



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ANA AMÉLIA MARTINS DE QUEIROZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM  
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO NO  
CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2008**

**ANA AMÉLIA MARTINS DE QUEIROZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM  
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO NO  
CEARÁ**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração: Microbiologia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Co-orientadora: Dra. Laura Maria Bruno

FORTALEZA - CE  
2008

Q42c Queiroz, Ana Amélia Martins de  
Caracterização molecular de bactérias ácido láticas com potencial tecnológico para produção de queijo de coalho no Ceará / Ana Amélia Martins de Queiroz, 2008.  
53 f. ;il. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo  
Co-Orientadora: Dra. Laura Maria Bruno  
Área de concentração: Microbiologia de Alimentos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2008.

1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 2. Lactococcus 3. Lactobacillus I.Figueiredo, Evânia Altina Teixeira (orient.) II. Bruno, Laura Maria (co-orient.) III.Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos IV.Título

CDD 664

**ANA AMÉLIA MARTINS DE QUEIROZ**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS COM  
POTENCIAL TECNOLÓGICO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO NO  
CEARÁ**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 06 / 06 / 2008

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientador)**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Dra. Laura Maria Bruno (Co-Orientador)**  
**Embrapa Agroindústria Tropical - CE**

---

**Dra. Maria de Fátima Borges**  
**Embrapa Agroindústria Tropical - CE**

---

**Prof. Dra. Juliane Döering Gasparin Carvalho**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

---

**Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

**À Deus pela força concedida para  
a realização deste trabalho**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização deste curso;

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, pelos ensinamentos durante o curso;

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo suporte de laboratórios, material e equipamentos;

À minha família pelo amor, carinho e incentivo nas minhas escolhas;

À Profa. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo pela orientação e confiança;

À Dra. Laura Maria Bruno pela orientação, confiança, amizade, incentivo e apoio não só na realização deste trabalho como em toda minha vida acadêmica e pessoal;

À Dra. Maria de Fátima Borges pela amizade, disponibilidade e constante incentivo permitindo que isso tudo fosse possível;

À Dra. Juliane Doering pela amizade e pela possibilidade de realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro pela participação na banca trazendo enriquecimento a este trabalho.

À Dra. Patrícia Bordallo pela enorme atenção, pelos ensinamentos, colaboração e sugestões apresentadas nesta pesquisa;

Ao Laboratório de Genética (NUGEN) / UECE pelo auxílio no decorrer das análises;

Às estagiárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical pelo apoio e agradável convivência, facilitando a execução deste trabalho, transformando as dificuldades encontradas no dia a dia em momentos prazerosos e alegres;

À Ana Karine pelo auxílio no decorrer das análises de laboratório;

Aos estagiários do laboratório de Biologia Molecular pela paciência e auxílio nas análises;

Aos amigos e colegas do mestrado pelo convívio e troca de experiência durante esta caminhada.

Ao Fabrício, pelo amor, companheirismo, apoio e incentivo;

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pela concessão da bolsa;

À todos que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste trabalho.

## RESUMO

Queijo de Coalho é um dos produtos lácteos mais consumidos no Nordeste do Brasil. No estado do Ceará, sua produção é considerada tradicional e apresenta bastante significância econômica e social. O queijo de Coalho é tradicionalmente feito com leite cru, o que representa um risco em potencial para a saúde do consumidor, devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos. O processo de pasteurização do leite, além de destruir os microrganismos patogênicos, reduz também as bactérias ácido lácticas (BAL) que são os microrganismos responsáveis pelas propriedades sensoriais dos alimentos fermentados. Além do mais, a substituição das BAL endógenas por fermento láctico comercial tem levado a perdas nas propriedades sensoriais do queijo. Este trabalho teve por objetivo identificar, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), BAL dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, previamente identificadas bioquimicamente, isoladas de leite, massa de queijo e queijos de Coalho artesanais produzidos no estado do Ceará. Os 44 isolados selecionados apresentavam propriedades tecnológicas de interesse para fabricação de queijo de Coalho como: capacidade de acidificar o leite, baixa atividade proteolítica, capacidade de produção de aroma e capacidade de tolerância ao NaCl na concentração de 3%. As PCR identificaram 20,4% dos isolados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e 27,3% como *Lactobacillus paracasei*. Nenhum isolado de *Lactobacillus plantarum* teve sua identificação confirmada pela técnica molecular. Ao todo, 47,7% dos isolados foram confirmados pela PCR, assegurando que estes microrganismos podem ser usados na fabricação de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado, mantendo as características sensoriais típicas deste produto. Este estudo mostra a importância da implantação de técnicas moleculares aumentando a qualidade e a eficiência na identificação de microrganismos.

Palavras-chave: queijo de Coalho, bactérias ácido lácticas, reação em cadeia da polimerase (PCR).

## ABSTRACT

Coalho Cheese is one of the dairy products more consumed in Northeast of Brazil. In Ceará state, its fabrication is traditional and has social and economic importance. Traditionally, it is made with raw milk, which represents potential risk for consumers health due to the possibility of foodborne pathogens transmission. The milk pasteurization process eliminates pathogenic microorganisms, but also reduces the lactic acid bacterias (LAB) – the microorganism responsible for sensorial characteristics of fermented foods. Moreover, the substitution of indigenous LAB by commercial lactic ferment has led to losses in the sensorial properties of the cheese. This work aimed to identify, by Polymerase Chain Reaction (PCR), LAB of the genus *Lactococcus* and *Lactobacillus*, previously biochemical identified, isolated from milk, curd and traditional Coalho cheeses produced in the state of Ceará. The forty-four strains selected presented interesting technological properties for the Coalho cheese manufacture: ability to acidify the milk, low proteolytic activity, ability to produce flavor and ability to tolerate 3% NaCl. The PCR identified 20,4% of the isolates as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and 27,3% as *Lactobacillus paracasei*. No one *Lactobacillus plantarum* was identified by the molecular technique employed. A total of 47.7% of the isolates were confirmed by PCR, assuring that these microorganisms can be used for Coalho cheese manufacture made from pasteurized milk, preserving the typical characteristics of this product. This work shows the relevance of molecular approaches, increasing the quality and efficiency in the microorganisms identification.

Keywords: Coalho cheese; acid lactic bacteria, polymerase chain reaction (PCR).



