_0 \cdot \rho_0} \quad (2)$$

where ρ_{sol} is solution density, ρ_0 is water density and t_0 the time for meniscus water to move between two marks. A digital densimeter Anton Paar GmbH was used to measure densities.

3.5.3.3.3 Analysis of Conformational Changes of Caseinate Solutions.

Fluorescence excitation and emission spectra of the caseinate (1 g L^{-1}) were carried out in order to detect spectral shifts and/or changes in the relative intensity of fluorescence (FI), in a spectrofluorometer Aminco Bowman Series 2. Previously, the excitation wavelength (λ_{ex}) and the range of concentration with a non significant internal filter effect were determined. The samples (3 mL) used for the spectral analysis and FI measures were transferred into a fluorescence cuvette with a light path length of 1 cm and placed into a cuvette holder keeping the temperature at fixed values desired. Values of FI were registered within the range of 300-400 nm at 35°C using a λ_{ex} of 286 nm.

3.5.3.4 Surface Hydrophobicity (S_0)

S_0 was estimated according to Kato and Nakai method (23,24) using the ammonium salt of amphiphilic 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) as a fluorescent marker, in a spectrofluorometer (Aminco Bowman Series 2). The measurements were carried out using wavelengths of excitation (λ_{exc}) and emission (λ_{em}) fixed at 396 and 474 nm, respectively, at a constant temperature of 35°C. Both wavelengths were previously determined by performing the measurements of emission and excitation spectra for caseinate-ANS complex.

The FI was measured in samples containing a fixed volume of 6 mM ANS and consecutive aggregates of 1% w/v caseinate with or without sugars (FI_b). The FI was also determined in samples with protein alone in presence or

absence of sugars at the same concentrations (FI_p). The difference between FI_b and FI_p (ΔF) was calculated and S_0 was determined as the initial slope in the ΔF vs. Cas concentration (% w/v) curve.

3.5.3.5 Size Distribution of Caseinate Particles

Average size of caseinate particles and size distribution measurements were carried out in a Mastersizer 2000E HYDRO 2000 MU model (Malvern Instruments). This instrument is based on Low Angle Laser Light Scattering (LALLS) which determines that diffraction angle is inversely proportional to size particle.

Experimental data were obtained as a function of volume % distributions vs. diameters size and De Brouckere mean diameter ($D_{4,3}$) was also calculated by software processing. To carry out this determination an amount of solid GDL was added to a 550 mL of solution of caseinate (2 g L^{-1}) in order to obtain a relation GDL/protein of 0.5. This mixture was maintained at a constant and slow stirring of 600 rpm. Measurements at different times were performed until the maximum of obscuration (turbidity) allowed by the instrument was reached. Simultaneously pH monitoring was followed.

3.5.3.6 Rheological Properties of Acid Gels of Caseinates

Rheological properties of caseinate samples (30 g L^{-1}) were determined in a stress and strain controlled rheometer AR G2 model (TA Instruments) using a cone geometry (diameter: 40 mm, cone angle: 2° , cone truncation: 55 mm) and a system of temperature control with a bath recirculator (Julabo model ACW 100) connected to a Peltier plate. An amount of solid GDL according to a proportion GDL/protein of 0.5 was added to initiate the acid gelification.

Measurements were performed each 20 sec during 100 min with a constant oscillation stress of 0.1 Pa and a frequency of 0.1 Hz. The Lissajous figures at various times were plotted to ensure that the measurements of

storage or elastic modulus (G') and loss or viscous modulus (G'') were always obtained within the linear viscoelastic region.

The $G'-G''$ crossover times (t_g) of acidified caseinate systems were considered here as the gel times, since most studies of milk/caseinate gelation have adopted this criterion (13, 25). pH at t_g was also determined considering the pH value at the $G'-G''$ crossover (pH_g).

3.5.3.7 Statistical Analysis

Several determinations were performed at least in duplicate. The data were reported as the average value \pm their standard deviation. The statistical analysis was performed with Sigma Plot 10.0 software. The relationship between variables was statistically analyzed by correlation analysis using Pearson correlation coefficient (r). The statistical significant was considered for $p < 0.05$ values.

3.5.4 Results and Discussion

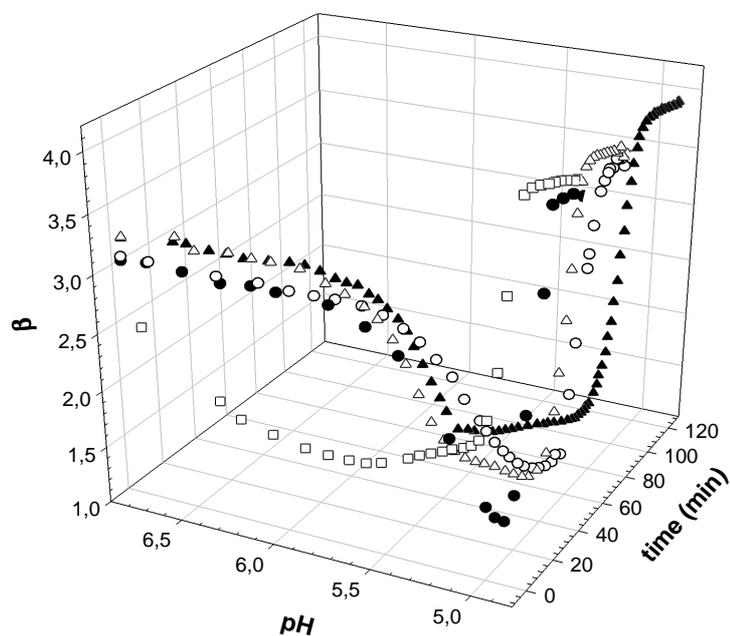
3.5.4.1 Acid Aggregation of Ovine Caseinate

After addition of GDL, ovine sodium caseinate solutions start a number of changes that lead to protein aggregation. Different variables can modify the kinetic of this process. Fig. 1 shows the influence of the temperature variation on the acid aggregation of ovine caseinate. In all cases could be observed the existence of two well definite stages. In the first one, much slower, was observed a gradual increase of the turbidity (Fig. 2A) and a decrease of the parameter β at the long of the time and at decreasing the pH. At pH near to isoelectric point of caseins ($\text{pI} \sim 4.6$), when particles lost the electrostatic stability by reduction of its net charge, the second stage of aggregation started (t_{ag}) with high increment of the number of collisions between casein molecules per time unit. It was manifested by a sharp increase in τ (do not shown) and β until the time the aggregates stop growing, at which both parameters remain constant. These profiles suggest a rapid association of caseinate submicelas to

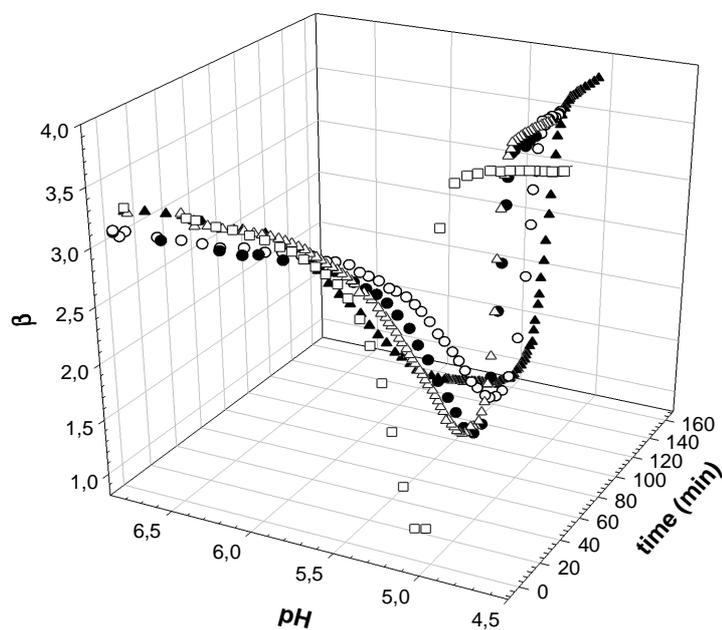
form a large number of small particles, which are finally aggregated to form bigger particles.

It is known that bovine sodium caseinate in aqueous solution has a considerable level of self-association (like sub-micelles or micelles), and that the level of these self-association of caseins particles depends on such factors as protein concentration, protein composition, calcium ion concentration, ionic strength, temperature and pH (26,27). These features can be extrapolated to ovine sodium caseinate solutions, which forms colloidal particles self-associated bigger than bovine ones, in absence or in presence of calcium (data not shown). In the first stage during acidification process, at $\text{pH} > \text{pI}$, the diminution of β could indicate a conformational change or a reduction on average size due to disaggregating of submicelles of sodium caseinate, leading to the formation of smaller compact protein structures as Belyakova *et al.* (12) suggested for bovine caseinate, but even in the absence of sucrose.

The pH value observed at the t_{ag} (pH_{ag}) ranged from 4.9 to 5.1 for all conditions showed in Fig. 1. However, the acid aggregation at 35°C (Fig 1 A) was faster than at 25°C (Fig 1 B), for the different caseinate concentrations and GDL/caseinate ratios (R). The effect of the temperature on the drop of viscosity of bovine caseinate solutions already was described by Barreto *et al.* (28), but at much higher concentrations. Since the aggregation process is limited by the diffusion of particles, this effect could favour the increase of the aggregation rate of caseinate particles. On the other hand, an increase of the temperature, which increments the constant of rate of the GDL hydrolysis, reduced the time required to reach the same concentration of protons (similar pH_{ag}). This outcome is effective to lead to protein-protein interactions that could be hydrophobics, which are favored by the increase in temperature.



(A)



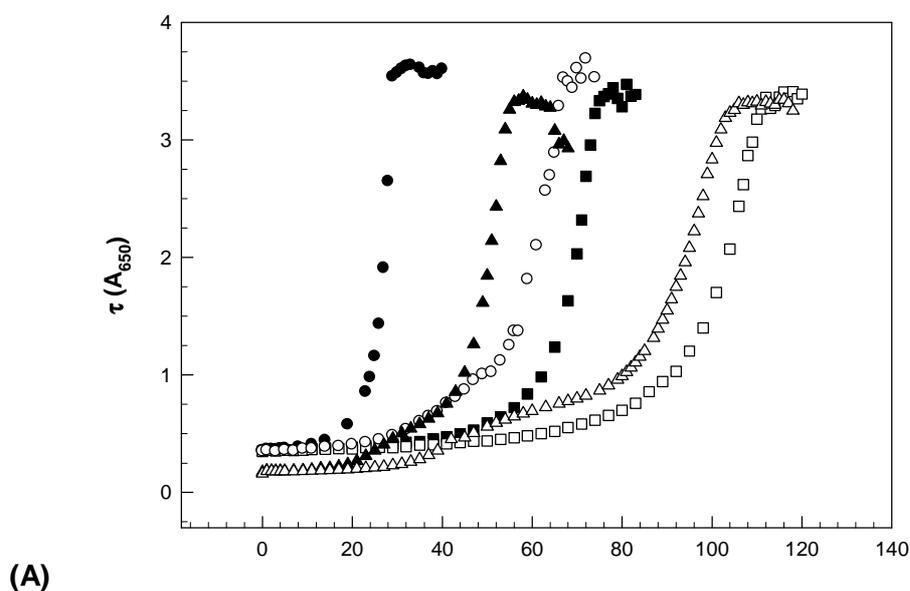
(B)

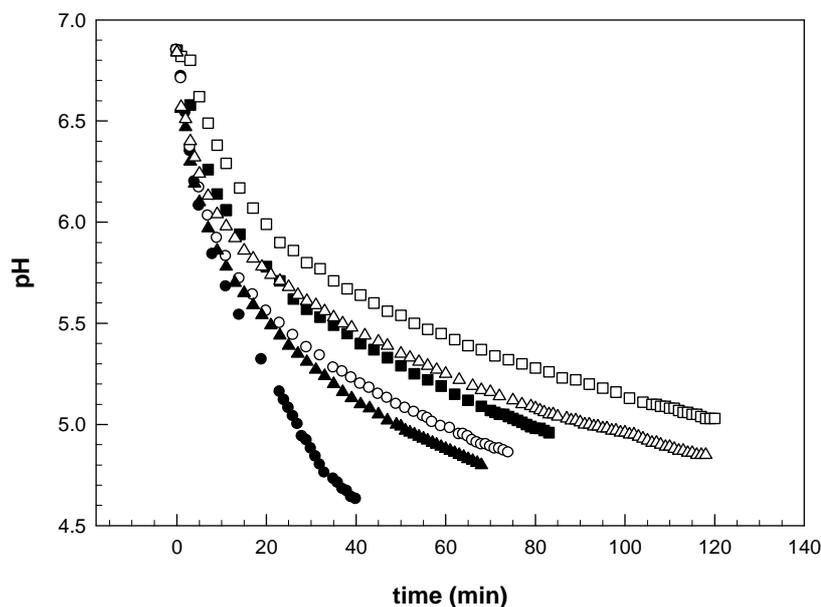
Figure 1 (15). 3D projection of curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation at 35°C (A) and at 25°C (B) of ovine sodium caseinate solutions: (●) 5 g L⁻¹, R 0.7; (○) 5 g L⁻¹, R 0.5; (△) 2 g L⁻¹, R 0.7; (▲) 2 g L⁻¹, R 0.5; (□) 2 g L⁻¹, R 1.0. Each point is the average of at least two independent determinations.

