

Artigo Técnico**EFEITO DA NISINA NA CONTAGEM DE *LACTOCOCCUS* E *LACTOBACILLUS* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DE ARAXÁ – MG****Effect of nisin in *Lactococcus* and *Lactobacillus* counts in artisanal Minas cheese of Araxá region – Minas Gerais state – Brazil**

Denise SOBRAL^{1*}
Vanessa Aglaê Martins TEODORO²
Maximiliano Soares PINTO³
Gisela de Magalhães MACHADO⁴
Renata Golin Bueno COSTA⁵
Antônio Fernandes de CARVALHO⁶

RESUMO

Os queijos Minas artesanais da região de Araxá são produzidos nos municípios de Araxá, Campos Altos, Ibiá, Pedrinópolis, Perdizes, Sacramento, Santa Juliana, Uberaba, Conquista, Pratinha e Tapira. Estes queijos, por serem fabricados com leite cru e serem bastante manipulados, podem veicular micro-organismos patogênicos, provenientes do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais são submetidos. A nisina pode auxiliar na redução da contaminação destes queijos, aliada às boas práticas de fabricação e de obtenção do leite e é um produto de fácil utilização. A bacteriocina atua contra bactérias Gram positivas, sendo algumas delas patogênicas, como o *Staphylococcus aureus*. No entanto, a nisina também pode inibir as bactérias lácticas, dependendo da dose utilizada na fabricação de queijos e, conseqüentemente, pode prejudicar as características sensoriais desejadas no queijo artesanal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de nisina sobre o comportamento de dois grupos de bactérias lácticas, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, em queijo Minas artesanal da região de Araxá, durante o período de 60 dias de maturação. O resultado da pesquisa foi satisfatório, pois se verificou que a nisina não interferiu na multiplicação destes micro-organismos ao longo da maturação dos queijos Minas artesanais da região de Araxá.

Palavras-chave: microbiologia; bacteriocina; maturação.

- 1 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Professora e pesquisadora no Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. E-mail: denisesobral@epamig.br
 - 2 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Professora e pesquisadora no Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. E-mail: vanessa.teodoro@epamig.br
 - 3 Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Professor na Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: maxonze@yahoo.com.br
 - 4 Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados. Professora e pesquisadora no Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. E-mail: giselammachado@epamig.br
 - 5 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Professora e pesquisadora no Instituto de Laticínios Cândido Tostes - EPAMIG, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. E-mail: Renata.costa@epamig.br
 - 6 Doutor em Sciences et Techniques des Industries Agricoles et Alimentaire. Professor do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Email: antoniofernandes@ufv.br
- * Autor para correspondência: Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG. Rua Tenente Luiz de Freitas 116, bairro Santa Terezinha, Juiz de Fora Minas Gerais, Brasil. CEP 36045-560 E-mail: denisesobral@epamig.br

Recebido / Received: 01/11/2012
Aprovado / Approved: 18/02/2013

ABSTRACT

The Minas artisanal cheeses from Araxá region are produced in Araxá, Campos Altos, Ibiá, Pedrinópolis, Perdizes, Sacramento, Santa Juliana, Uberaba, Conquista, Pratinha e Tapira cities. These cheeses are made from raw milk and they are fairly handled, so they can carry pathogenic micro-organisms, from the milk itself and also from the hygienic and sanitary conditions to which they are subjected. Nisin can adjuvant to reduce the contamination of these cheeses, combined with good manufacturing practices to getting the milk and is a product easy to use. Nisin acts against Gram positive bacteria, some of which are pathogenic, such as *Staphylococcus aureus*. However, nisin can also inhibit the lactic acid bacteria, depending on the dose used in cheese manufacture and can consequently affect the desired sensory characteristics of the cheese artisan. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of adding different concentrations of nisin on the behavior of two groups of lactic acid bacteria, *Lactobacillus* and *Lactococcus*, in Minas artisanal cheese from Araxá region, during the 60 days of ripening. The search result was satisfactory because it was found that nisin not interfere with the multiplication of *Lactobacillus* and *Lactococcus* along the cheese ripening of Minas artisanal from Araxá region.

Keywords: microbiology; bacteriocin; ripening.