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma geral da produção de queijo de Coalho no Ceará.....17
- Figura 2. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Llhs4R e Llhs3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 - controle positivo da reação; colunas 1-10: isolados testados.....37
- Figura 3. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Llhs4R e Llhs3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 - controle positivo da reação; colunas 11-19: isolados testados.....38
- Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpla2 e Lpla3 específicos para *Lb. plantarum*. Coluna M: marcador de peso molecular 100pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lactobacillus. plantarum* ATCC 8914 - controle positivo da reação; colunas 20-24: isolados testados.....40
- Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação; coluna C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 - controle positivo da reação; colunas 25-35: isolados testados.....41
- Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação; coluna C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 - controle positivo da reação; colunas 36-44: isolados testados.....41

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro1: Sequência dos <i>primers</i> .....	35
---	----

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE QUADROS	
1.	INTRODUÇÃO..... 12
2.	OBJETIVOS..... 14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 15
3.1.	Aspectos Gerais do Queijo de Coalho..... 15
3.2.	Características do Queijo de Coalho ..... 19
3.2.1.	Características Físico-Químicas do Queijo de Coalho..... 19
3.2.2.	Características Sensoriais do Queijo de Coalho..... 20
3.2.3.	Características Microbiológicas do Queijo de Coalho ..... 20
3.3.	Bactérias ácido lácticas ..... 22
3.3.1.	<i>Lactococcus</i> ..... 24
3.3.2.	<i>Lactobacillus</i> ..... 25
3.3.3.	<i>Enterococcus</i> ..... 26
3.3.4.	<i>Streptococcus</i> ..... 27
3.3.5.	<i>Leuconostoc</i> ..... 28
3.4.	Técnicas de Identificação ..... 28
3.4.1.	PCR..... 30
4.	MATERIAL E MÉTODOS..... 33
4.1.	Microrganismos utilizados ..... 33
4.2.	Manutenção e ativação das culturas para extração de DNA da cultura..... 33
4.3.	Extração do DNA ..... 33
4.4.	Identificação molecular das cepas de BAL – PCR específico..... 34
4.4.1.	PCR - <i>Lactococcus lactis</i> ..... 35
4.4.2.	PCR - <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i> ..... 36
4.5.	Eletroforese..... 36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 37
5.1.	PCR de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> ..... 37
5.2.	PCR de <i>Lactobacillus</i> ..... 39
6.	CONCLUSÃO..... 43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 44
APÊNDICES	
	APÊNDICE 1: Identificação bioquímica e origem dos isolados analisados.....54

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo de Coalho é um produto tipicamente nordestino. No estado do Ceará, sua produção é considerada tradicional e concentra-se em pequenos municípios da zona rural tendo bastante significância econômica e social através da geração de emprego e renda para grande parte da população (NASSU *et al.*, 2001a).

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, entende-se por queijo de Coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001). Por ter um processamento relativamente simples, este queijo é bastante produzido tanto artesanal como industrialmente.

Apesar da legislação brasileira estabelecer que o queijo deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 1996), muitos produtores rurais ainda utilizam o leite cru, o que representa um risco em potencial para a saúde do consumidor, devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos.

O processo de pasteurização, além de destruir os microrganismos patogênicos, reduz também as bactérias ácidas lácticas (BAL) presentes na microbiota natural do leite e que são responsáveis pelas características sensoriais do queijo (GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Para contornar este problema, faz-se o uso de fermento láctico comercial na produção de queijos com leite pasteurizado. No entanto, este procedimento leva à perda das características sensoriais típicas dos queijos, quando comparados aos produtos fabricados com leite cru (MARINO *et al.*, 2003).

A principal função das BAL é promover a acidificação a um pH próximo a 4,0 impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e permitindo uma maior conservação do produto fermentado (PIARD *et al.*, 1999). Outra função é desenvolver as propriedades sensoriais dos alimentos fermentados. As BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados (PIARD *et al.*, 1999). Entre os gêneros de BAL comumente encontrados em queijos cita-se: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FOX *et al.*, 2000).

Devido à falta de uniformidade, de garantia sanitária na produção de queijo de Coalho artesanal e a necessidade de melhorar a qualidade sensorial dos queijos produzidos

industrialmente, muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de caracterizar a microbiota láctica de queijos produzidos a partir do leite cru (CARVALHO, 2007; MEDINA *et al.*, 2001; LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000).

Testes bioquímicos, fenotípicos e fisiológicos, normalmente usados para identificar taxonomicamente a microbiota presente no queijo, são demorados e não são capazes de diferenciar espécies fenotipicamente relacionadas. O desenvolvimento de técnicas baseadas em técnicas moleculares, como a PCR, oferece novas perspectivas na taxonomia microbiana e no estudo de diagnósticos (DELGADO e MAYO, 2004), propiciando a seleção de linhagens de BAL com características industriais desejáveis.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo confirmar a identificação de isolados de *Lactococcus* e *Lactobacillus* presentes na microbiota natural de queijos de Coalho artesanais ou de suas etapas de processamento. Com isso, espera-se contribuir para a identificação e seleção de microrganismos que permitam a fabricação de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado, e que também possam favorecer a manutenção das características sensoriais típicas deste produto.

## 2. OBJETIVOS

Caracterizar molecularmente, através da técnica de PCR, bactérias ácido lácticas isoladas da microbiota natural do queijo de Coalho, pertencentes aos gêneros *Lactococcus* (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) e *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*), com potencial tecnológico para a elaboração de fermento láctico específico para fabricação de queijo de Coalho, produzido a partir de leite pasteurizado.

Avaliar a utilização dos *primers* Lhis4R e Lhis3F para identificação de *Lactococcus lactis*; Lpla2 e Lpla3 para a identificação de *Lactobacillus plantarum* e Lpar4 e LU5 para a identificação de *Lactobacillus paracasei*.

Confirmar os resultados obtidos por Carvalho (2007) na identificação bioquímica através do sistema API 50 CH (BioMérieux).

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Aspectos Gerais do Queijo de Coalho**

O queijo é considerado um dos alimentos preparados mais antigos da humanidade e é, provavelmente, a forma mais antiga e comum de preservar por mais tempo os mais importantes nutrientes do leite (SANTOS, 1990; EPAMIG 1989). Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação são os fatores responsáveis pela imensa variedade de queijos disponíveis (ANDRADE, 2006).

A arte de sua fabricação teve início num passado remoto, milhares de anos antes do nascimento de Cristo. Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram no leite e no queijo fonte importante de alimentação (EPAMIG, 1989).

A hipótese mais considerada a respeito da descoberta do queijo é a relacionada ao uso de recipientes ou sacos feitos com partes do estômago de animais, onde o leite era guardado e transportado. O contato do leite com as enzimas liberadas pelo estômago desses animais promovia sua coagulação, gerando uma massa branca, de sabor agradável. Admite-se que com o passar dos tempos, a massa foi colocada em formas, adicionada de sabores e maturada, sendo o produto resultante chamado de queijo (ANDRADE, 2006).

No Brasil, a fabricação de queijos é de história relativamente recente, firmando-se do ponto de vista industrial, no início do século passado e, sobretudo, a partir da década de 20, com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses e holandeses em Minas Gerais (FURTADO, 1991).

Dentre os queijos mais produzidos no Brasil estão o Minas, o Mussarela, o Prato e o Requeijão. O queijo de Coalho, em particular, é produzido tradicionalmente no Nordeste brasileiro, sendo bastante consumido pela população, em todas as faixas de renda (SEBRAE, 1998). Sua produção se dá principalmente nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (AQUINO, 1983).

A origem do nome queijo de Coalho deriva do fato de ter sido tradicionalmente manufaturado com leite coagulado pela ação de coalho animal, extraído do quarto estômago de pequenos animais tais como cabrito, bezerro, preá, mocó, os quais devidamente preparados são chamados de coagulador ou abomasun (AQUINO, 1983).

A produção rural deste queijo tem bastante significância econômica e social, uma vez que é extremamente expressiva na formação de renda dos produtores de leite, principalmente daqueles que não têm acesso às usinas de beneficiamento (LIMA, 1996). No estado do Ceará, sua produção está concentrada na zona rural, principalmente, no Vale do Jaguaribe (Limoeiro do Norte, Morada Nova, Jaguaribe, etc.) e nos Sertões Cearenses (Tauá, Crateús, Quixadá e Quixeramobim) (NASSU *et al.*, 2001a).