Different R values (0.5; 0.7; 1.0) were used in order to obtain varied rates of acidification (Fig. 1). It was observed that high GDL relation made this process faster, independently of the temperature used. The t_{ag} decreased 78-80% when R varied from 0.5 to 1.0, at the same caseinate concentration. An increase of the amount of added GDL decreased the time required to achieve the pH_{ag} .

Caseinate concentration affected the process considerably, taking into account the same temperature and GDL amount (Fig 1). The time required for the aggregation was smaller at concentrations of 5 g L^{-1} , with a reduction ranged from 16 to 26% compared to the other caseinate concentration (2 g L^{-1}). Moreover, the velocity of pH decrease rose with the increase of temperature, amount of added GDL and ovine caseinate concentration (Fig 2B). Therefore although the viscosity increased with the protein concentration, the reduction of the rate at which pH becomes lower leads to a t_{ag} higher when concentration decreasing.

In summary, the time required to start a sharp increase in the number of particles and in aggregates size decrease with the increment of temperature, amount of added GDL and ovine caseinate concentration.





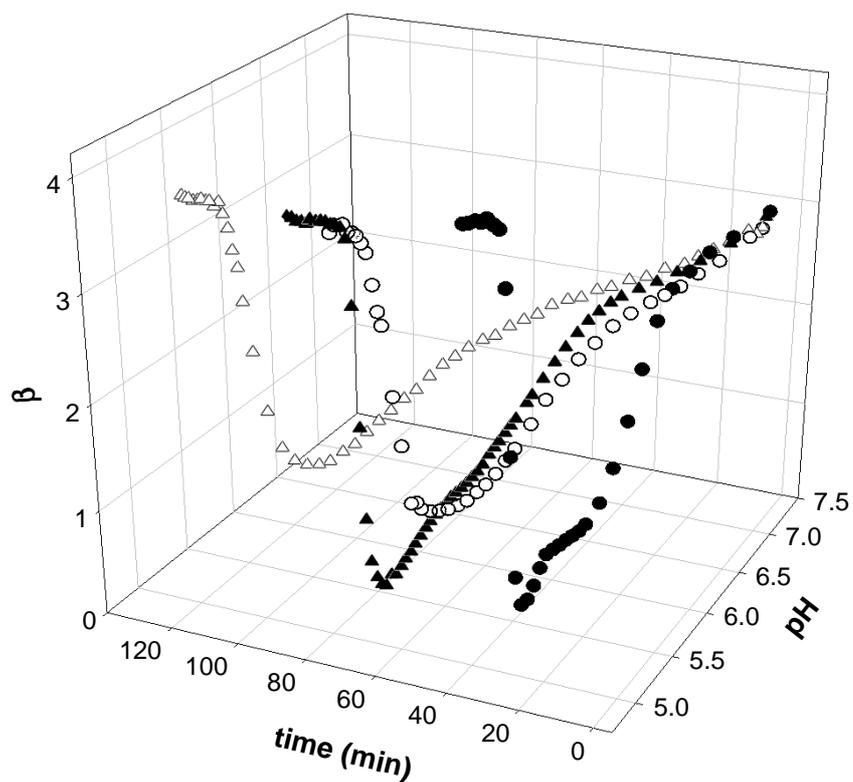
(B)

Figure 2 (16). Variations of turbidity (τ) (A) and pH (B) of ovine caseinate solutions as a function of time after addition of GDL for different ovine caseinate concentrations, R and temperatures: (●) 5 g L⁻¹, R 0.7, 35°C; (○) 5 g L⁻¹, R 0.5, 35°C; (▲) 2 g L⁻¹, R 0.7, 35°C; (Δ) 2 g L⁻¹, R 0.5, 35°C; (■) 5 g L⁻¹, R 0.7, 25°C; (□) 5 g L⁻¹, R 0.5, 25°C. Each point is the average of at least two independent determinations.

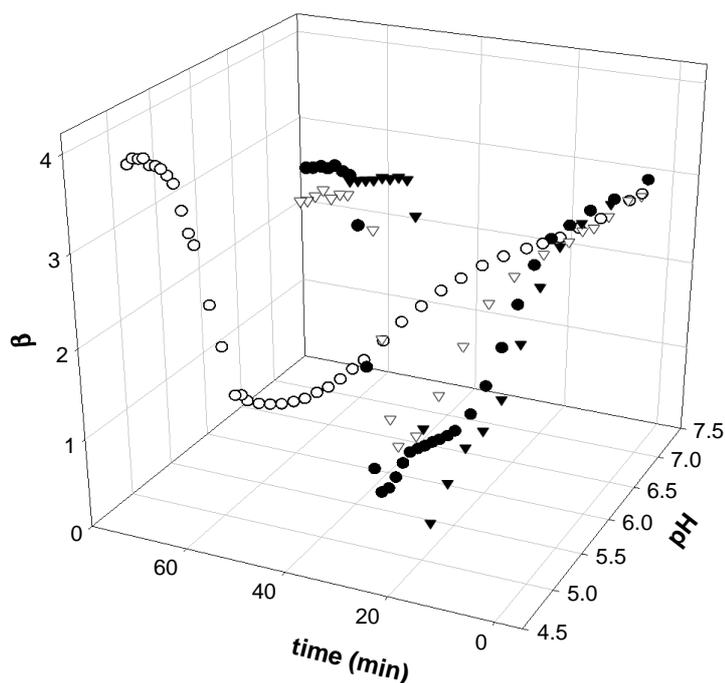
Besides, the duration of the first stage was also governed by the higher intensity of association/dissociation of caseins in colloidal particles, which depends on the change in the ionic and solubility characteristics of the casein molecules (13). In this stage, while the pH diminishes, the energetic barrier originated by electrostatic repulsion among similarly charged residues decreased and the collisions that lead to the formation and development of aggregates were affected. The increase of the temperature and of the caseinate concentration improved the probability of collision between particles, consequently decreased the t_{ag} .

On the other hand, the modification of different mentioned variables did not produce appreciable changes on the D_f of aggregates formed at the end of the acidification process.

Comparing these results with those obtained to bovine caseinate (Fig 3), we can observe similar profiles and behaviours face up to changes of studied variables, but always t_{ag} was higher and D_f lower for ovine caseinate than bovine ones. Ovine caseinate has a greater proportion of α_S - and β -CN, and lower κ -CN than bovine protein (data not shown). Because of these features, average sizes of the ovine colloidal particles in suspension are always biggest. These results could indicate that t_{ag} and D_f depend also on the initial state of colloid particles of sodium caseinate in suspension, like composition, average size and surface hydrophobicity among others.



(A)



(B)

Figure 3 (17). 3D projection of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation of 5 g L^{-1} sodium caseinate. Effect of temperature (A) and effect of R (B) for ovine caseinate solutions: (\circ) 35°C , R 0.5; (Δ) 25°C , R 0.5; (∇) 35°C , R 0.7; and bovine caseinate solutions: (\bullet) 35°C , R 0.5; (\blacktriangle) 25°C , R 0.5; (\blacktriangledown) 35°C , R 0.7. Each point is the average of at least two independent determinations.

3.5.4.2 Effect of sucrose or lactose on caseinate solutions and acid aggregation

3.5.4.2.1 Analysis of conformational changes. The intrinsic fluorescence of sodium caseinate and mixtures at different proportions of sucrose or lactose are presented in the Figure 4. The blue shift and an increase in the fluorescence intensity observed in presence of both sugars suggested a change to a more hydrophobic environment around the fluorophores groups in caseins. These results could be associated with the production of a conformational change leading to the formation of colloidal particles of caseinate with more compact structures.

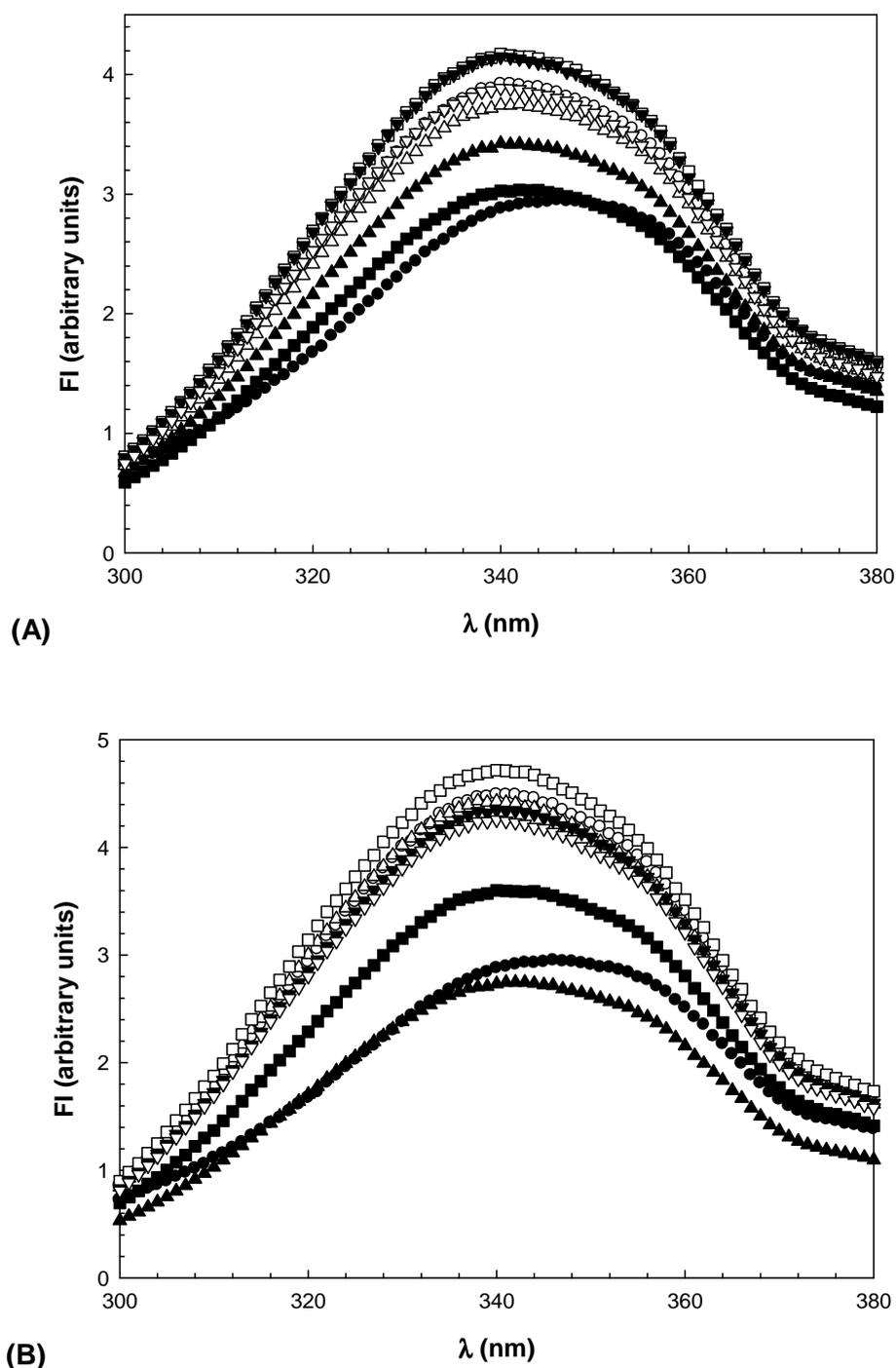


Figure 4 (18). Fluorescence relative intensity (FI) vs. wavelength (λ) in mixtures of 1 g L^{-1} ovine sodium caseinate in the presence of sucrose (A) or lactose (B) at different concentrations: (\bullet) 0%; (\circ) 0.1%; (\blacktriangle) 0.3%; (\triangle) 0.5%; (\blacksquare) 0.7%; (\square) 1.0%; (\blacktriangledown) 1.5%; (\triangledown) 2.0% (w/v). Temperature: 35°C . Each point is the average of at least two independent determinations.