1 INTRODUÇÃO

Minas Gerais destaca-se como maior e mais importante produtor de queijos artesanais do Brasil. São 9.445 produtores, pertencentes a cinco regiões tradicionais caracterizadas: Serra da Canastra, Serro, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes, que produzem anualmente 29.005 mil toneladas de queijo, gerando 26.792 empregos diretos (EMATER, 2012).

A região de Araxá está localizada no Planalto de Araxá, integrando a região do Alto Paranaíba, no sudoeste do Estado de Minas Gerais. Suas terras formaram, no passado, um amplo território estabelecido como um dos primeiros núcleos de ocupação colonial que incluía, ainda, o chamado Triângulo Mineiro. Araxá nasceu como fruto da atuação dos criadores de gado e dos tropeiros na lida diária em busca da sobrevivência (EMATER, 2003). A produção anual de queijo Minas artesanal de Araxá chega a 11.000 toneladas, colocadas no mercado por 1.136 propriedades, gerando cerca de 2.840 empregos diretos (EMATER, 2003).

O queijo Minas artesanal valoriza as tradições e as raízes da cultura mineira e tem sido objeto de pesquisa devido, também, a sua importância econômica e social. No entanto, existe uma preocupação com a inocuidade e com a qualidade do queijo artesanal, produzido com leite cru e, por este motivo, passível de veicular micro-organismos patogênicos como *S. aureus*, caracterizando um risco para a população.

A presença de *Staphylococcus* em queijos artesanais pode estar associada à intensa e inadequada manipulação durante o processo de fabricação e ao alto índice de mastite. Diversos estudos (BORELLI et al., 2011, PINTO et al., 2011, BRANT et al, 2007; BORELLI et al., 2006) comprovam a presença de *S. aureus* em queijos artesanais mineiros, em níveis suficientes para a produção de enterotoxinas. Esta preocupação desperta o interesse para o uso de novas

tecnologias como a bioconservação de alimentos e para a obtenção de queijos artesanais seguros para o consumo. A técnica é utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de bacteriocinas, ou seja, proteínas ou peptídeos antimicrobianos capazes de inibir ou reduzir a multiplicação de bactérias Gram-positivas (MELO et al., 2005).

A nisina é a bacteriocina mais conhecida, sendo aprovada para utilização em alimentos há mais de 50 anos, em vários países. O uso de nisina é permitido com limite de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final para todos os tipos de queijos no Brasil e é considerada uma substância GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo comitê do Codex Alimentarius da FAO – Food and Agriculture Organization (MORENO et al., 2008; MELO et al., 2005).

No entanto, a nisina também pode inibir as bactérias lácticas, desejáveis no processo de fabricação de queijos. As bactérias lácticas são constituídas por um grupo heterogêneo de bacilos e cocos, produtores de ácido láctico, microaerófilos, Gram-positivos e catalase negativos. Possuem a função de produzir ácido láctico a partir da lactose e causar mudanças bioquímicas no queijo por meio de suas enzimas durante a maturação, determinando as características de sabor e aroma (GARCÍA-CAYUELA et al., 2012; McSWEENEY, 2004; FOX et al, 2004), portanto, neste estudo, é desejável que a nisina não iniba o desenvolvimento de tais bactérias.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de nisina sobre o comportamento de 2 grupos de bactérias lácticas, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, em queijo Minas artesanal da região de Araxá durante a maturação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A fabricação dos queijos foi conduzida em

unidades produtoras de queijo artesanal na região de Araxá-MG e as análises de leite e da massa foram realizadas no laboratório de microbiologia do Laticínio Dona Beija, na cidade de Araxá-MG. As análises microbiológicas dos queijos durante a maturação foram conduzidas nos laboratórios de pesquisa do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora – MG.

Foram realizadas análises de bactérias lácticas do leite utilizado na fabricação dos queijos, bem como da massa, obtida após coagulação do leite pelo coalho e pelo fermento endógeno e dos queijos nos tempos 03, 07, 14, 30, 45 e 60 dias após a fabricação. Os queijos foram maturados em temperatura ambiente, por 60 dias, conforme exigido na legislação para queijos produzidos com leite cru.