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, entende-se por queijo de Coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001). Este mesmo regulamento define este produto como um queijo de consistência semi dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma também ligeiramente ácido, lembrando massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

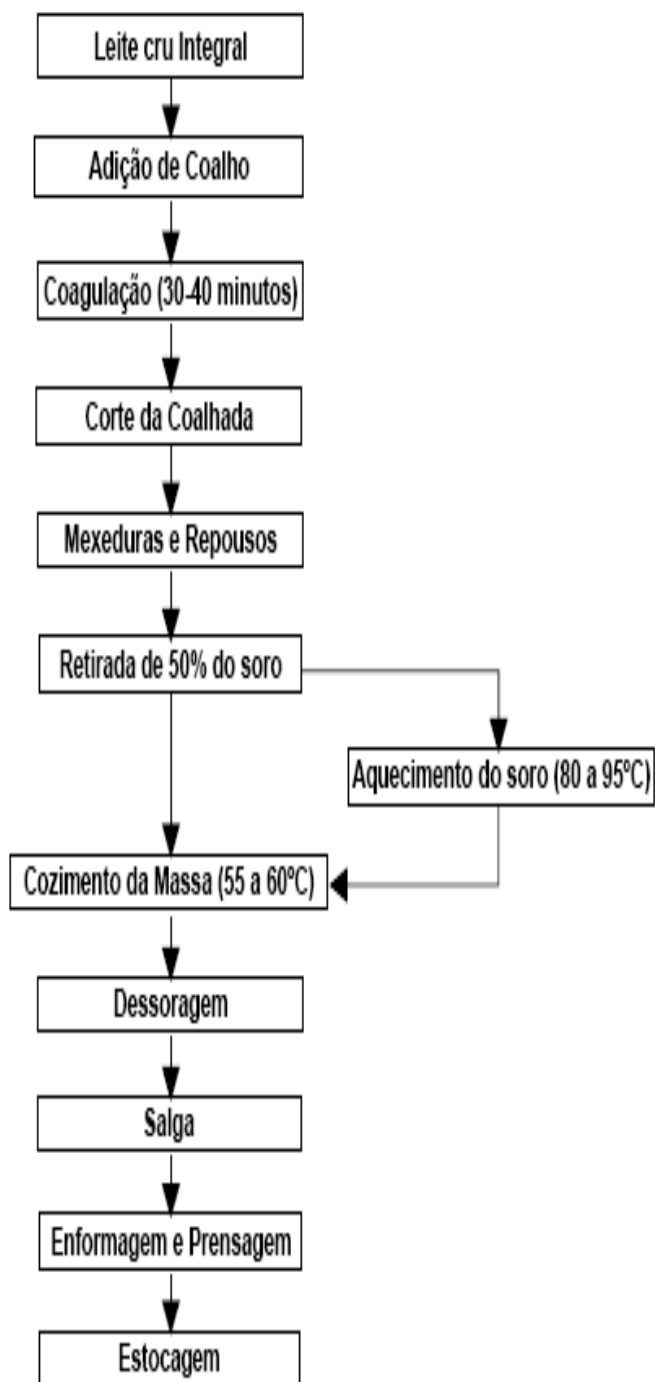
A *Food Agriculture and Organization* – FAO (1990), em uma publicação sobre a tecnologia de produtos lácticos tradicionais produzidos em países em desenvolvimento, cita o queijo de Coalho, como um produto originado no Nordeste do Brasil sendo produzido principalmente nos estados do Ceará, Pernambuco, Paraíba, Bahia e Rio Grande do Norte. Este produto é caracterizado por ser um queijo semi duro, produzido com leite cru, e que apresenta um sabor levemente salgado e acre, possui forma cilíndrica ou retangular, com peso entre 0,5 a 1,5 Kg, sendo consumido fresco ou curado.

A indústria queijeira no Ceará, assim como em toda região Nordeste, divide-se, basicamente, em pequenas unidades artesanais, sem qualquer fiscalização, e em médias empresas, regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura ou órgãos oficiais ou estaduais (NASSU *et al.*, 2001a). Porém, a fabricação de queijo de Coalho em indústrias regulamentadas não é realizada de forma permanente; nelas predomina a manufatura de queijos padronizados tipo Minas, Prato e Mussarela (ANDRADE, 2006).

Apesar da quantificação da produção artesanal não constar nas estatísticas oficiais, sabe-se da existência de inúmeras unidades de produção caseira e de fazendas produtoras, permitindo assegurar que a maioria de todo queijo de Coalho elaborado no Ceará tem sua origem ligada à fabricação artesanal (LIMA, 1996).



A Figura 1 mostra o fluxograma geral de produção do queijo de Coalho artesanal. Três etapas influenciam efetivamente na definição das características deste queijo: a utilização do leite cru, o cozimento da massa, no qual a temperatura de cozimento varia muito de produtor para produtor, e a salga diretamente na massa (CARVALHO, 2007).



Fonte: adaptado de Lima (1996)

Figura 1: Fluxograma geral da produção de queijo de Coalho no Ceará.

O cozimento da massa é realizado pela incorporação de parte do soro, que é previamente retirado e aquecido a uma temperatura entre 85° a 100°C. Este procedimento pode ser realizado também, com água quente ou vapor direto até a obtenção de massa semi cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45 e 60°C) (CARVALHO *et al.*, 2005).

A salga, que é geralmente realizada pela adição de cloreto de sódio diretamente à massa, tem como objetivo evitar o estufamento precoce, que ocorre devido à produção de gás por coliformes, o qual é um dos principais problemas enfrentados pelos produtores de queijo de Coalho do Ceará (NASSU *et al.*, 2001a). A salga na massa também pode retardar o crescimento de fermento láctico, inibindo uma produção intensa de ácido (FOX *et al.*, 2000).

Apesar da legislação brasileira estabelecer que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996) somente as unidades produtoras sob inspeção é que promovem o tratamento térmico do leite. Em 85% dos casos, o leite usado na elaboração deste queijo não é pasteurizado (NASSU *et al.*, 2001b), o que representa um risco em potencial para a saúde do consumidor, devido à possibilidade de veiculação de microrganismos patogênicos, dentre estes *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* e microrganismos do grupo coliforme (DUARTE, 2005).

O processo de pasteurização, além de destruir os microrganismos patogênicos, reduz também, as BAL presentes na microbiota natural do leite que são responsáveis pelas características sensoriais do queijo (GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Além disso, quando se faz uso do leite pasteurizado utiliza-se também fermento láctico comercial, porém este procedimento tem levado a perda das características sensoriais típicas dos queijos, quando comparados aos produtos fabricados com leite cru (MARINO *et al.*, 2003).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de caracterizar a microbiota láctica de queijos produzidos a partir do leite cru (CARVALHO, 2007; MEDINA *et al.*, 2001; LÓPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000). Essas informações podem contribuir para a definição de um fermento láctico que auxilie na padronização destes produtos, sem promover mudanças fundamentais nas características sensoriais dos mesmos, além de fornecer um produto seguro do ponto de vista microbiológico (CARIDI *et al.*, 2003; DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001).