3.5.4.2.2 Surface Hydrophobicity (S_0). Surface hydrophobicity of the sodium caseinate was determined for diverse sugar concentrations and it is listed in Table 1. S_0 decreased sharply in presence of sucrose or lactose at all sugar concentrations. The results would indicate the formation of casein colloidal aggregates (CCA) with more compact structure when any sugars are present which exposes in its surface low hydrophobic groups. At pH of caseinate samples (6.80-6.87), the results are similar to those described by Belyakova *et al.* (12) for bovine caseinate at $7.0 < \text{pH} < 5.1$ but at much higher sucrose concentrations (10-60 w/v %).

Table 1 (14). Surface hydrophobicity in mixtures of 1 g L^{-1} ovine sodium caseinate at different sucrose or lactose concentrations, at 35°C .

Sucrose Concentration (% w/v)	S_0 (% w/v ⁻¹)
0	154 ± 12
0.1	14 ± 1
0.5	20 ± 1
1	16.0 ± 0.3
2	13.6 ± 0.9
Lactose Concentration (% w/v)	S_0 (% w/v ⁻¹)
0	154 ± 12
0.3	37 ± 1
0.7	34 ± 2
1	16.2 ± 0.8
2	12 ± 1

3.5.4.2.3 Effect on kinetic of acid aggregation. After ascertaining the influence of temperature, caseinate concentration and GDL/caseinate ratio on acid aggregation, the following conditions were chosen to investigate the effect of sugars: temperature of 35°C , R of 0.5 and a caseinate concentration of 5 g L^{-1} .

Effect of sugars on caseinate acid aggregation is presented in the Fig. 5. The t_{ag} diminished until 32% at low sucrose concentrations (up to 0.3% w/v), however increased 15-31% at high concentrations (Fig. 5 A). On the other hand, the

values at all lactose concentrations enlarged (10-37%) (Fig. 5 B). This may be partly linked to the reduction of the rate at which pH becomes lower in the presence of sugars, especially at low sucrose concentrations. Results agree with the variation in velocity of the first stage, which is related to the second step of aggregation and the D_f reached at the end of the process.

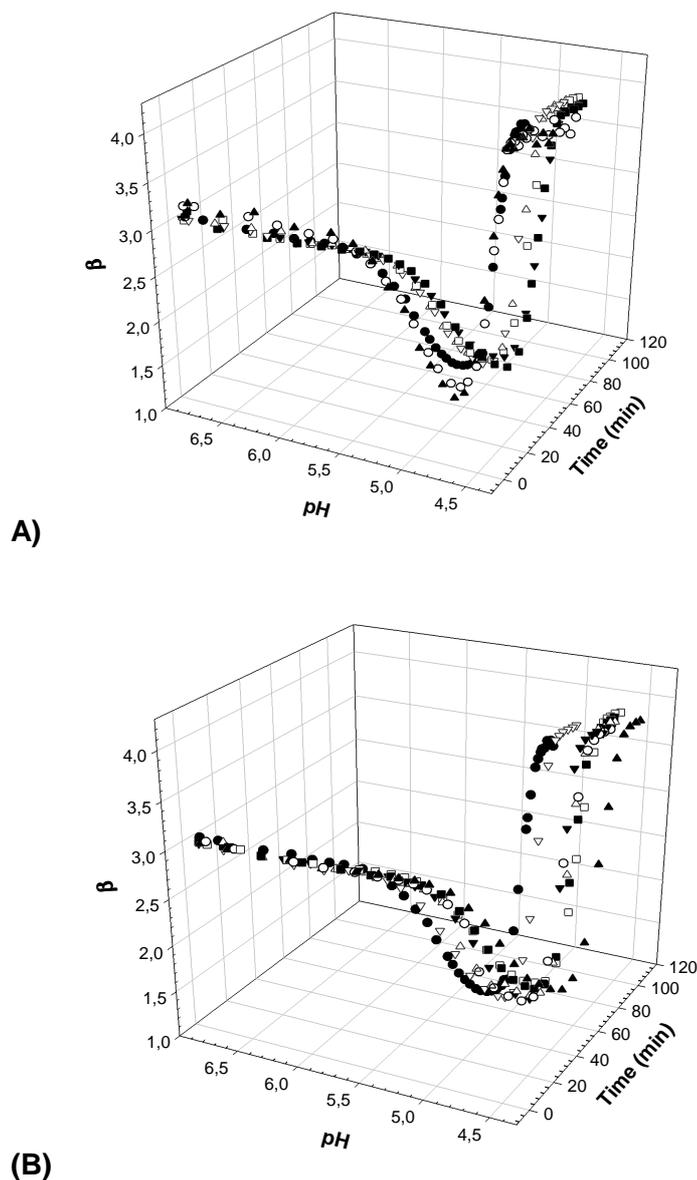


Figure 5 (19). 3D projection of the curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation (R 0.5, 35°C) of ovine sodium caseinate solutions (5 g L^{-1}) with sucrose (A) and lactose (B) at different concentrations: (●) 0%; (○) 0.1%; (▲) 0.3%; (△) 0.5%; (■) 0.7%; (□) 1.0%; (▼) 1.5%; (▽) 2.0% (w/v). Each point is the average of at least two independent determinations.

Due to the fact that aggregation is limited by particles diffusion, we determined the effect on the viscosity caused by the addition of sucrose or lactose. Fig. 6 shows a regular increment of η_r with the concentration of tested sugars, in greater proportion for lactose.

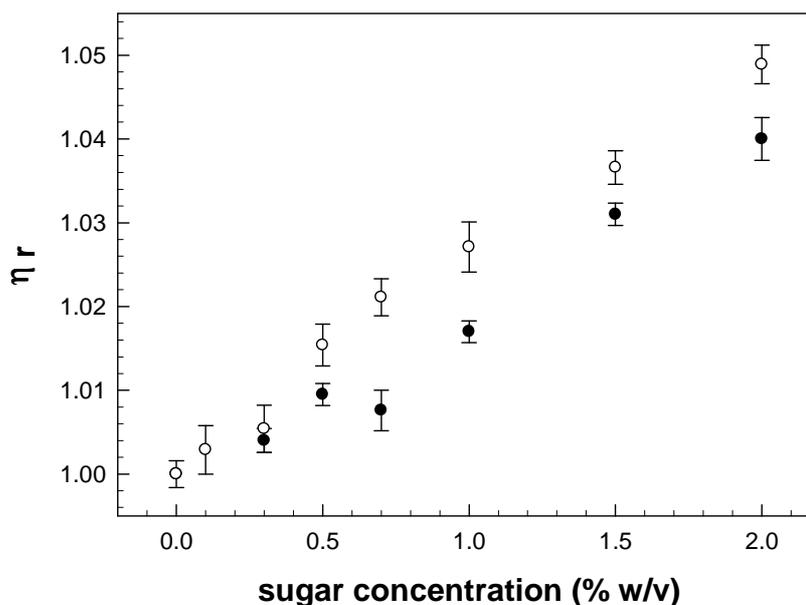


Figure 6 (20). Relative viscosity (η_r) of the medium as function of sugar concentration: sucrose (●) or lactose (○). Temperature: 35°C.

For the same cosolute concentrations, greater t_{ag} values were observed with lactose than with sucrose, probably due to the biggest increase in viscosity of the medium observed with the presence of the first sugar.

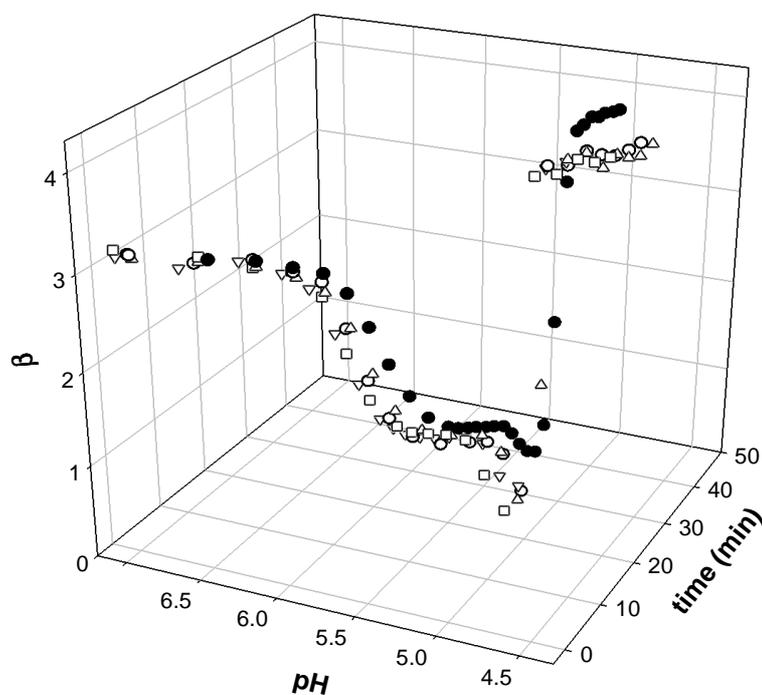
It is possible suggest that sugars induce two opposite effects: 1) a decrease of protein aggregation caused by the reduction of surface hydrophobicity and the rise of the viscosity reducing the particle diffusion; 2) increase of the protein-protein interaction by preferential exclusion of sugars from the protein's surface. The prevalence of one or another effect depends on the nature and the concentration of sugars.

In the first place, a marked decrease of S_0 was observed in the presence of sugars and this outcome not favours the hydrophobic attractive interactions which drive to aggregation of caseinate particles. As often lactose as sucrose

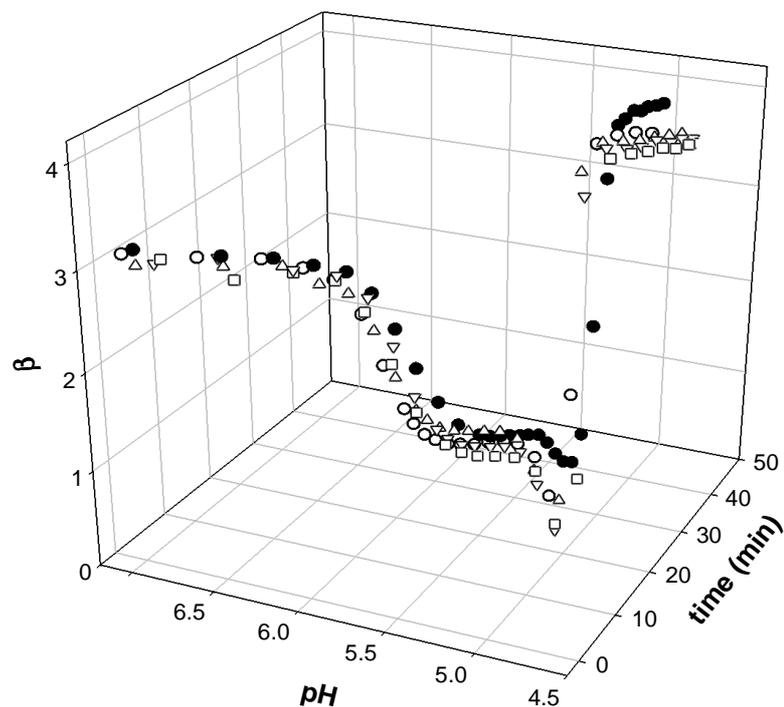
increased the η_r , however the first had a major impact, which would explain the increase in time even at low concentrations of lactose.