As contagens de bactérias lácticas (*Lactococcus* e *Lactobacillus*) foram realizadas utilizando-se a metodologia descrita por Silva et al. (2010). Utilizou-se ágar deMan, Rogosa& Sharpe (MRS – OxoidLtd. Basingstoke, England) para a contagem de *Lactobacillus* spp. e ágar M17 (HIMEDIA®) para a contagem de *Lactococcus* spp. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. As colônias foram contadas e a identificação bioquímica de confirmação realizada por meio de coloração de Gram e catalase para uma amostragem de 03 colônias por placa. O preparo das amostras e as diluições necessárias foram feitas de conforme descrito na Instrução Normativa nº 62, de 18 de setembro de 2003 (BRASIL, 2003).

O experimento foi realizado em três repetições e três tratamentos: controle (sem adição de nisina) e tratados com duas concentrações diferentes de nisina (100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹), definidas em teste prévio (dados não publicados) e 6 tempos de maturação.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa MINITAB, versão 14 (MINITABTMSTATISTICAL SOFTWARE, 2003), sendo os resultados submetidos ao Teste de Normalidade de Ryan-Joiner ($p < 0,05$), análise de variância (ANOVA), Teste de Kruskal-Wallis (para dados não paramétricos), comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) e análise de regressão, de acordo com a necessidade. As contagens de bactérias foram convertidas em log₁₀ para análise estatística dos dados.

A nisina foi adicionada diretamente ao leite durante o processo de fabricação do queijo Minas artesanal (Figura 1), em quantidade necessária para que atingisse as concentrações escolhidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem de bactérias lácticas no leite e na massa

Foram analisadas amostras do leite quanto à contagem de bactérias lácticas, com o intuito de verificar se as contagens iniciais eram semelhantes para os diferentes tratamentos. Para minimizar as diferenças, trabalhou-se com o leite da mesma ordenha, para as diferentes fabricações de queijos artesanais com e sem nisina, em uma mesma propriedade.

A finalidade da contagem de bactérias lácticas na massa foi verificar se haveria inibição destas bactérias em função da adição de nisina no leite nas primeiras horas de fabricação.

A Tabela 1 mostra as contagens de bactérias lácticas para o leite e a massa durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

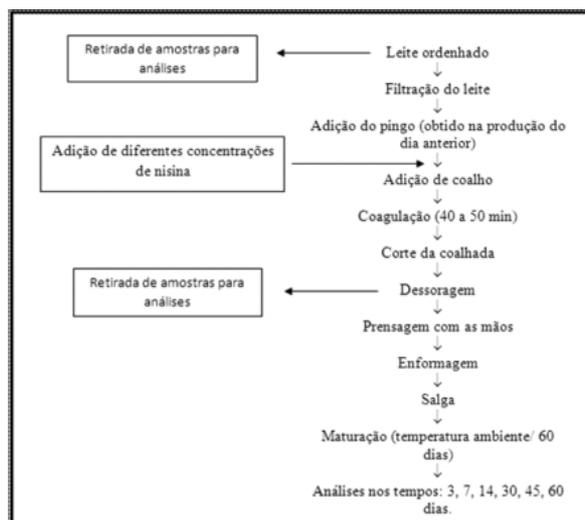


Figura 1 – Fluxograma de fabricação de Queijo Minas Artesanal de Araxá com adição de nisina.

Tabela 1 – Contagens médias de bactérias lácticas do leite e da massa, em função das diferentes doses de nisina adicionadas durante o processo de fabricação dos queijos artesanais.

Nisina (UI.mL ⁻¹)	Bactérias lácticas	
	Leite Log UFC.mL ⁻¹	Massa Log UFC.g ⁻¹
0	1,937 ^a	4,300 ^a
100	2,070 ^a	3,013 ^a
400	2,890 ^a	2,433 ^a

* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si (p ≥ 0,05), pelo teste de Tukey em cada coluna separadamente.

Tanto para as amostras de leite e quanto para as amostras de massa não houve diferença significativa (p ≥ 0,05) entre as amostras avaliadas, conforme apresentado na Tabela 1.