## 3.2. Características do Queijo de Coalho

### 3.2.1. Características Físico-Químicas do Queijo de Coalho

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho, este produto é classificado como de médio (36,0 – 45,9%) a alto teor de umidade (46,0 – 54,9%), de massa semi-cozida ou cozida, semigordo (25,0 – 44,9%) ou gordo (45,0 – 59,9%) (BRASIL, 2001).

Esta variabilidade nos parâmetros físico-químicos tem sido constatada por diversos pesquisadores. Nassu *et al.* (2001b) avaliaram amostras de queijos de Coalho produzidas no Ceará e constataram que quanto ao teor de umidade, 81,4% foram classificadas como de média umidade e 18,6% como de alta umidade. Para o teor de gordura no extrato seco, 74,4% das amostras foram classificadas como queijo gordo e 25,6% como queijo semigordo.

Andrade (2006), pesquisando amostras de queijos de Coalho artesanais e industriais produzidas no Ceará, encontrou que 71,4% das amostras analisadas foram classificadas como queijos de média umidade e 28,6%, como de alta umidade. Em relação à gordura no extrato seco, 42,96% foram classificadas como semigordo, enquanto, 57,14% foram tidas como gordos.

Sena *et al.* (2000), analisando amostras de queijos de Coalho comercializados em Recife, concluíram que 81,6% das amostras analisadas deste queijo eram semigordos e 18,57% eram magros. Em relação ao conteúdo de umidade, 1,43% das amostras foi considerada como de baixa umidade, 40% como de média umidade, 54,29% como de alta umidade e 4,29% como de muito alta umidade.

Carvalho (2007) caracterizou o queijo de Coalho artesanal produzido no estado do Ceará como de médio conteúdo de umidade, baixa acidez, com pH de 6,30, elevada atividade de água e teor de NaCl de 2,88%.

Outros autores (ARAÚJO e NASSU, 2002), confirmaram a falta de padronização nas operações de elaboração do queijo de Coalho, assim como a ampla variação físico-química do leite utilizado na fabricação do mesmo, o qual não sofre nenhum tipo de padronização.

### **3.2.2. Características Sensoriais do Queijo de Coalho**

A pasteurização por reduzir grande parte da microbiota láctica natural do leite, influencia negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Por este motivo, a adição de fermento láctico comercial na elaboração de queijos produzidos a partir de leite pasteurizado tem ocasionado mudanças nas suas características sensoriais (ESTEPAR *et al.*, 1999).

Estudo realizado por Benevides *et al.* (2000) comparou sensorialmente o queijo de Coalho elaborado a partir de leite cru e pasteurizado, adicionado de fermento láctico, após 4, 30 e 60 dias de maturação. O queijo de Coalho produzido a partir de leite cru após o 4º dia de fabricação foi o preferido. O sabor e a textura foram melhor avaliados para este mesmo queijo com 30 e 60 dias de cura, enquanto que para os queijos produzidos com leite pasteurizado o parâmetro maciez foi o que apresentou maior aceitação. Apesar de ambos os tipos de queijos apresentarem boa aceitação quando maturados por 60 dias, o queijo de Coalho produzido com leite cru foi preferido de forma geral.

Nassu *et al.* (2004) relataram as variações sensoriais percebidas em queijos de Coalho artesanais e industriais consumidos em Fortaleza e observaram que entre 20 amostras, sete apresentaram características próximas ao padrão de identidade e qualidade considerados característicos para o queijo da região. Dentre estes, três eram artesanais e quatro industrializados.

Segundo Peláez e Requena (2005), as diferenças existentes entre a qualidade sensorial de queijos produzidos de leite cru e de leite pasteurizado dependem, principalmente, da diversidade e complexidade da microbiota presente no leite cru.

Cavalcante *et al.* (2004) empregaram um *pool* de cepas de BAL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) isoladas de leite cru para elaborar queijo de Coalho, a partir de leite pasteurizado. O produto resultante apresentou boa aceitação pelos consumidores, quando avaliados sensorialmente.

### **3.2.3. Características Microbiológicas do Queijo de Coalho**

Apesar da legislação estabelecer que o leite utilizado na elaboração de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996), muitos produtores rurais ainda utilizam o leite cru.

Além de ser fonte de BAL, o leite cru também é a principal fonte de microrganismos patogênicos do queijo de Coalho artesanal. Contudo, a presença de patógenos pode ocorrer também em queijos produzidos com leite pasteurizado, devido à contaminação pós-pasteurização (GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Em algumas unidades produtoras de queijo de Coalho artesanal observa-se, além de práticas de higiene inadequadas, muitos equipamentos e utensílios que não atendem as normas para os padrões higiênico-sanitários (NASSU *et al.*, 2001a).

No Brasil, coliformes fecais e *Escherichia coli* são detectados com frequência em vários tipos de queijos. Em queijo de Coalho, a ocorrência de coliformes fecais em níveis superiores aos permitidos pela legislação (ANVISA, 2001) tem sido relatada em vários estudos. Borges *et al.* (2003) avaliaram 43 amostras de queijos de Coalho produzidos em 11 municípios do estado do Ceará e verificaram que 74% delas estavam contaminadas por coliformes fecais e *E. coli* em níveis superiores ao estabelecido pela legislação. O mesmo fato foi observado por Bruno *et al.* (2005) onde 100% das amostras analisadas de queijos de Coalho artesanais e industriais comercializados em Fortaleza apresentaram altos níveis de contaminação por coliformes fecais. Feitosa *et al.* (2003), Paiva e Cardonha (1999), Mendes *et al.* (1999), em pesquisas semelhantes, também, observaram índices de contaminação por coliformes fecais em discordância com a legislação, os quais foram respectivamente 36% , 60% e 100% .

Considerando a importância de *L. monocytogenes* em produtos lácticos, a legislação brasileira (ANVISA, 2001) estabelece ausência deste patógeno em 25g de amostra. A incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos de Coalho apresenta uma ampla variação (zero a 50%). Sousa (2000), avaliando amostras de queijo de Coalho artesanais comercializados em João Pessoa, observou uma taxa de 50% de ocorrência deste microrganismo. Branco *et al.* (2003) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 19% das amostras avaliadas de queijo de Coalho industrial armazenados sob refrigeração e comercializados em Fortaleza. No entanto, Borges *et al.* (2003) e Sousa (2006) detectaram, respectivamente, 2,3% e 1,4% de incidência deste microrganismo em queijos de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza.

Vários estudos têm apontado, também, a presença de *Salmonella* sp. em queijos, principalmente em queijo de Coalho artesanal (ARAÚJO *et al.*, 2004; NASSU *et al.*, 2001a). No Ceará, Borges *et al.* (2003) detectaram a presença de *Salmonella* sp. em 34,9% das amostras de queijo de Coalho artesanais analisadas. Em outro estudo, Bruno *et al.* (2005) verificaram a presença desta bactéria em 12,5% das amostras de queijos industrializados. A

presença de *Salmonella* foi detectada também em 9% das amostras analisadas por Feitosa *et al.* (2003); em 30%, por Florentino e Martins (1999) e em 73,3%, por Mendes *et al.* (1999) e respectivamente nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco.