On the other hand, according to Timasheff's theory of cosolvent preferential binding to proteins, sucrose and others polyols are preferentially excluded from protein surface, producing an exclusion zone in the protein neighbourhood which tend to reduce itself to minimize the free energy of the system, promoting in this way stabilization of native structures or self-assembly and aggregation processes (29).

Comparing these results with those obtained to bovine caseinate (Fig. 7), we can observe that t_{ag} assumes values always similar and lower in presence of both sugars than caseinate alone. On the other hand, the pH_{ag} did not change both in the absence or presence of disaccharides. Conversely the pH_{ag} varied from 5.0 to 4.7 in presence of sucrose and from 5.0 to 4.6 in presence of lactose for ovine caseinate, indicating that lactose and sucrose present potential effects upon its electrostatic stability. Besides, the D_f of ovine aggregates formed at the end of acidification course was higher than those of bovine origin.



A)



(B)

Figure 7 (21). 3D projection of the curves of variations of β and pH as a function of time during the acid aggregation (R 0.5, 35°C) of bovine sodium caseinate solutions (5 g L⁻¹) with sucrose (A) and lactose (B) at different concentrations: (●) 0%; (○) 0.1%; (△) 0.5%; (□) 1.0%; (▽) 2.0% (w/v). Each point is the average of at least two independent determinations.

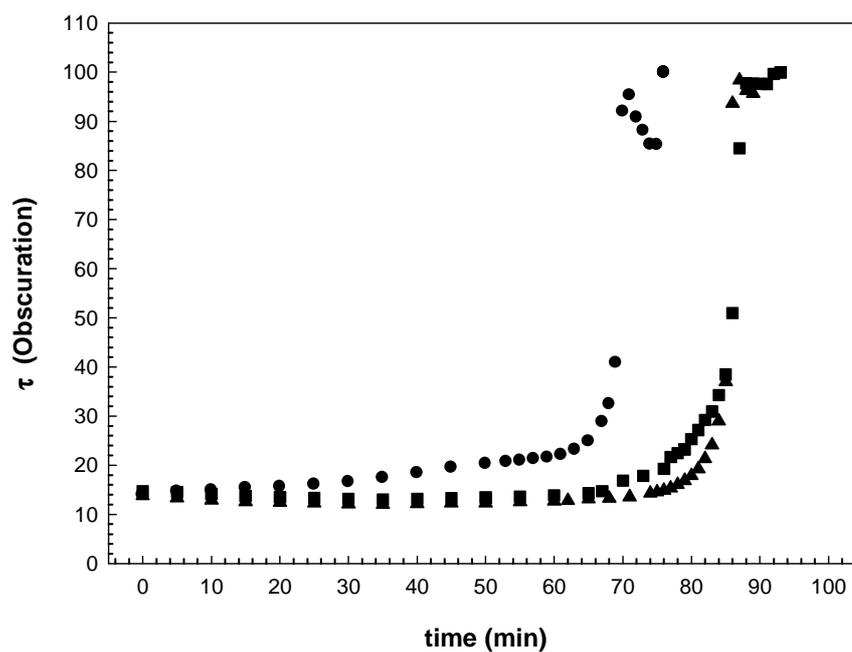
A difference between ovine and bovine caseinates acid aggregation behaviour could be expected because the difference in its casein composition and in their electrostatic or/and steric stabilities. Besides, sugars only produce a slight reduction of bovine caseinate surface hydrophobicity (data not shown); therefore there are more hydrophobic patches on protein surface that it favours aggregation.

3.5.4.2.4 Size Distribution of Caseinate Particles. To verify the relationship of parameter β with average particles size during acid aggregation process, we had done LALLS measurements. Fig. 8 depicts the variation of the turbidity (τ) as obscuration and the parameter $D_{4,3}$ as a function of time for 2 g L⁻¹ ovine sodium caseinate solutions in absence or in presence of an intermediate sugar:protein ratio among assayed ones. Samples containing sucrose or

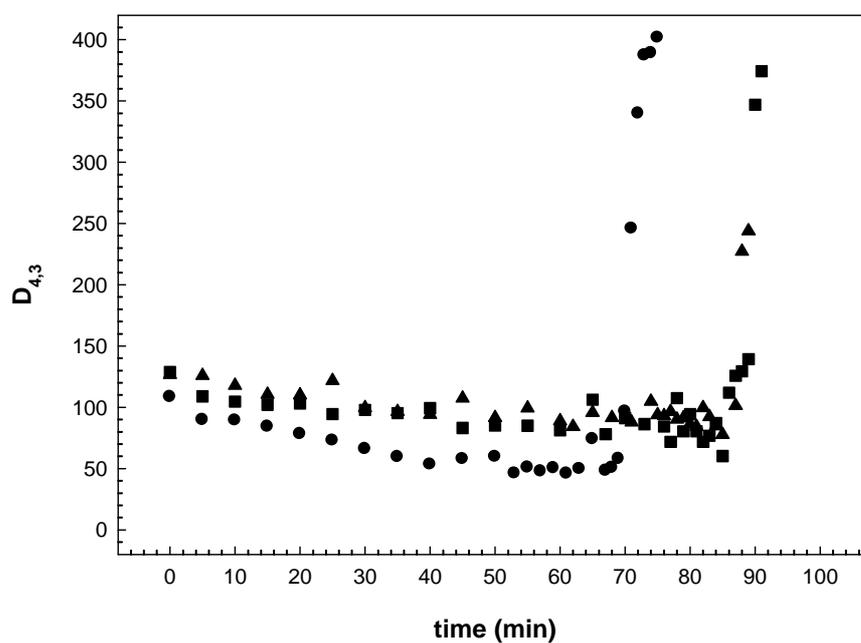
lactose (0.5% w/w) exhibited a same behavior that those obtained by spectrophotometric determinations. Mixtures of caseinate and sugars took more time to reach higher values of obscuration than samples without sugars (Fig. 8A). On the other hand, it also observed two stages. In the first one, after adding GDL and while turbidity remained constant, a slowly reduction of the particles average size was observed. From the moment (t_{ag}) when a sharp increase of turbidity begins, a consistent increase of $D_{4,3}$ is also observed up the maximum obscuration reached by the equipment (Fig. 8B). This parameter t_{ag} became higher in presence of both sugars.

On the other hand, without sugars, number % distributions (not shown) reveal the existence of pre-existing caseinate aggregates with diameters of about 1.5 microns, which are responsible of initial obscuration. At the first stage, the increment of $D_{4,3}$ while the obscuration increases slowly may be due to dissociation of the pre-existing aggregates simultaneously with the formation of a large amount of new aggregates of smaller size. At pH 4.9-5.1, the number of particles with electrostatic destabilization is so great that it causes the aggregation to much bigger particles and as a result the raise of $D_{4,3}$.

In the presence of sugars, the same thing seemed to happen, but in the first stage would prevail the dissociation of the pre-existing aggregates. The constant value of obscuration during the first stage suggests that disaccharides reduce the rate of formation of new particles. When the number of small particles is large enough, the obscuration increases up they generate bigger aggregates at lower pH.



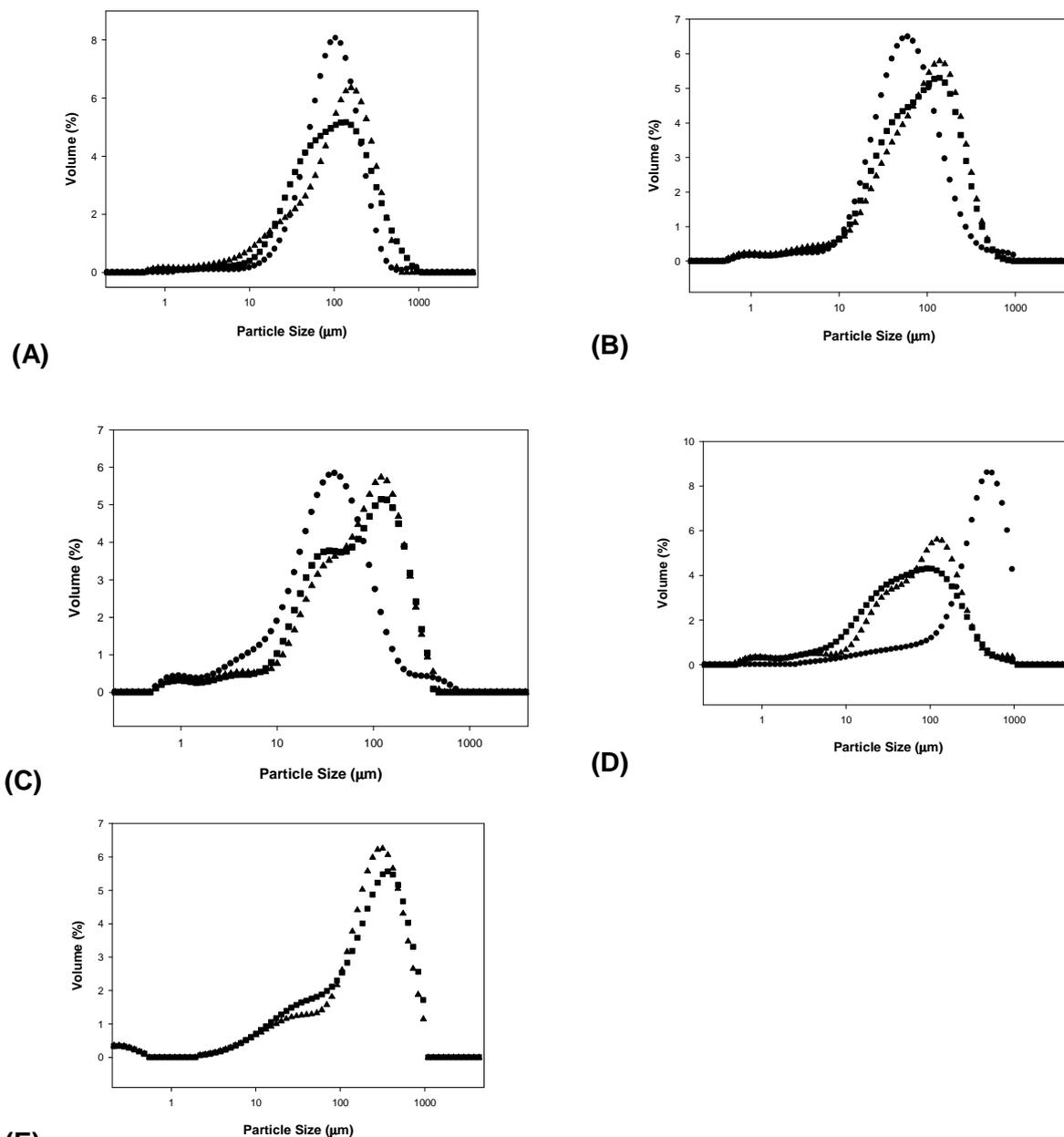
(A)



(B)

Figure 8 (22). Parameters turbidity (obscuration) (A) and $D_{4,3}$ (B) as a function of time as a function of time after the addition of GDL (R 0.5, 25°C) in mixtures of 2 g L⁻¹ ovine sodium caseinate (●), in presence of 0.5% w/v sucrose (▲) or lactose 0.5% (■).

As it is shown in Fig. 9, the curves for the size distribution were also dependent on the presence of lactose or sucrose. These and above results would be an indicator that presence of both disaccharides increases the electrostatic stability of the colloidal particles of ovine caseinate, especially lactose.