Como esperado, a contagem de bactérias lácticas no leite foi estatisticamente igual ao nível de 5% de significância (p ≥ 0,05) para os diferentes tratamentos. Isto demonstra que efeitos posteriores na contagem de bactérias lácticas podem ser justificados devido à concentração de nisina adicionada e não à contagem inicial encontrado no leite dos diferentes tratamentos.

Em relação à massa, apesar da tendência de redução nas contagens de bactérias lácticas, em função da adição de nisina, não houve diferença (p > 0,05) para todos os tratamentos.

Resultado distinto ao do presente trabalho ocorreu em um estudo realizado por Pinto et al. (2011) com queijos artesanais do Serrão com diferentes concentrações de nisina. Observou-se um maior do número de bactérias lácticas na massa com nisina em relação à massa do grupo-controle (sem adição de nisina), comprovando efeito inibitório da bacteriocina nas primeiras horas de fabricação (PINTO et al., 2011).

Teodoro (2012) também verificou diferença significativa (p < 0,05) nas contagens de bactérias lácticas da massa de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra. A massa adicionada de 500 UI.mL⁻¹ de nisina foi significativamente (p < 0,05) menor que a do controle, porém, sem diferir do tratamento com 100 UI.mL⁻¹ de nisina (p ≥ 0,05). As contagens do controle e do tratamento com dose de 100 UI.mL⁻¹ também não diferiram entre si (p ≥ 0,05).

Tais disparidades do efeito da nisina em estudos semelhantes podem ocorrer devido à sensibilidade diferente à nisina pelas estirpes de bactérias lácticas de cada região produtora de queijo artesanal. Estes estudos comprovam que as estirpes de bactérias lácticas do Serrão e Canastra são mais sensíveis à nisina (PINTO et al., 2011), se comparadas as estirpes da região de Araxá do presente estudo.

Contagem de *Lactobacillus* nos queijos ao longo da maturação

As contagens de *Lactobacillus* dos queijos artesanais de Araxá estão apresentadas na Figura 2.

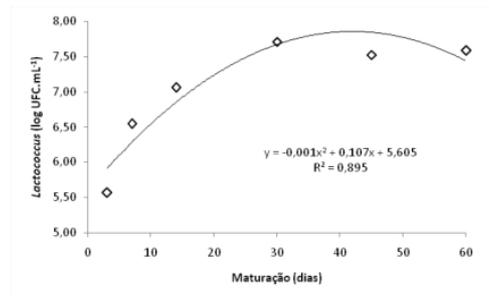


Figura 2 – Média das contagens de *Lactobacillus* dos queijos artesanais fabricados com diferentes concentrações de nisina, ao longo dos 60 dias de maturação.

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina em relação à contagem de *Lactobacillus* (p ≥ 0,05) nos queijos artesanais, mas houve efeito nos tempos de maturação (p < 0,05) (Figura 2).

Em um estudo realizado por Andrade et al. (2006), na análise microscópica e de coloração de Gram de bactérias lácticas isoladas de queijo artesanal Serrano, aproximadamente 95% das lâminas continham bacilos de diferentes tamanhos, formas e arranjos. Os 5% restantes eram cocos, também Gram-positivos. Em outro estudo (LIMA et al., 2009) comprovou-se que as bactérias lácticas mais frequentes e suas respectivas contagens em queijos artesanais da região do Cerrado foram: *Lactococcus lactis* (6,88 log UFC.g⁻¹), *Enterococcus spp.* (7,30 log UFC.g⁻¹), *Enterococcus faecalis* (5,40 log UFC.g⁻¹) e *Streptococcus agalactiae* (6,30 log UFC.g⁻¹), onde verifica-se a predominância de cocos em relação a bacilos (LIMA et al., 2009).

Em um estudo realizado por Kykkidou et al. (2007), foi comprovado que diferentes concentrações de nisina (0, 50 e 150 IU g⁻¹) afetaram a contagem de *Lactobacillus* em queijo Galotyri. A contagem de *Lactobacillus* decresceu até 21 dias de maturação e após esta data a população aumentou, sendo que quanto maior a concentração de nisina, menor a população de lactobacilos. Este resultado diverge do presente estudo, pois, por se tratar de um queijo ácido (Galotyri), esta acidez pode ter auxiliado positivamente no efeito bactericida da nisina sobre as bactérias lácticas do queijo, o que não ocorreu nos queijos artesanais de Araxá.