A ocorrência de altos níveis de *Staphylococcus* coagulase positiva e *S. aureus*, em queijos de Coalho produzidos em estados do Nordeste, tem sido relatada em vários estudos (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003). Na maioria deles, os queijos foram classificados como impróprios para o consumo humano, dada a constatação de níveis de contaminação superiores aos permitidos pela legislação de  $10^3$  UFC/g (ANVISA, 2001).

Borges *et al.* (2003) analisaram 43 amostras de queijos de Coalho produzidos em 11 municípios do Ceará, e verificaram que, 91% delas apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis superiores ao permitido pela legislação ( $10^3$  UFC/g). Resultado semelhante foi encontrado por Hiluy e Araújo (1999) que analisaram 25 amostras de queijos de Coalho comercializados em Fortaleza e constataram que 96% destas, apresentaram contagens acima do estabelecido pela legislação. Bruno *et al.* (2005) observaram que 50% do total de amostras avaliadas de queijos de Coalho artesanais e industriais comercializados em Fortaleza apresentaram contaminação por este patógeno.

### **3.3. Bactérias ácido lácticas**

As bactérias ácido lácticas (BAL) apresentam uma grande importância econômica para a indústria láctea e para a produção de outros produtos fermentados e suplementos alimentares, sendo mais conhecidas por seu uso como culturas iniciadoras em produtos lácteos (CARR *et al.*, 2002). A seleção apropriada e o balanço dessas culturas são críticas para a produção de produtos com as características reológicas, textura, aroma e sabor característicos (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, predominando na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas como o leite e o queijo (LOPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000). São encontradas de forma natural, como no leite cru, ou de forma industrializada, quando são adicionadas intencionalmente aos produtos lácteos.

Produzem ácido rapidamente através da fermentação dos carboidratos, sendo capazes de coagular o leite dentro de 24h em temperaturas acima de 20°C, provocando, portanto, o abaixamento do pH do leite de 6,6 para 4,6. Em consequência, ocorre a coagulação do leite, pois este pH é o ponto isoelétrico da caseína (PIARD *et al.*, 1999).

A acidificação do produto a um pH próximo a 4,0 impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, o que permite uma maior conservação do produto fermentado (PIARD *et al.*, 1999) e auxilia na atividade do coagulante e na dessoragem da coalhada (FOX *et al.*, 2000).

Outro aspecto importante da acidificação é sua contribuição no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados (CARR *et al.*, 2002). Isto acontece porque as BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas modificando gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados (PIARD *et al.*, 1999).

A primeira classificação atribuída a estas bactérias foi baseada na forma do isômero de ácido lático produzido. Quando o ácido lático produzido apresenta rotação ótica para a direita, ele é denominado Dextrorrotatório (D) e se apresentar rotação para a esquerda ele é denominado Levorotatório (L), podendo ainda ser chamado de racêmico quando há a mistura dos dois (DL) (CARR *et al.*, 2002).

As BAL podem ser classificadas, também, quanto à temperatura ótima de crescimento, em microrganismos mesofílicos quando, apresentam crescimento ótimo a 30°C ou termofílicos, quando apresentam crescimento ótimo a 42°C (FOX *et al.*, 2000).

Outra classificação pode ser dada de acordo com os seus produtos de fermentação. As bactérias homofermentativas produzem apenas ácido lático e as heterofermentativas, além de ácido lático, produzem também dióxido de carbono, ácido acético, etanol, entre outros (CARR *et al.*, 2002). Assim, as heterofermentativas, além de desenvolverem a acidez do produto, são responsáveis pelo desenvolvimento de compostos específicos de aroma e sabor (HASSAN e FRANK, 2001).

Dentre as características comuns a todos os gêneros das BAL estão a morfologia em forma bastonetes ou cocos não esporulados, e o fato destes microrganismos serem Gram positivos, anaeróbios facultativos, não produtores de catalase, oxidase e gelatinase, não reduzem nitrato a nitrito, mas serem capazes de utilizar o lactato (HASSAN e FRANK, 2001).

Desde que o conceito de BAL foi introduzido como um grupo de microrganismos, novas espécies foram descritas, enquanto outras já existentes foram renomeadas e reagrupadas. As BAL associadas a alimentos agora incluem espécies do gênero *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*,

*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

Desses 11 gêneros de BAL existentes, apenas cinco são comumente encontrados em queijos artesanais: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (FOX *et al.*, 2000).

Carvalho (2007), avaliando a microbiota láctica de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará, observou que esta era composta por *Enterococcus* (30,5%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (13,4%), *Lactobacillus* (41,5) e *Streptococcus* (14,6%).

Ao pesquisar a microbiota láctica natural do queijo espanhol Valdeón, López-Díaz *et al.* (2000) encontraram os seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. No acompanhamento dos diferentes estágios de elaboração deste queijo, foi possível notar que *Lactococcus* e *Enterococcus* dominavam no queijo fresco, e, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* se sobrepujam durante a cura.

Medina *et al.* (2001) caracterizaram 250 cepas de BAL isoladas de 4 amostras de um queijo artesanal argentino. Os gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus* compuseram 59% e 41%, respectivamente, da microbiota destas amostras. Dentre os isolados identificados como *Lactobacillus*, 93% pertenciam à espécie *Lb. plantarum*.

### 3.3.1. *Lactococcus*

Os *Lactococcus* são as principais bactérias responsáveis pela acidificação do leite (LOPEZ-DÍAZ *et al.*, 2000). Devido à sua capacidade em converter rapidamente a lactose em ácido láctico, estes microrganismos mesofílicos são os mais usados para a produção de ácido nas fermentações lácticas. Além de ácido láctico, formam também diacetil, dióxido de carbono e outros compostos de aroma. O número estimado de células no queijo durante a coagulação tem sido  $10^8$  UFC/mL (TEUBER, 1995).

Este gênero de BAL apresenta como características a capacidade de crescer a 10°C, em pH ótimo de 6,0-6,5, mas não a 45°C. Em temperatura ambiente de 20°-30°C, os lactococos levam de 10-20h para fermentar o leite cru (TEUBER, 1995).

Das cinco espécies de *Lactococcus* conhecidas, a única que contribui significativamente na produção de produtos lácticos é o *Lactococcus lactis* (TEUBER, 1995). O *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* são as subespécies mais importantes para a produção de queijos. O que diferencia estas duas subespécies são as características



relacionadas à capacidade de produzir  $\text{NH}_3$  a partir da arginina, crescimento a diferentes temperaturas e crescimento em diferentes concentrações de sal. Enquanto o *Lc. lactis* subsp *lactis* produz  $\text{NH}_3$  a partir da arginina, cresce a temperaturas de 10, 15 e 40°C e em 4% de sal, o *Lc. lactis* subsp. *cremoris* não produz  $\text{NH}_3$  a partir da arginina e cresce somente a temperaturas de 10° e 15°C e em 2% de sal (FOX *et al.*, 2000).

Carvalho (2007) encontrou baixa incidência (1,7%) deste gênero em queijos de Coalho artesanais. Enquanto Fortina *et al.* (2003) observaram que 67% dos microrganismos isolados de um queijo artesanal protegido pela denominação de origem eram representados pelo gênero *Lactococcus*. Este gênero foi, também, encontrado em um queijo marroquino branco e macio, denominado Jben, representando 27% dos isolados obtidos (OUADGHIRI *et al.*, 2005).