(E)
Figure 9 (23). Laser diffraction derived size frequency distribution (presented as volume percentage) of particles during the acidified aggregation (R 0.5, 25°C) of ovine sodium caseinate solutions (2 g L⁻¹) (●) and in presence of 0.5% (w/v) sucrose (▲) or lactose (■). (A) 0 min; (B) 20 min; (C) 60 min; (D) 73 min; (E) 90 min.

The mixtures presented a diverse particle size distribution before the addition of GDL (Fig. 9 A), and variations were observed after adding GDL depending on the absence or the presence of sugars (Fig. 9 B and C). After 73 min, when the sample without sugars already has bigger aggregates, samples with sugars show even a shift to lower particles size (Fig. 9 D). Only appear bigger aggregates at 90 min before GDL addition (Fig. 9 E).

It has been shown by light scattering measurements in dilute solutions that sodium caseinate associates into small well-defined aggregates with an aggregation number that depends on the environmental conditions such as temperature, pH, or ionic strength. Probably star-like aggregates are formed with a hydrophobic centre and a hydrophilic (charged) corona (30). The degree of compaction and average size of the aggregates formed at the end of the acidification process depends not only on the distribution of the initial sizes but also on the kinetic of the aggregation phenomena. As the aggregation process becomes slower the more easily a polypeptide chain could acquire different orientations leading to the formation of a more compact aggregate.

3.5.4.3 Rheological Properties of Acid Gels of Caseinates

Above a certain protein concentration, the loss of electrostatic stability by acidification results in the formation of a three-dimensional gel network. Effect of caseinate concentration, GDL/caseinate ratio, temperature and presence of sugars on gelation of ovine caseinate was investigated, changing one variable at a time. Results in Table 2 indicate that G' - G'' crossover times (t_g) decreased as protein concentration or GDL/caseinate ratio increased, without variation on pH_g . Instead when the temperature dropped, t_g grew. The pH_g was about 5.0-5.1 for all systems. Because the same amount of H^+ is needed to attain the caseinate clotting in all samples (similar pH_g), an increase in the GDL concentration reduced the gel time. The t_g decreased by about 43% as the GDL/protein ratio increased from 0.5 to 0.7 and 64% when the GDL/protein ratio increased from 0.5 to 1.0, for a given amount of caseinate (3% w/v) and at 35°C.

Also an increment of caseinate concentration or a drop of temperature produce gels with higher storage modulus. On the contrary, GDL/caseinate ratio assayed did not produce changes in the gels elasticity.

Table 2 (15). Gel times (t_g), pH_g and maximum storage modulus (G') for formulations containing sodium caseinate at different concentrations, temperatures and amounts of adding GDL.

Sodium Caseinate (% w/v)	R	T (°C)	t_g (min) \pm 0.01	$pH_g \pm 0.01$	G'_{max} (Pa) ± 10
5	1	35	9.27	4.99	920
3	1	35	11.51	4.97	230
3	0.7	35	17.89	5.03	263
3	0.5	35	31.56	4.99	250
3	0.5	25	47.64	5.07	550

Similar results had been reported by Braga *et al.* (13) for bovine caseinate, but at 10 °C. The outcomes observed by these authors denote that the gel obtained with fast acidification was weaker at rupture but had a higher capacity to store elastic energy. In contrast, slow acidification yielded a hard, firm network, probably because of extensive reorganization or rearrangement within the segments.

As can be seen in Table 2, the temperature also affected the rheology of caseinate gels. The dynamic mechanical properties of dense sodium caseinate solutions were studied by Pitkowski *et al.* (30), through measuring the shear viscosity and the frequency dependent loss and storage shear modulus. At high caseinate concentrations, the viscosity decreases strongly with increasing temperature due to a decrease of the repulsive interaction between the caseinate particles.

Effects of caseinate concentration, GDL/caseinate ratio and temperature on gel times of ovine caseinate were according to the results obtained in the study of aggregation with diluted caseinate solutions.

When added sucrose or lactose to 3% (w/v) to the caseinate solutions, at R 0.5 and 35°C, there were no appreciable changes neither in t_g (24-27 min) nor in pH_g (5.0-5.2). The values of maximum G' ranged 180-260 Pa, close to those obtained in the absence of sugars. Although the addition of sucrose and lactose led to changes on the aggregation of diluted samples, no modifications were detected on the gelification of concentrated ones, likely a few molecules of sugars in comparison with an amount of protein particles.

This study suggests that the use of simple spectrophotometric techniques can produce reliable results in the study of processes like aggregation and gelling of proteins as caseinates.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Universidad Nacional de Rosario and the Universidad Nacional de Quilmes (Argentina), and the Foundation Coordination for the Improvement Higher Education Personnel (CAPES), of Ministry of Education (Brazil). A. Brandelli and J. R. Wagner are research awardees of CNPq (Brazil) and CONICET (Argentina) respectively. Thanks to Dr. Gonzalo Palazolo and MSc. Luis Martínez of Universidad Nacional de Quilmes for their advice in the LALLS and rheological measurements.

3.5.5 Literature Cited

- (1) Moatsou, G.; Samolada, M.; Katsabeki, A.; Anifantakis, E. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. *Lait* **2004**, *84*, 285-296.
- (2) Cavalli, S. V.; Silva, S. V.; Cimino, C.; Xavier Malcata, F.; Priolo, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chem.* **2008**, *106*, 997-1003.
- (3) Park, Y. W.; Juárez, M.; Ramos, M.; Haenlein, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 88-113.

- (4) Raynal-Ljutovac, K.; Lagriffoul, G.; Paccar, P.; Guillet, I.; Chilliari, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Rumin. Res.* **2008**, *79*, 57-72.
- (5) Suárez, V. H.; Buseti, M. R. Lechería Ovina en la Argentina. *Boletín de Divulgación Técnica INTA* **2006**, *90*, 195-204.
- (6) Brito, M. A.; González, F. D.; Ribeiro, L. A.; Campos, R.; Lacerda, L.; Barbosa, P. R.; Bergmann, G. Blood and milk composition in dairy ewes from southern Brazil: variation during pregnancy and lactation. *Ciência Rural* **2006**, *36*, 942-948.
- (7) Walstra, P.; Jenness, R. Composición y estructura de la leche. In *Dairy chemistry and physics*, spanish edition; John Wiley & Sons Eds.; Acribia S. A.: Zaragoza, 1984; pp. 1–225.
- (8) Gaucheron, F.; Le Graet, Y.; Boyaval, E.; Piot, M. Binding of cations to casein molecules. Importance of physicochemical conditions. *Milchwissenschaft* **1997**, *52*, 322-327.
- (9) Ramos, M; Juarez, M. Sheep milk. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski, H.; Fuquay, J. W.; Fox, P. F. Eds.; Academic Press: Amsterdam, 2003, vol. 4, pp. 2539-2545.
- (10) Antipova, A. S.; Semenova, M. G. Effect of Sucrose on the Thermodynamic Incompatibility of Different Biopolymers. *Carbohydrate Polym.* **1995**, *28*, 359-365.
- (11) Dickinson, E.; Merino, L. M. Effect of sugars on the rheological properties of acid caseinate-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 321-331.
- (12) Belyakova, L. E.; Antipova, A. S.; Semenova, M. G.; Dickinson, E.; Merino, L. M.; Tsapkina, E. N. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2003**, *31*, 31-46.
- (13) Braga, A. L. M.; Menossi, M.; Cunha, R. L. The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal* **2006**, *16*, 389-398.
- (14) Ruis, H. G. M.; Venema, P.; Linden, E. Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 545-554.
- (15) de Kruif, C. G. Skim Milk Acidification. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *185*, 19–25.
- (16) Braga, A. L. M.; Cunha, R. L. The effects of xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate–xanthan gels. *Food Hydrocolloids* **2004**, *18*, 977–986.
- (17) Park, Y. W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68*, 73-87.

- (18) Shalichev, J.; Tanev, G. Isolation, Purification, and Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alpha-s-Casein. *J. Dairy Sci.* **1972**, *6*, 171-176.
- (19) Gatti, C. A.; Alvarez, E. M.; Suarez Sala, V. Effect of the Anion Citrate on the Mineral Composition of Artificial Casein Micelles. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 141-144.
- (20) Kuaye, A. Y. An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.* **1994**, *49*, 207-211.
- (21) Risso, P. H.; Relling, V. M.; Armesto, M. S.; Pires, M. S.; Gatti, C. A. Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. *Colloid Polym. Sci.* **2007**, *285*, 1435-1536.
- (22) Horne, D. S. Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1987**, *83*, 259-270.
- (23) Kato, A.; Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *624*, 13-20.
- (24) Haskard, C. A.; Li-Chan, E. C. Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS) fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2671-2677.
- (25) Curcio, S.; Gabriele, D.; Giordano, V.; Calabro, V.; Cindio, B.; Iorio, G. A rheological approach to the study of concentrated milk clotting. *Rheologica Acta* **2001**, *40*, 154-161.
- (26) Fox, P. F.; Mulvihill, D. M. Physico-chemical aspects of dehydrated protein-rich milk products. In: *Proceedings of the International Dairy Federations Symposium*, Denmark, 1983, pp. 188.
- (27) Farrell, H. M.; Cooke, P. H.; King, G.; Hoagland, P. D.; Groves, M. L.; Kumosinski, T. F.; Chu, B. Particle sizes of casein submicelles and purified κ -casein. In *Macromolecular Interactions in Food Technology*, Parris, N.; Kato, A.; Creamer, L. K.; Pearce, J. Eds. American Chemical Society: Washington, 1996, pp. 61.
- (28) Barreto, P. L. M.; Roeder, J.; Crespo, J. S.; Maciel, G. R.; Terenzi, H.; Pires, A. T. N.; Soldi, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chem.* **2003**, *82*, 425-431.
- (29) Timasheff, S. N. Water as ligand: Preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochem.* **1992**, *31*, 9857-9864.
- (30) Pitkowski, A.; Durand, D.; Nicolai, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *326*, 96-102.

4. CONCLUSÕES

O queijo Fascal produzido com a tecnologia tradicional e cultura iniciadora comercial apresentou redução das contagens de coliformes durante a maturação do queijo, num período estabelecido em noventa dias. Do ponto de vista físico-químico e com base nos parâmetros da legislação brasileira para queijos, o queijo Fascal maturado por noventa dias foi classificado como um produto de baixa umidade ou de massa dura e gordo.

A composição físico-química do leite de ovelha da raça Lacaune foi semelhante à de leite ovino produzido no Brasil, mas inferior à de leite ovino produzido no continente europeu. Foi evidenciada a necessidade de uma legislação brasileira que contemple as diferentes espécies produtoras de leite.

Alguns isolados de bactérias lácticas selecionadas a partir de leite cru e de queijo de ovelha apresentaram viabilidade para serem usadas como culturas iniciadoras e demonstraram a produção de substâncias semelhantes a bacteriocinas. *Lactobacillus plantarum* LCN 17 e *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 exibiram atividade contra *Listeria monocytogenes*, sendo que as substâncias produzidas pelo primeiro isolado apresentaram maior estabilidade aos tratamentos submetidos.

A utilização da combinação das culturas autóctones *Lactobacillus plantarum* LCN 28 e *Lactobacillus rhamnosus* LCN 43 na fabricação de queijo Fascal demonstrou ser adequada em condições experimentais, o que poderia contribuir na produção de um queijo típico de leite de ovelha.

As avaliações físico-químicas realizadas com caseínas e caseinatos obtidos a partir do leite de ovelha da raça Lacaune contribuíram para que possam ser desenvolvidos produtos com este leite e para determinar as condições adequadas de processamento. Os resultados obtidos com as técnicas espectrofotométricas consideradas simples mostraram ser confiáveis e aplicáveis ao estudo de processos de agregação e gelificação dos caseinatos.

A avaliação global do processo de agregação do caseinato revelou a existência de duas etapas e indicou que a compactação e o tamanho médio dos agregados formados dependem do tamanho inicial e da cinética durante o fenômeno de agregação. O estudo da agregação e gelificação do caseinato ovino induzida por glucono- δ -lactona definiu as condições experimentais de temperatura, concentração de caseinato e relação GDL/proteína a serem empregadas.