Em um estudo realizado por Aly e colaboradores (2012) foi avaliada a eficácia da nisina contra a *Lactobacillus sakei* em queijos modelo fabricados com

leite ultrafiltrado. A medição da perda de viabilidade de *Lb. sakei* foi um indicador indireto da eficácia da nisina *in situ*. Após 24 h, a perda de viabilidade de *Lb. sakei* foi de $0,73 \pm 0,14$ a $3,30 \pm 0,60$ log UFC.g⁻¹ nos queijos com 0 e 10% de gelatina, respectivamente, indicando uma melhor na eficácia *in situ* de nisina quando a gelatina foi incorporada (Aly et al., 2012).

Segundo estudo realizado por Al-Holy et al. (2012), a combinação nisina e calor (63 °C/5 min) pode ser utilizada como uma barreira que impede a multiplicação de *Listeria* em queijo branco, especialmente sob temperatura de refrigeração (10°C e 4°C).

Contagem de *Lactococcus* nos queijos ao longo da maturação

Não houve efeito significativo das concentrações de nisina, do tempo e da interação do tempo e concentrações de nisina em relação às contagens de *Lactococcus* ($p \geq 0,05$) nos queijos artesanais.

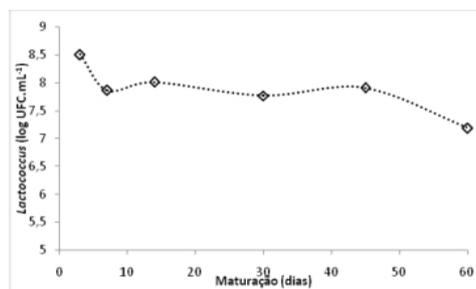


Figura 3 – Média das contagens de *Lactococcus* dos queijos artesanais ao longo dos 60 dias de maturação fabricados com diferentes concentrações de nisina.

O resultado demonstrado na Figura 3 pode ser considerado satisfatório, pois significa que não houve efeito bactericida da nisina em relação à contagem de *Lactococcus* e a contagem desta bactéria se manteve constante ao longo da maturação. Estes micro-organismos podem influenciar positivamente na proteólise do queijo e consequentemente nas características de textura e sabor (BACHMANN et al., 1996), por isso não devem ser influenciados pela nisina adicionada.

Em estudo realizado com *Lactococcus* selvagens na fabricação de queijos, uma avaliação sensorial revelou que estas estirpes geralmente produzem sabores específicos distintos daqueles produzidos por cepas industriais (AYAD et al., 1999). Neste mesmo estudo, a análise de compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa mostrou que várias estirpes selvagens produziram níveis relativamente elevados de álcoois primários ramificados e aldeídos nestes sistemas

modelo. Estes compostos, provavelmente provenientes da degradação de aminoácidos, influenciaram positivamente na avaliação sensorial.

Em um estudo com queijo Galotyri (KYKKIDOU et al., 2007), foi comprovado que diferentes concentrações de nisina (0, 50 e 150 IU g⁻¹) afetaram as contagens de *Lactococcus* somente após 14 dias de maturação, e que quanto maior a dose de nisina, menor a população destes micro-organismos, divergindo do presente estudo, onde a nisina não afetou sua multiplicação. Tal fato pode ocorrer, pois o queijo Galotyri é um queijo mais ácido que o queijo artesanal de Araxá e a nisina é mais ativa em condições ácidas (MELO et al., 2005).

Teodoro (2012), em estudo realizado com bactérias lácticas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra adicionado de nisina, não observou efeito significativo de tratamento, nem interação entre os fatores tratamentos (doses de nisina) e tempos de maturação ($p \geq 0,05$), porém, houve efeito significativo de tempo, isoladamente ($p < 0,01$). A contagem de bactérias lácticas para os diferentes tratamentos apresentou tendência de redução com o tempo de maturação ($p < 0,01$).