Os *Lactococcus* são geralmente predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa (CARVALHO, 2007), sendo sua presença reduzida durante o processo de cura, como constatada por Fontán *et al.* (2001) e López-Díaz *et al.* (2000), os quais verificaram seu desaparecimento em seis e oito semanas, respectivamente.

### **3.3.2. *Lactobacillus***

Os *Lactobacillus* participam do desenvolvimento do aroma e sabor do queijo devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas (LÓPEZ-DÍAZ, 2000). Este gênero contém cerca de 60 espécies. Destas, *Lb. helveticus*, *Lb. delbruecki*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum* são as mais encontradas em alimentos (LÓPEZ-DÍAZ, 2000).

Os *Lactobacillus* sobrevivem a tratamentos térmicos e são o único grupo que cresce bem no ambiente adverso do interior do queijo que possui um baixo pH, alto conteúdo de sal, ausência de carboidratos fermentáveis, é anaeróbico e pode conter bacteriocinas produzidas pelas bactérias iniciadoras (MARINO *et al.*, 2003).

Os *Lactobacillus* podem ser divididos em três grupos, tendo por critério o produto final de sua fermentação: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses a ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*); *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos,  $\text{CO}_2$ , álcool e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*); e *Lactobacillus* mesofílicos

heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido lático, ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub> e pentoses a ácido lático e ácido acético (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) (FOX *et al.*, 2000).

O grupo dos heterofermentativos facultativos não são comumente encontrados no fermento láctico, mas estão associados a fermentação secundária, benéfica durante a cura do queijo (BERESFORD e WILLIAMS, 2004). São chamados de bactérias ácido lácticas não iniciadoras ou culturas adjuntas, geralmente encontrados em fermentos lácticos (CROW *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2000). Os heterofermentativos obrigatórios podem produzir sabores indesejáveis e gás durante a cura do queijo (HASSAN e FRANK, 2001).

Do total de 22% dos isolados pertencentes a este gênero identificados em queijos de Coalho artesanais do Ceará, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (55,9%) e *Lactobacillus plantarum* (32,4%) foram as espécies predominantes (CARVALHO, 2007). Em outro estudo, Williams *et al.* (2002) também observaram a ocorrência de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus plantarum*, além de *Lactobacillus brevis* em queijo Cheddar, que também é produzido com leite cru. Estas espécies de lactobacilos fazem parte da microbiota secundária e chegam até os queijos através do leite cru e, principalmente, de contaminações advindas do ambiente de produção (CHAMBA e IRLINGER, 2004).

### **3.3.3. *Enterococcus***

Este gênero inclui mais de 20 espécies, sendo o *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais encontradas em alimentos. Os enterococos chegam até os alimentos através de contaminações ambientais, já que este gênero é encontrado em grandes porções no trato gastrointestinal de mamíferos, e se multiplicam durante a fermentação (GIRAFFA, 2003).

São encontrados em níveis elevados em uma grande variedade de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru ou pasteurizado, na Itália, Portugal, Espanha e Grécia, trazendo influências positivas no aroma e sabor do queijo (FRANZ *et al.*, 2003; GIRAFFA, 2003).

As espécies deste gênero apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. A influência positiva dos *Enterococcus* em queijos está relacionada ao desenvolvimento das propriedades sensoriais, através de reações bioquímicas (proteólise,

lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis) que ocorrem durante a cura (GIRAFFA, 2003). A habilidade em crescer a 10°C e 45°C, em NaCl 6,5% e na presença de 40% de bile e pH 9,6 é o que diferencia este grupo das outras BAL (FRANZ *et al.*, 2003).

Embora os enterococos sejam mais comumente utilizados como fermento láctico adjunto, também têm sido empregados como fermento láctico primário, devido à sua capacidade de produzir bacteriocinas (GIRAFFA, 2003).

O uso de enterococos é controverso devido ao seu potencial patogênico (DELGADO e MAYO, 2004). O “Advisory Committee on Novel Foods and Processors – ACNFP”, órgão de aconselhamento das agências reguladoras de alimentos, permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento láctico em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003). Porém, o uso de outras espécies ainda é questionado, pois há maior necessidade de estudos clínicos e epidemiológicos (COGAN *et al.*, 1997).

Marino *et al.* (2003) observaram em queijo Montasio, um queijo artesanal proveniente do Nordeste da Itália, que a contagem de enterococcus foi maior após 30 dias de maturação, sugerindo que essas bactérias desenvolvem um papel importante na maturação deste queijo.

Sarantinopoulos *et al.* (2001) observaram que o *E. faecalis* mostrou uma melhor performance quando comparado ao *E. faecium* e *E. durans*, no que diz respeito as propriedades bioquímicas, como a habilidade de acidificação e atividade proteolítica.

#### **3.3.4. Streptococcus**

De todas as espécies de *Streptococcus*, a única utilizada nas fermentações lácticas é o *Streptococcus thermophilus* (HASSAN e FRANK, 2001). O que diferencia esta espécie das demais é a sua resistência ao aquecimento, crescendo bem a 45°C e a 52°C e conseguindo, inclusive, sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE e WHILEY, 1995). Esta propriedade faz com que queijos, como o queijo Cheddar, caracterizados pelo emprego de temperatura elevada no processamento requeiram o uso de fermento termofílico que inclua estes microrganismos em sua composição (MICHEL e MARTLEY, 2001).

*Streptococcus* apresenta a habilidade de fermentar um pequeno número de carboidratos e possui atividade proteolítica limitada. O pH ótimo para o crescimento de *S.*

*termophilus* é de 6,5 (HASSAN e FRANK, 2001) sendo capaz de suportar uma concentração de até 2,5% de NaCl (FOX *et al.*, 2000).

*Streptococcus termophilus* é frequentemente utilizado em combinação com *Lactobacillus* spp. que desempenha o importante papel de utilizar a galactose, porção de lactose, que não é utilizada pelo *S. termophilus* complementando a acidificação do queijo e reduzindo o fenômeno de *browning* que ocorre com o aquecimento (MICHEL e MARTLEY, 2001).

Carvalho (2007) encontrou uma incidência de 14,6% de *Streptococcus* em queijos de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza.

### **3.3.5. *Leuconostoc***

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são distinguidas das outras BAL por serem cocos heterofermentativos. Estas bactérias apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20°-30°C (FOX *et al.*, 2000). São incapazes de hidrolisar arginina e requerem um pH maior que 4,5 (CARR *et al.*, 2002). As duas espécies associadas aos produtos lácteos são: *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuc. mesenteroides* subsp. *lactis* (FOX *et al.*, 2000). O primeiro normalmente fermenta somente a lactose e seus monossacarídeos, glucose e galactose.

*Leuconostoc* spp. apresenta crescimento vagaroso e fraca propriedade acidificante (DELLAGLIO *et al.*, 1995), além de baixa atividade proteolítica (HASSAN e FRANK, 2001). Contudo, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, para produzir diacetil, CO<sub>2</sub> e acetoína a partir de citrato (HASSAN e FRANK, 2001). Estes compostos são responsáveis pela qualidade sensorial, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (DELLAGLIO *et al.*, 1995).