O caseinato ovino teve sua solubilidade afetada pela presença de cálcio e foi menos estável que o caseinato bovino, sendo observadas no caseinato ovino uma alta proporção de α - e β -caseína e menor fração de κ -caseína. O grau de compactação e a dureza dos géis de caseinato ovino foram dependentes da concentração de cálcio empregada.

A adição de sacarose e lactose ao caseinato ovino acarretou a formação de partículas coloidais com estrutura mais compacta e menor hidrofobicidade superficial, diferentes das observadas para o caseinato bovino. As concentrações de açúcares testadas não produziram mudanças nos parâmetros reológicos.

5. PERSPECTIVAS

As perspectivas de novos estudos estão baseadas nos resultados deste trabalho e na necessidade de aprofundamento em alguns temas:

- Estudo da produção de peptídeos bioativos pelas bactérias lácticas isoladas de leite de ovelha e queijo Fascal;
- Avaliação do efeito das bactérias lácticas sobre a estrutura da caseína ovina e a implicação sobre as propriedades funcionais da proteína;
- Avaliação da agregação e gelificação de caseinato ovino em presença do polissacarídeo carboximetilcelulose, parcialmente realizada até o momento;
- Produção de géis mistos de caseinato ovino em condições semelhantes às utilizadas na formulação de produtos lácteos, como sobremesas, coberturas e filmes comestíveis, e que possam ser extrapoladas para escala industrial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGADIR, W.S.; HAMAD, S.H.; MØLLER, P.L.; JAKOBSEN, M. Characterisation of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk Rob. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 11, p. 63-70, 2001.

ABENI, F.; DEGANI, L.; CALZA, F.; GIANGIACOMO R.; PIRLO G. Milk Quality and Automatic Milking: Fat Globule Size, Natural Creaming, and Lipolysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 10, p. 3519–3529, 2005.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALMEIDA, G.; FIGUEIREDO, A.; RÔLA, M.; BARROS, R.M.; GIBBS, P.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Microbiological Characterization of Randomly Selected Portuguese Raw Milk Cheeses with Reference to Food Safety. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 7, p. 1710-1716, 2007.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; GATTI, C.A.; ARMESTO, M.S.; BURGOS, M.; RELLING, V.M.N. Effects of citrate on the composition and enzymic coagulation of colloidal bovine casein aggregates. **Colloid and Polymer Science**, Berlim, v. 284, n. 9, p. 1016-1023, 2006.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; GATTI, C.A.; BURGOS, M.; SUAREZ SALA, V. Calcium-induced aggregation of bovine caseins: effect of phosphate and citrate. **Colloid and Polymer Science**, Berlim, v. 285, n. 5, p. 507-514, 2007.

ALVAREZ, E.M.; RISSO, P.H.; MANCILLA CANALES, M.A.; PIRES, M.S.; GATTI, C.A. Hydrodynamic properties–structure relationship for sodium caseinates in presence of calcium. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Nova Iorque, v. 327, p. 51-56, 2008.

ANDRADE, N.J.; SILVA, R.M.M.; BRABES, K.C.S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 3, p. 396-400, 2001.

ANTIPOVA, A.S.; SEMENOVA, M.G. Effect of Sucrose on the Thermodynamic Incompatibility of Different Biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 28, p. 359, 1995.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official Method of Analysis**. 17 ed. Washington: AOAC, 2000.

APHA. American Public Health Association. DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2002.

APHA. American Public Health Association. MARSHALL, R.T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

ARQUÉS, J.L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; GUAMIS, B.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 254-260, 2005.

AUGUSTO, M.M.M.; QUEIROZ, M.I.; VIOTTO, W.H. Seleção e treinamento de julgadores para avaliação do gosto amargo em queijo prato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 849-852, 2005.

AYHAN, K.; DURLU-ÖZKAYA, F.; TUNAIL, N. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **International Journal of Dairy Technology**, Cumbria, v. 58, n. 3, p. 150-165.

BARBOSA, M. The production and processing of sheep's milk in Portugal: Serra da Estrela cheese. **Options Méditerranéennes**, Paris, v. 12, n. A1, p. 97-102, 1990.

BARRETO, P.L.M.; ROEDER, J.; CRESPO, J.S.; MACIEL, G.R.; TERENCEZI, H.; PIRES, A.T.N.; SOLDI, V. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 82, p. 425-431, 2003.

BARROS, C.M.V.; CUNHA, C.R.; GALLINA, D.A.; VIOTTO, L.A.; VIOTTO, W.H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo prato light. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PALOMBA, M.; PASCALE, M.; NICOLUSSI, P.; PULINA, G. Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 9, p. 3063-3069, 2005.

BELYAKOVA, L.E.; ANTIPOVA, A.S.; SEMENOVA, M.G.; DICKINSON, E.; MERINO, L.M.; TSAPKINA, E.N. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Nova Iorque, v. 31, p. 31-46, 2003.

BINGHAM, E.W.; FARRELL, H.M.JR.; CARROLL, R.J. Properties of dephosphorylated α 1-casein. Precipitation by calcium ions and micelle formation. **Biochemistry**, Easton, v. 11, n. 13, p. 2450-2454, 1972.

BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; SIMEOLI, E.; ANDOLFI, R.; VILLANI, F.; COPPOLA, S. Monitoring lactic acid bacteria strains during "Caciocotta" cheese production by restriction endonuclease analysis and pulse-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, p. 139-144, 2001.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; SILVA, M.C.C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 545-550, 2006.

BORGES, C.H.P. **Custos de produção de leite de cabra na região Sudeste do Brasil**. In: Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, 1, 2003, Curitiba. Anais. João Pessoa, 2003. 15p.

BOUGUYON, E.; BEAUVALLET, C.; HUET, J.C.; CHANAT, E. Disulphide bonds in casein micelle from milk. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 343, p. 450-458, 2006.

BRAGA, A.L.M.; CUNHA, R.L. The effect of sucrose on unfrozen water and syneresis of acidified sodium caseinate-xanthan gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 36, p. 33-38, 2005.

BRAGA, A.L.M.; CUNHA, R.L. The effects of xanthan conformation and sucrose concentration on the rheological properties of acidified sodium caseinate-xanthan gels. **Food Hydrocolloids**, Raleigh, v. 18, p. 977-986, 2004.

BRAGA, A.L.M.; MENOSSI, M.; CUNHA, R.L. The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 389-398, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 37**, de 31/10/2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. *D.O.U.*, Brasília, 08/11/2000. Seção 1, p. 23.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 51**, de 18/09/2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *D.O.U.*, Brasília, 20/09/2002a. p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 62**, de 26/08/2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *D.O.U.*, Brasília, 18/09/2003. p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 68**, de 12/06/2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *D.O.U.*, Brasília, 14/12/2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Nº. 9279**, de 14/05/1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 15/05/1996a, Seção 1. p. 8353.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº. 146**, de 07/03/1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996b. p. 3977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº. 518**, 26/03/2004. Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano. *D.O.U.*, Brasília, 26/03/2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº. 12**, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. *D.O.U.*, Brasília, 02/01/2001. p. 1-54.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria Nº. 326**, de 30/07/1997. Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 01/08/1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº. 275**, de 21/10/2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23/10/2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº. 14**, de 28/02/2007. Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº. 50/06. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 05/03/2007.

BRITO, J.R.F.; SANTOS, E.M.P.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; SOUZA, G.N.; CERQUEIRA, M.M.P.O.; BELTRAN, J.M.S.; CALL, J.E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A.C.S.; LUCHANSKY, J.B. Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant To Establish Prevalence, Relatedness, and Sources of *Listeria monocytogenes*

Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, 2008.

BRITO, M.A.; GONZÁLEZ, F.D.; RIBEIRO, L.A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P.R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 137-144, 2004.

BRUINS, M.E.; CREUSOT, N.; GRUPPEN, H.; JANSSEN, A.E.M.; BOOM, R.M. Pressure-Aided Proteolysis of β -Casein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 5529-5534, 2009.

BRUM, J.V.F. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Indústria de Laticínios de Curitiba - PR**. 2004. 129 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BRYANT, C.M.; MCCLEMENTS, D.J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, Raleigh, v. 14, p. 383-390, 2000.

BUSETTI, M.R. La calidad en la leche de oveja. **Boletín de Divulgación Técnica INTA**, Buenos Aires, v. 90, p. 206-214, 2006.

BYNUM, D.G.; BARBANO, D.M. Whole milk reverse osmose retentates for Cheddar cheese manufacture: Chemical changes during aging. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, n. 1, p. 1-10, 1985.

CARIDI, A. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. **International Journal of Dairy Technology**, Cumbria, v. 56, n. 2, p. 105-110, 2003.

CASPER J.L.; WENDORFF W.L.; THOMAS D.L. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 3117-3122, 1998.

CAVALLI, S.V.; SILVA, S.V.; CIMINO, C.; XAVIER MALCATA, F.; PRIOLO, N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 106, p. 997-1003, 2008.

CE. Comunidade Européia. Regulamento Nº. 1829/2002, de 14 de outubro de 2002. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 15 out. 2002. 5p.

CODA, R.; BRECHANY, E.; DE ANGELIS, M.; DE CANDIA, S.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M. Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 11, p. 4126-4143, 2006.

COELHO, A.I.M.; MILAGRES, R.C.R.M.; MARTINS, J.F.L.; AZEREDO, R.M.C.; SANTANA, A.M.C. Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais. **Ciência e Saúde Coletiva** (Online), Rio de Janeiro, v. 12, n. 1-12, 2008.

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**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L.; SINDEREN, D.V. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 521-534, 2004.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.

CURCIO, S.; GABRIELE, D.; GIORDANO, V.; CALABRO, V.; CINDIO, B.; IORIO, G. A rheological approach to the study of concentrated milk clotting. **Rheologica Acta**, Dallas, v. 40, p. 154-161, 2001.

CURI, R.A.; BONASSI, I.A. elaboração de um queijo análogo ao Pecorino romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 171-176, 2007.

DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; TOSTI, N.; ROSSI, J.; CORBO, M.R.; GOBBETTI, M. Characterization of non-*starter* lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2011-2020, 2001.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tool for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.16, p. 1058-1071, 2006.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, Amsterdam, v. 38, Suppl. 2, p. S248-S255, 2006.

DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. Strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 309-319, 2004.

DICKINSON, E.; MATIA-MERINO, L. Effect of sugars on the rheological properties of acid caseinate-stabilized emulsion gels. **Food Hydrocolloids**, Raleigh, v. 16, n. 4, p. 321-331, 2002.

DIOP, M.B.; DUBOIS-DAUPHIN, R.; TINE, E.; NGOM, A.; DESTAIN, J.; THONART, P. Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Gembloux, v.11, n. 4, p. 275-281, 2007.

EL SODA M.; MADKOR S.A.; TONG P.S. Adjunct Cultures: Recent Developments and Potential Significance to the Cheese Industry. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 4, p. 609-619, 2000.

EMBRAPA – EMBRAPA GADO DE LEITE. **Estatísticas**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em 12 maio 2005.

EMMONS D.B.; DUBE C.; MODLER H.W. Transfer of Protein from Milk to Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 2, p. 469-485, 2003.

EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimataú Paraibano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 176-178, 1998.

FALLICO, V.; MCSWEENEY, P.H.L.; HORNE, J.; PEDILIGGIERI, C.; HANNON, J.A.; CARPINO, S.; LICITRA, G. Evaluation of Bitterness in Ragusano Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 4, p. 1288-1300, 2005.

FALLICO, V.; MCSWEENEY, P.H.L.; SIEBERT, K.J.; HORNE, J.; PEDILIGGIERI, C.; CARPINO, S.; LICITRA, G. Chemometric Analysis of Proteolysis During Ripening of Ragusano Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 10, p. 3138-3152, 2004.

FALLICO, V.; TUMINELLO, L.; PEDILIGGIERI, C.; HORNE, J.; CARPINO, S.; LICITRA, G. Proteolysis and Microstructure of Piacentinu Ennese Cheese Made Using Different Farm Technologies. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 1, p. 37-48, 2006.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada, 30 abr.-1maio, 2002. Disponível em: http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probio_en.stm. Acesso em: 28 jun. 2007.