Borelli (2002) encontrou alta contagem populacional de bactérias lácticas (entre 10^8 a 10^9 UFC.g⁻¹) no queijo Canastra. Andrade et al. (2006) obtiveram contagens de bactérias lácticas que variaram de 2.10^2 a $5,35.10^8$ UFC.g⁻¹ em queijo artesanal Serrano. A microbiota específica local é responsável pelas características do queijo artesanal de cada região (LIMA et al., 2009) e por isso deve ser mantida.

Pinto et al. (2011) verificaram que diferentes concentrações de nisina interferiram significativamente ($p < 0,05$) nas contagens de bactérias lácticas na massa e queijo nos tempos 7, 14 e 30 dias. O controle apresentou as maiores médias destes micro-organismos e o queijo tratado com a maior dose de nisina apresentou a menor média. Nos tempos 45 e 60 dias, o controle apresentou maior média ($p < 0,05$) do que os queijos tratados com nisina, que, por sua vez, não diferiram entre si ($p \geq 0,05$), diferindo do presente estudo, onde a nisina não afetou a contagem de bactérias lácticas (*Lactococcus* + *Lactobacillus*) no queijo ao longo da maturação. Este resultado demonstra que as bactérias lácticas de diferentes regiões mineiras, comportam-se de maneira distinta em relação à aplicação de nisina, sendo mais ou menos resistentes de acordo com a região de origem.

4 CONCLUSÕES

As doses de nisina deste estudo empregadas na fabricação dos queijos Minas artesanais de Araxá não influenciaram nas contagens de *Lactococcus* e *Lactobacillus* ao longo da maturação. A contagem de *Lactobacillus* aumentou ao longo da maturação dos queijos, independente da adição da nisina, enquanto a contagem de *Lactococcus* se manteve constante. Este

resultado demonstra que as doses de 100 UI.mL⁻¹ e 400 UI.mL⁻¹ de nisina não reduziram a multiplicação de bactérias lácticas e espera-se que os queijos fabricados com estas dosagens, mantenham as características sensoriais se comparados ao queijo controle.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa e concessão das bolsas PCRH e PIBIC. À EMATER e ao IMA pelo apoio na pesquisa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HOLY, M. A. et al. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. **Food Control**, Oxford, v. 23, p. 48-53, 2012.
- ANDRADE, C. C. P. et al. Estudo de bactérias lácticas na produção de queijo Serrano. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. Anais eletrônicos... São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_3563.html>. Acesso em: 23 mar. 2012.
- AYAD, E. H. E. et al. Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, n.10, p. 725-735, 1999.
- ALY, S. et al. The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses. **Food Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 185-190, 2012.
- BACHMANN, H. P. et al. Experimental designs for studying the influence of the raw milk flora cheese characteristics: a review. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, n. 49, n.2, p. 53-56, 1996.
- BORELLI, B. M. et al. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.2, p.481-487, 2011.
- _____; et al. Enterotoxigenic of *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n. 4, p. 545-550, 2006.
- BRANT, L. M. F. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa no 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.
- EMPRESA DE ASSISTENCIA TECNICA E EXTENSAO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER-MG). **Programa Queijo Minas Artesanal/Mapa do Queijo**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/MAPA_QUEIJO/mapa%20do%20araxa.doc>. Acesso em: 23 mar. 2012.
- _____. **Caracterização da Microrregião de Araxá como produtora de Queijo Minas Artesanal**. Araxá. 2003. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20canastra.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2012.
- FOX, P. F. et al. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, 2004. vol.1, 617 p.
- GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.159, n. 3, p. 207-213, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>, 2012.
- KYKIDOU, S. et al. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4°C. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 17, n.10, p. 1254-1258, 2007.
- LIMA, C.D.L.C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.1, p.266-272, 2009.
- McSWEENEY, P. L. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v.57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.
- MELO, R. N. et al. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 52, n. 303, p. 321-338, 2005.
- MINITAB, Meet MINITAB 14 (VERSÃO EM Português), MINITAB Sataguide, MINITAB Help. Minitab release 14.1- Statistical Software. Minitab Inc., 2003.
- MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F. F. **Bacteriocinas de bactérias lácticas: utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm>. Acesso em: 22 mar. 2011.
- PINTO, M. S. et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 21, n.2, p. 90-96, 2011.
- SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 617 p.
- TEODORO, V. A. M. **Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG**. 2012. 138f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2012.