## **3.4. Técnicas de Identificação**

A caracterização das BAL representa um avanço tecnológico significativo na produção de produtos lácteos fermentados, colocando-os entre os mais sofisticados e mais pesquisados alimentos fermentados (CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

As técnicas empregadas para a caracterização de microrganismos em queijos podem ser reunidas em três grupos: (1) métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização fenotípica; (2) métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização molecular; (3) métodos que envolvem somente a caracterização molecular (BERESFORD *et al.*, 2001).

Embora a Microbiologia Clássica dependa exclusivamente da primeira abordagem, a identificação de espécies de BAL usando apenas métodos fenotípicos, baseados nas propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas apresenta limitações, sobretudo em relação à sensibilidade do método. A identificação fenotípica, realizada através de testes bioquímicos e fisiológicos clássicos, freqüentemente é pouco eficiente em separar biotipos atípicos de espécies fenotipicamente relacionadas e, muitas vezes, não permite a separação genética de subespécies, como no caso de *Lactococcus lactis*, que podem pertencer a subespécie *lactis* ou a subespécie *cremoris*, sendo esta última especialmente adequada para a fabricação de certos tipos de queijo, como o Cheddar (DELGADO e MAYO, 2004).

Além dos procedimentos convencionais de identificação bacteriana baseada nas características fenotípicas, os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos, como testes com substratos cromogênicos ou fluorogênicos que detectam enzimas pré-formadas pelas bactérias (KONEMAN *et al.*, 2001) e sistemas comerciais de identificação, como por exemplo o Sistema API, onde são usados diferentes conjuntos de substratos miniaturizados (EIGNER *et al.*, 2005).

Os métodos moleculares, por sua vez, apresentam como características a reprodutibilidade, automação e rapidez, sendo, muitas vezes, independentes de cultivo (KALLIOPI *et al.*, 2004). Porém, os métodos que envolvem o cultivo seguido de caracterização molecular requerem o pré-crescimento de microrganismos e existe a possibilidade de que somente uma sub-fração de toda a microbiota esteja sendo avaliada. O desenvolvimento de métodos independentes do cultivo tem revolucionado a ecologia microbiana e sua aplicação pode conduzir a novas percepções do complexo sistema microbiano (BERESFORD *et al.*, 2001). Assim, o uso de métodos moleculares representa um grande avanço e tem aumentado a qualidade e a eficiência da identificação microbiana (BERNARDEAU *et al.*, 2007).

Técnicas baseadas no DNA e testes convencionais de carboidratos permitiram Desai *et al.* (2006) diferenciar e identificar espécies isoladas de produtos lácticos fermentados que pertenciam ao grupo *Lactobacillus casei*, um grupo taxonomicamente relacionado com os lactobacilos heterofermentativos facultativos.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada por Sawitzki *et al.* (2007) para identificar culturas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de produtos fermentados.

Beimfohr *et al.* (1997), usando PCR, mostraram que foi possível identificar *Lactococcus lactis* de diferentes subespécies e biovariantes, obtidos de diferentes coleções de culturas, através de um método rápido e fácil.

Delgado e Mayo (2004) diferenciaram isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus faecalis* de uma mesma população utilizando técnicas como ARDRA, RAPD e RFLP.

A técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD), utilizada para analisar a diversidade genética, foi realizada por Seseña *et al.* (2004) para identificar e diferenciar 34 diferentes perfis de *Lactobacillus*.

Vários outros estudos têm usado técnicas moleculares para identificar, a nível de subespécies e biovariantes, bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de produtos lácticos com bastante sucesso, facilidade e rapidez (GIRAFFA *et al.*, 2003; MARINO *et al.*, 2003; BERESFORD *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2000).

Assim, a confirmação da identificação de BAL isoladas de queijo de Coalho, através de ferramentas moleculares como, por exemplo, a técnica da PCR, é importante no sentido de assegurar a identificação destes microrganismos, cujo propósito final é serem utilizados na fabricação de alimentos.

### **3.4.1. PCR**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das técnicas de Biologia Molecular mais usada em inúmeras aplicações, seja na medicina forense, no diagnóstico de doenças genéticas, neoplásicas e infecciosas, assim como na identificação bacteriana. Nos últimos anos, ela tem sido uma alternativa rápida para os tradicionais métodos *in vivo* de clonagem de DNA (KOCHER e WILSON, 1991), apresentando como vantagens a rapidez, especificidade, flexibilidade e resistência (KIDD e RUANO, 1995).

PCR é uma metodologia *in vitro* que amplifica enzimaticamente uma sequência específica de DNA através do uso de *primers* que flanqueiam a região de interesse do DNA alvo. Esta técnica é assim chamada porque envolve a enzima polimerase e os produtos sintetizados, em cada ciclo, servem como modelo para o próximo ciclo, gerando uma reação

em cadeia (KOCHER e WILSON, 1991). Portanto, as duas principais vantagens deste método são a amplificação do DNA em escala logarítmica e a replicação de uma seqüência específica de DNA entre milhões de seqüências diferentes (EELES e STAMP, 1993).

O conceito de PCR foi primeiramente elaborado por Karry Mullis em 1986 e foi aplicado por um grupo de pesquisadores do Departamento de Genética Humana do Laboratório Cetus com o objetivo de amplificar o gene da betaglobina humana (EELES e STAMP, 1993).

No início, algumas limitações tornavam o processo demorado e mais susceptível a erros. O método utilizava como enzima fragmentos de DNA polimerase de *Escherichia coli*. Esta enzima, por ser instável termicamente, era inativada pelo calor utilizado para a desnaturação do DNA, sendo necessária a sua reposição na reação a cada início de um novo ciclo. Além disso, era necessário a utilização de banhos de água a diferentes temperaturas para cada etapa do ciclo. Em seguida, o método foi melhorado pela introdução de termocicladores automáticos capazes de realizar variações de temperaturas precisas e rápidas e pela DNA polimerase termoestável (Taq polimerase), simplificando os procedimentos da PCR e aumentando a sua eficiência (EELES e STAMP, 1993).

A amplificação de uma amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores (*primers*), os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio ( $MgCl_2$ ), que devem estar em maior concentração que os dNTPs, e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA. As concentrações de iniciadores, dNTP e magnésio variam de acordo com cada reação (SOUZA, 2006).

A amplificação do DNA é conseguida através de uma série de ciclos repetitivos. Cada ciclo envolve as etapas de desnaturação do DNA molde, anelamento do *primer* e extensão dos *primers* anelados (KIDD e RUANO, 1995). A repetição destes ciclos cria o acúmulo exponencial dos fragmentos específicos. Em uma alta concentração, o DNA pode facilmente ser detectado por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias, como a eletroforese, por exemplo (KOCHER e WILSON, 1991).

Na etapa de desnaturação utiliza-se temperaturas 94-96°C. O DNA molde, que é composto de dupla fita, é desnaturado em duas fitas simples de DNA, pela ação do calor. A temperatura é, então, diminuída (37-65°C) possibilitando o anelamento dos *primers* em cada uma das fitas simples na seqüência específica do segmento a ser amplificado. A extensão dos *primers* ocorre pela ação da Taq DNA polimerase, que tem uma temperatura ótima para a atividade em torno de 72°C, através da incorporação de desoxinucleotídeos, produzindo uma cópia complementar ao DNA molde na região especificada pelo *primer* anelado (KOCHER e

WILSON, 1991). Ao fim da reação, as amostras devem ser mantidas refrigeradas a 4°C para evitar a decomposição do DNA até a aplicação no gel.