FARRELL, H.M.Jr.; BROWN, E.M.; HOAGLAND, P.D.; MALIN, E.L. **The caseins of milk as calcium binding proteins**. In: VOGEL, H.J. Calcium binding proteins. Totowa: Humana Press, 2002. p. 97-140.

FARRELL, H.M.Jr.; BROWN, E.M.; KUMOSINSKI, T.F. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins. **Food Structure**, Chicago, v. 12, p. 235-250, 1993.

FARRELL, H.M.Jr.; KUMOSINSKI, T.F.; PULASKI, P.; THOMPSON, M.P. Calcium-induced associations of the caseins: a thermodynamic linkage

approach to precipitation and resolubilization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova Iorque, v. 265, n. 1, p. 146-58, 1988.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (Supl.), p. 162-165, 2003.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; VEIROS, C.; PINHO, O.; VELOSO, A.C.A.; PERES, A.M.; MENDONÇA, A. Casein Breakdown in Terrincho Ovine Cheese: Comparison with Bovine Cheese and with Bovine/Ovine Cheeses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 7, p. 2397-2407, 2006.

FLÓREZ, A.B.; DELGADO, S.; MAYO, B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 51-58, 2005.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P.L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, Nova Iorque, n. 20, p. 397-404, 2003.

FOX, P.F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 18, p. 677-684, 2008.

FREITAS, C.; MALCATA, F.X. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protegée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 3, p. 584-602, 2000.

FSAI. Food Safety Authority of Ireland. Information Note On Protected Designation Of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG). Dublin: Food Safety Authority of Ireland, 2003.

FSANZ. Food Standards Australia New Zealand. **Application A499**, 03/08/2005. To permit the sale of Roquefort cheese. Canberra, Australia / The Terrace, New Zealand: Food Standards Australia New Zealand, 2005.

GÄNZLE, M.G.; HÖLTZEL, A.; WALTER, J.; JUNG, G.; HAMMES, W.P. Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4325-4333, 2000.

GATTI, C.A.; PIRES, M.; ORELLANA, G.; PEREYRA, J. Kinetic evidence for steric destabilization of casein by rennet enzyme activity. **Journal of the Chemical Society**, Faraday Transactions, Londres, v. 92, p. 2575-2578, 1996.

GATTI, C.A.; ALVAREZ, E.M.; SUAREZ SALA, V. Effect of the Anion Citrate on the Mineral Composition of Artificial Casein Micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 1, p. 141-144, 1999.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 45, p. 473-483, 2005.

GAUCHERON, F.; LE GRAET, Y.; BOYAVAL, E.; PIOT, M. Binding of cations to casein molecules. Importance of physicochemical conditions. **Milchwissenschaft**, Saint Louis, v. 52, n. 6, p. 322-327, 1997.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYET, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S.; SWINGS, J. Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3560-3565, 2002.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYET, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S.; SWINGS, J. Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3560-3565, 2002.

GINGER, M.R.; GRIGOR, M.R. Comparative aspects of milk caseins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, Vancouver, v. 124, p. 133-145, 1999.

GLASS, K.; DOYLE, M.E. **Safety of Processed Cheese** – A Review of the Scientific Literature. Madyson: Food Research Institute, 2005.

GOBBETTI, M.; FOX, P.F., STEPANIAK, L. Isolation and Characterization of a Tributyrin Esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 12, p. 3099-3106, 1997.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A. Characterization of the inhibitors effects of *L. monocytogenes* Scott A produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 96, n. 538, p. 65-69, 2001.

GUERZONI, M.E.; VANNINI, L.; CHAVES LOPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of High Pressure Homogenization on Microbial and Chemico-Physical Characteristics of Goat Cheeses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n. 5, p. 851-862, 1999.

GUTIERREZ, E.M.R.; DOMARCO, R.E.; SPOTO, M.H.F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Efeito da radiação gama nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo prato durante a maturação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 596-601, 2004.

HAENLEIN, G.F.W. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 3-6, 2007.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and their Proteolytic and Lipolytic Traits. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

HASKARD, C.A.; LI-CHAN, E.C.Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS) fluorescent probes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 2671-2677, 1998.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 77-84, 2005.

HOLLAND, R.; COOLBEAR, T. Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* E8. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 63, n. 1, p. 131-140, 1996.

HOLO, H.; JEKNIC, Z.; DAESCHEL, M.; STEVANOVIC, S.; NES, I.F. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 643-651, 2001.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, Berlin, v. 33, n. 5, p. 421-434, 2004.

HOLT, C. The salts of milk and their interaction with casein. In: FOX, P.F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. v. 3. Lactose, water, salts and vitamins. London: Chapman & Hall, 1997. p. 233-253.

HORNE, D.S. Casein structure, self-assembly and gelation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 7, n. 5-6, p. 456-461, 2002.

HORNE, D.S. Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, London, v. 83, p. 259-270, 1987.

HORNE, D.S. The kinetics of the precipitation of chemically modified α s1-casein by calcium. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 265-293, 1979.

HUNT, C.; BURN, P.; ADAMEZUK, Z.C. Proximate composition and fat type of three popular take away meal. **International Journal of Food Science & Technology**, Glasgow, v. 22, n. 669-75, 1987.

HUSSEIN, H.S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 2, p. 450-465, 2005.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2008. 1018p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2006**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2008.

IDF. International Dairy Federation (IDF). 1993. **Standard Method 20B**: Milk. Determination of nitrogen content. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF. International Dairy Federation (IDF). 1997. **Standard Method 152A**: Milk and Milk Products. Determination of fat content (general guidance on the use of butyrometric methods). International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

ISSANCHOU, S.; SCHLICH, P.; LESSCHAEVE, I. Sensory analysis: methodological aspects relevant to the study of cheese. **Lait**, Rennes, v. 77, p. 5-12, 1997.

IZCO, J.M.; ORDÓÑEZ, A.I.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Validation of capillary electrophoresis in the analysis of ewe's milk casein. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 832, p. 239-246, 1999.

JAEGGI, J.J.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; BERGER, Y.M.; JOHNSON, M.E.; MCKUSICK, B.C.; THOMAS, D.L.; WENDORFF, W.L. Hard Ewe's Milk Cheese Manufactured from Milk of Three Different Groups of Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 10, p. 3082-3089, 2003.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 6 ed. Maryland: Aspen Publishers, 2000. 635 p.

JOHNSON-HENRY, K.C.; DONATO, K.A.; SHEN-TU, G.; GORDANPOUR, M.; SHERMAN, P.M. *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Prevents Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-Induced Changes in Epithelial Barrier Function. **Infection and Immunity**, Kansas City, v. 76, n. 4, p. 1340-1348, 2008.

KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 624, p. 13-20, 1980.

KATZ, M.; MEDINA, R.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria from ewe's milk and cheese. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 12, p. 1997-2001, 2002.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; (2002). VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, G.; MÜLLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 900-912, 2007.

KNOOP, A.M.; KNOOP, E.; WIECHEN, A. Sub-structure of synthetic casein micelles. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 347-350, 1990.

KOPPEL, D.E. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy. Method of cumulants. **Journal of Chemical Physics**, Chicago, v. 57, n. 11, p. 4814-4820, 1972.

KOROLCZUK, J. Voluminosity and viscosity of casein solutions. 1. The correlation between voluminosity, protein concentration and viscosity. **Milchwissenschaft**, Saint Louis, v. 36, p. 414, 1981.

KOURKOUTAS, Y.; KANDYLIS, P.; PANAS, P.; DOOLEY, J.S.G.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A.A. Evaluation of Freeze-Dried Kefir Coculture as Starter in Feta-Type Cheese Production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, n. 9, p. 6124-6135, 2006.

KUAYE, A.Y. An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 49, n. 2, p. 207-211, 1994.

KUCHROO, C.N.; FOX, P.F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. **Milchwissenschaft**, Saint Louis, v. 37, p. 331-335, 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAW, A.J.R. Effects of heat treatment and acidification on the dissociation of bovine casein micelles. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 63, p. 35-48, 1996.

LEAL-SÁNCHEZ, M.V.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J.L. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4465-4471, 2002.

LEITNER, G.; CHAFFER, M.; SHAMAY, A.; SHAPIRO, F.; MERIN, U.; ERZA, E.; SARAN, A.; SILANIKOVE, N. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Sheep. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 1, p. 46-52, 2004.

LEUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; FURTUNATO, D.M.N.; QUEIROGA, R.C.R.E. Caracterização físico-química do queijo de leite de cabra "tipo coalho" produzido artesanalmente. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 109, p. 75-80, 2003.

LINDE, A. **Calcium Metabolism in Dentinogenesis**. In: ANGHILERI, L.J.; TUFFET-ANGHILERI, A.M. (Eds). *The Role of Calcium in Biological Systems*. Boca Raton: CRC Press, 1982. v. 3.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1854-1857, 2003.

MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X.; OLLVELRA, J.C. The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese: A Review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 6, p. 1725-1739, 1993.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MACHADO, E.C.; FERREIRA, C.L.L.F.; FONSECA, L.M. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MADRAU, M.A.; MANGIA, N.P.; MURGIA, M.A.; SANNA, M.G.; GARAU, G.; LECCIS, L.; CAREDDA, M.; DEIANA, P. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of

physicochemical parameters during ripening. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 16, p. 876-885, 2006.

MARTEAU, P.; SHANAHAN, F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Berlin, v. 17, n. 5, p. 725-740, 2003.

MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**. 2 ed. Nova lorque: Marcel Dekker, 2001. 744 p.

MARTÍNEZ-CUESTA, M.C.; KOK, J.; HERRANZ, E.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T.; BUIST, G. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v 66, n. 8, p. 3174-3179, 2000.

MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LOPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI, G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 15, p. 571-578, 2005.

MASUI, K.; YAMADA, T. **French Cheeses**. Nova lorque: DK Pub, 1996. 240p.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. **Methods for studying bacteriocins**. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Eds.). *Methods in Microbiology*. Nova lorque: Academic Press, 1972. v. 7a. p. 313-342.

MCGANN, T.; DONNELLY, W.; KEARNEY, R.; BUCHHEIM, W. Composition and size distribution of bovine casein micelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 630, p. 261-270, 1980.

MENDIA, C.; IBAÑEZ, F.C.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Influence of the Season on Proteolysis and Sensory Characteristics of Idiazabal Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 9, p. 1899-1904, 2000.

MERCK. **Microbiology Manual 1996/97**. Darmstadt: Merck KGaA, 1996.

MOATSOU, G., SAMOLADA, M., KATSABEKI, A., ANIFANTAKIS, E. Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. **Lait**, Rennes, v. 84, p. 285-296, 2004.

MOATSOU, G.; MASSOURAS, T.; KANDARAKIS, I.; ANIFANTAKIS, E. Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. **Lait**, Rennes, v. 82, p. 601-611, 2002.

MORA-GUTIERREZ, A.; FARRELL, H.M., JR.; BASCH, J.J.; KUMOSINSKI, T.F. Modeling calcium-induced solubility in caprine milk caseins using a thermodynamic linkage approach. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 12, 3698-3710, 1993b.

MORA-GUTIERREZ, A.; FARRELL, H.M.JR.; KUMOSINSKI, T.F. Comparison of calcium-induced associations of bovine and caprine caseins and the relationship of as1-casein content to colloidal stabilization: a thermodynamic linkage analysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 12, p. 3690-3697, 1993a.

MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M.; FRILEUX, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 20-34, 2007.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 63-70, 2002.

MUCCHETTI G.; BONVINI B.; REMAGNI M.C.; GHIGLIETTI R.; LOCCI F.; BARZAGHI S.; O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. FRANCOLINO S.; PERRONE A.; RUBILONI A.; CAMPO P.; GATTI M.; CARMINATI D. Influence of cheese-making technology on composition and microbiological characteristics of Vastedda cheese. **Food Control**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 119-125, 2008.

MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; CORTI, S.; BLANCO, J.E.; STEPHAN, R. Microbiological Quality of Raw Goat's and Ewe's Bulk-Tank Milk in Switzerland. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 12, p. 3849-3856, 2003.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NEYSENS, P.; MESSENS, W.; GEVERS, D.; SWINGS, J. DE VUYST, L. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 1073-1082, 2003.

ONDA, T.; YANAGIDA, F.; TSUJI, M.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p. 162-168, 2003.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

PAAPE, M.J.; WIGGANS, G.R.; BANNERMAN, D.D.; THOMAS, D.L.; SANDERS, H.A.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R.H. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 73-87, 2007.

PARADA, J.L.; CARON, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PARK, Y.W. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 114-125, 2007.

PARK, Y.W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 88-113, 2007.

PARK, Y.W.; LEE, J.H.; LEE, S.J. Effects of Frozen and Refrigerated Storage on Organic Acid Profiles of Goat Milk Plain Soft and Monterey Jack Cheeses. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 89, p. 862-871, 2006.

PAVAN, S.; DESREUMAUX, P.; MERCENIER, A. Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 10, n. 4, p. 696-701, 2003.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. 2 ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996. v. 1.

PEREIRA, C.I.; GOMES, E.O.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 108, p. 862-868, 2008.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 64-69, 2006.

PINHO, O.; MENDES, E.; ALVES, M.M.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Chemical, Physical, and Sensorial Characteristics of “Terrincho” Ewe Cheese: Changes During Ripening and Intravarietal Comparison. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 2, p. 249-257, 2004.

PINTADO, A.I.E.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; PINTADO, M.M.E.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 18, p. 631-640, 2008.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrótróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PIRISI, A.G.; PIREDDA, M.; CORONA, M.; PES, S.; PINTUS, S.; LEDDA, A. Influence of somatic cell count on ewe's milk composition, cheese yield and cheese quality. Proc. Great Lakes Dairy Sheep Conference, 2000. In: JAEGGI, J.J.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; BERGER, Y.M.; JOHNSON, M.E.; MCKUSICK, B.C.; THOMAS, D.L.; WENDORFF, W.L. Hard Ewe's Milk Cheese Manufactured from Milk of Three Different Groups of Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 10, p. 3082-3089, 2003.

PITKOWSKI, A.; DURAND, D.; NICOLAI, T. Structure and dynamical mechanical properties of suspensions of sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 326, p. 96-102, 2008.

PRATA, L.F.; RIBEIRO, A.C.; REZENDE, K.T.; CARVALHO, M.R.B.; RIBEIRO, S.D.A.; COSTA, R.G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 428-432, 1998.

PUGNALONI, L.A.; MATIA-MERINO, L.; DICKINSON, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Nova Iorque, v. 42, p. 211-217, 2005.

RAMOS, M.; JUAREZ, M. (2003). **Sheep milk**. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Amsterdam: Academic Press, 2003. v. 4, p. 2539-2545.

RANK, T.C.; GRAPPIN, R.; OLSON, N.F. Secondary Proteolysis of Cheese During Ripening: A Review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, n. 4, p. 801-805, 1985.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCAR, P.; GUILLET, I.; CHILLIAR, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 57-72, 2008.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PARK, Y.W.; GAUCHERON, F.; BOUHALLAB, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 207-220, 2007a.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PIRISI, A.; CRÉMOUX, R.; GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 126-144, 2007b.

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M.R.; AMIGO, L.; MOLINA, E.; RAMOS, M. MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. Detection of Milk Mixtures in Halloumi Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 6, p. 1595-1600, 2004.

RISSO, P.H. **Estudio del Efecto de Modificaciones Estructurales de las Micelas de Caseína Bovina sobre la Estabilidad de las Mismas frente a la Coagulación Enzimática**. 2004. 209 f. Tese (Doutorado), Programa de Posgrado, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, 2004.

RISSO, P.H.; RELING, V.M.; ARMESTO, M.S.; PIRES, M.S.; GATTI, C.A. Effect of size, proteic composition, and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. **Colloid and Polymer Science**, Berlin, v. 285, n. 7, p. 1435-1536, 2007.

RIZZELLO C.G.; LOSITO I.; GOBBETTI M.; CARONARA T.; DE BARI M.D.; ZAMBONIN P.G. Antibacterial Activities of Peptides from the Water-Soluble Extracts of Italian Cheese Varieties. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 7, p. 2348-2360, 2005.

RODRÍGUEZ, E.; ARQUÉS, J.L.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, p. 131-137, 2001.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 10, p. 7-15, 2000.

ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V.C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005

ROQUEFORT Confederation. **The Roquefort Confederation**: Roquefort-sur-Soulzon. Internet user's guide (online). Disponível em: <http://www.roquefort.fr/gb/index.html>. Acesso 17 maio 2009.

RUIS, H.G.M.; VENEMA, P.; LINDEN, E. Relation between pH-induced stickiness and gelation behaviour of sodium caseinate aggregates as determined by light scattering and rheology. **Food Hydrocolloids**, Raleigh, v. 21, p. 545-554, 2007.

SÁ, C.O.; SIQUEIRA, E.R.; SÁ, J.S.; FERNANDES, S. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 601-608, 2005.

SABADINI, E.; HUBINGER, M.D.; CUNHA, R.L. The effects of sucrose on the mechanical properties of acid milk proteins- κ -carrageenan gels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 55-65, 2006.

SALLAMI L.; KHEADR E.E.; FLISS I.; VUILLEMARD J.C. Impact of Autolytic, Proteolytic, and Nisin-Producing Adjunct Cultures on Biochemical and Textural Properties of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 6, p. 1585-1594, 2004.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; VOS, W.M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MOGENSEN, G.; BIRKELAND, S.E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 93-106, 1998.

SALUSTIANO, V.C.; ANDRADE, N.J.; BRANDÃO, S.C.C.; AZEREDO, R.M.C.; LIMA, S.A.K. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 255-259, 2003.

SANZ SAMPELAYO, M.R.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.; BOZA, J. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 42-63, 2007.

SCHILLINGER, U., LUCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1901-1906, 1989.

SCHMIDT, D.G. Properties of artificial casein micelles. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 351-355, 1979.

SCHUSTER, C.; GONZALEZ, H.L.; BÜCHLE, J.; TIMM, C.D. Avaliação de equipamento alternativo para pasteurização lenta de leite previamente envasado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 828-831, 2006.

SCINTU M.F.; PIREDDA G. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 221-231, 2007.

SERRANO MOYANO, B.; GARZÓN SÍGLER, A.I.; GARRO, G.; CHIANESE, L.; MARTÍNEZ HENS, J. Variabilidad genética de caseínas en la raza ovina Merina. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 48, p. 197-206, 1999.

SHALICHEV, J., TANEV, G. Isolation, Purification, end Determination of Some Chemical and Physicochemical Characteristics of Sheep Alpha-s-Casein. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 6, n. 2, p. 171-176, 1972.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SIRAGUSA S.; DE ANGELIS M.; DI CAGNO R.; RIZZELLO C.G.; CODA R.; GOBBETTI M. Synthesis of γ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 22, p. 7283-7290, 2007.

SORIANO, V.E.; LONGINOS, M.G.; NAVARRETE, P.G.; FERNÁNDEZ, R.P. Identification and Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* Isolates from Mexico. **Avian Diseases**, Athens, v. 46, p. 686-690, 2002.

SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 11, n. 4-7, p. 327-345, 2001.

SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.; VAZ, C.M.S.; SOUZA, M.; CORRÊA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 1, p. 73-77, 2005.

SPADOTI, L.M.; MORENO, I. Peptídeos Bioativos de Produtos Lácteos. **Funcionais & Nutraceuticos**, São Paulo, n. 1, p. 26-38, 2008.

STUBBS, A.; ABUD, G.; BENCINI, R. **Dairy Sheep Manual - Farm Management Guidelines**. Kingston: RIRDC, 2009. 69 p.

SUÁREZ, V.H.; BUSETTI, M.R. Lechería Ovina en la Argentina. **Boletín de Divulgación Técnica INTA**, Buenos Aires, v. 90, p. 195-204, 2006.

SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. **Microbiological monitoring of the food processing environment**. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3 ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.

SWEARINGEN, P.A.; O'SULLIVAN, D.J.; WARTHESEN, J.J. Isolation, Characterization, and Influence of Native, Nonstarter Lactic Acid Bacteria on Cheddar Cheese Quality. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 1, p. 50-59, 2001.

TAVARIA, F.K.; SILVA FERREIRA, A.C.; XAVIER MALCATA, F. Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela Cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 12, p. 4064-4072, 2004.

TORODOV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria sp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 178-187, 2008.

TORODOV, S.D.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria.

Enzyme and Microbial Technology, Amsterdam, v. 36, n. 2-3, p. 318-326, 2005.

TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; LAENCINA, J.; LÓPEZ, M.B. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 71, 449-457, 2000.

UYSAL, H.; KILIC, S.; KAVAS, G.; AKBULUT, N.; KESENKAS, H. Some properties of set yoghurt made from caprine milk and bovine – caprine milk mixtures fortified by ultrafiltration or the addition of skim milk powder. **International Journal of Dairy Technology**, Cumbria, v. 56, n. 3, p. 177-182, 2003.

VAN DIJK, H.J.M. The properties of casein micelles. 1. The nature of the micellar calcium phosphate. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 65-81, 1990a.

VAN DIJK, H.J.M. The properties of casein micelles. 2. Formation and degradation of the micellar calcium phosphate. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 111-124, 1990b.

VAN DIJK, H.J.M. The properties of casein micelles. 6. Behaviour above pH 9 and implications for the micelle model. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 46, p. 101-113, 1992.

VASBINDER, A.J.; ROLLEMA, H.S.; DE KRUIF, C.G. Impaired Rennetability of Heated Milk; Study of Enzymatic Hydrolysis and Gelation Kinetics. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 5, p. 1548-1555, 2003.

VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUIBERT, J.M.; HUARD, C.; PÉPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, London, v. 96, p. 69-79, 2003.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.; FERREIRA, M.A. Metodologias de Doseamento das Proteínas do Leite. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, n. 69, p. 17-31, 2001.

VIVEGNIS, J.; DUBOIS, C.; NICOLAY, L.; MAIRY, F.; JACOB, C.; PIRAUX, E.; EL LIOUI, M.; DECALLONNE, J. Microbiological quality of craft raw milk cheeses produced in Wallonia. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Gembloux, v. 2, n. 4, p. 248-255, 1998.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. (Eds). **Dairy Chemistry and Physics**. Nova Iorque: Wiley, 1984. p 93-97.

WALSTRA, P.; VLIET, T. The physical chemistry of curd making. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 40, p. 241-259, 1986.

WAUGH, D.F.; SLATTERY, C.W.; CREAMER, L.K. Binding of cations to caseins. Site binding, Donnan binding, and system characteristics. **Biochemistry**, Easton, v. 10, n. 5, p. 817-823, 1971.

WEST, D.W. Structure and function of the phosphorylated residues of casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, p. 333-352, 1986.

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The determination of citric acid in milk and milk serum. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 30, p. 171-189, 1963.

WONG, D.W.S.; CAMIRAND, W.M.; PAVLATH, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

WYMAN, J. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. **Advances in Protein Chemistry**, Amsterdam, v. 19, p. 223-86, 1964.

YAMAKI, M.; BERRUGA, M.I.; ALTHAUS, R.L.; MOLINA, M.P.; MOLINA, A. Occurrence of Antibiotic Residues in Milk from Manchega Ewe Dairy Farms. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 10, p. 3132-3137, 2004.

YAMATO, M.; OZAKI, K.; OTA, F. Partial purification and Characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, n. 2, p. 169-172, 2003.

YUICHI, A.; TETSURO, N.; CHIE, M.; AKIRA, O. Infantile Botulism Caused by *Clostridium butyricum* Type E Toxin. **Pediatric Neurology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 55-57, 2008.

ZHAO, S.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.; SINGH, R.; FOLEY, S.L.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; DONKAR, T.; BOLIN, C.; MUNRO, S.; BARON, E.J.; WALKER, R.D. Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals. **Journal of Clinical Microbiology**, Birmingham, v. 41, n. 12, p. 5366-5371, 2003.