Após a amplificação da sequência específica de DNA, o produto da reação é submetido a uma eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose é corado com brometo de etídio, o que torna possível a visualização de bandas específicas do DNA, quando o mesmo é submetido à luz UV.

Entre os vários tipos de PCR, as mais comuns são a RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction), a Multiplex PCR, a Nested PCR e a PCR Competitiva. O diferencial da primeira reação é que esta não parte de um molde de DNA; a amostra fornece o RNA, que é convertido em cDNA (DNA complementar).

No Multiplex PCR mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de *primers* específico. Esta vantagem simplifica alguns experimentos, como a investigação de paternidade, onde vários marcadores genômicos devem ser analisados.

No Nested PCR para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, o segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora dela, e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real sequência-alvo.

Na PCR competitiva, além do DNA molde, é adicionado à reação um outro trecho de DNA, de sequência, tamanho e concentração conhecidos (controle), cujas extremidades são complementares também aos *primers* que irão amplificar a sequência-alvo. O resultado é a amplificação de dois trechos de DNA: a de interesse e a controle. Esta última, levando-se em conta a quantidade inicial e dados sobre a eficácia da reação, serve de padrão para a quantificação do DNA alvo.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismos utilizados

Foram analisados 44 (quarenta e quatro) isolados de BAL pertencentes à Coleção de Culturas da Embrapa Agroindústria Tropical (Apêndice 1). Os microrganismos foram isolados de amostras de leite cru, massa de queijo e queijos de Coalho de origem artesanal produzidos na região do Jaguaribe, interior do estado do Ceará.

As BAL dos gêneros *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*, utilizadas no presente trabalho, foram previamente identificadas por Carvalho (2007) com base em suas características fenotípicas e bioquímicas (fermentação de açúcares) e selecionadas de acordo com a sua frequência de incidência nas amostras avaliadas e as seguintes propriedades tecnológicas de interesse para fabricação de queijo de Coalho: capacidade acidificante do leite, baixa atividade proteolítica, capacidade de produzir aroma e tolerância a NaCl na concentração de 3%.

### 4.2. Manutenção e ativação das culturas para extração de DNA da cultura

As BAL foram mantidas em meio “Litmus Milk” a -18°C. As culturas selecionadas para os testes moleculares foram descongeladas à temperatura ambiente e ativadas em meio LDR (leite desnatado reconstituído) a 10%, a 30°C (mesofílicos) por 24 horas. O procedimento foi repetido para que as células retomassem a sua atividade de crescimento. Em seguida, a cultura foi repicada em placas de ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) suplementado com 0,5% de glicose para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia selecionada foi, então, ativada em caldo MRS para a extração do DNA.

### 4.3. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada somente para os *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma vez que a reação do *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei* foi realizada a partir de uma colônia isolada em ágar MRS. A extração foi, então, efetuada conforme a metodologia sugerida por Pospiech e Neumann (1995) com as modificações descritas a seguir.

Uma alíquota da cultura de células, previamente ativada em caldo MRS, suplementado com 0,5% de glicose, foi centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C em

centrífuga (Vision). O sobrenadante foi descartado e a massa de células foi ressuspensa em tampão de extração (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM, pH 7,5). Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação, a massa de células foi ressuspensa em tampão de extração. Uma alíquota de 500 µL desta suspensão foi transferida para um tubo *Eppendorf* de 2,0 mL, ao qual foi adicionado lisozima (2,0 mg/mL). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos.

Após este período, foi acrescentado 1/10 volume de dodecil sulafato de sódio (SDS) 10% e proteinase K (5 mg/mL) com nova incubação a 55°C por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 1/3 volume de NaCl 5M e 1 volume de clorofórmio, com incubação a temperatura ambiente por 30 minutos.

Após centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo *Eppendorf* e foi adicionado 1 volume de isopropanol.

Novamente, foi realizada uma centrifugação (12000 rpm por 30 minutos a 4°C), o sobrenadante foi desprezado e o DNA foi lavado com etanol 70% frio. Após outra centrifugação (13000 rpm por 5 minutos a 4°C) o etanol foi descartado e o DNA secado a temperatura ambiente. O DNA foi solubilizado em 50µL de tampão TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0,5M), tratado com RNase (1 µg /mL) e, então, estocado a – 20°C.

#### **4.4. Identificação molecular das cepas de BAL – PCR específico**

A identificação molecular dos isolados foi realizada com o uso de *primers* específicos sintetizados pela Alpha DNA, Montreal, Quebec e cujas seqüências são apresentadas na Quadro1. Os *primers* Lhis3F e Lhis4R (BEIMFOHR *et al.*, 1997), utilizados para amplificação de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, foram baseados na seqüência do operon de biossíntese da histidina; enquanto os *primers* LU-5 e Lpar-4 (SONG *et al.*, 2000), utilizados para *Lactobacillus paracasei*, e Lpla2 e Lpla3 (SONG *et al.*, 2000) para *Lactobacillus plantarum*, foram baseados na seqüência intergênica 16S – 23S do rRNA.

Quadro 1: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação

<b>Microrganismo</b>	<b>Primers</b>	<b>Referência</b>	<b>Seqüência</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Lhis3F Lhis4R	BEIMFOHR <i>et al.</i> , 1997	5'AAAGAATTTTCAGAGAAA3' 5'ATTTAGAATTGGTTCAAC3'
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LU-5 Lpar-4	SONG <i>et al.</i> , 2000	5'CTAGCGGGTGCGACTTTGTT3' 5'GGCCAGCTATGTATTCACTGA3'
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lpla2 Lpla3	SONG <i>et al.</i> , 2000	5'CCTGAACTGAGAGAATTTGA3' 5'ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT3'

Como controle positivo foram utilizadas as seguintes cepas de referência: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52, *Lactococcus lactis* ATCC 14579 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8914. O controle negativo foi realizado com adição de água destilada livre de DNA e RNA (Gibco) em volume correspondente ao DNA.

#### 4.4.1. PCR - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Para a reação de PCR de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi utilizado o protocolo sugerido por Beimfohr *et al.* (1997) com algumas modificações:

A mistura da reação (30 µL) foi composta por 1X Tampão PCR (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,5 µM de cada *primer* (Alpha DNA), 1,5 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen). A esta mistura foram adicionado 4 µL do DNA extraído e o volume foi completado com água destilada livre de DNA e RNA (Gibco).

A amplificação foi realizada em termociclador (TC-512 – Techne) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos: de 94°C por 30 segundos, para a desnaturação; 44°C por 1 minuto e 30 segundos, para o anelamento dos *primers*; e 72°C por 2 minutos para a extensão. As amostras foram mantidas a 4°C até a aplicação no gel.

#### 4.4.2. PCR - *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*

A reação para *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* foi realizada segundo a metodologia sugerida por Song *et al.* (2000). Uma alíquota da cultura ativada em caldo MRS foi cultivada diretamente em placas de ágar MRS suplementado com 0,5% de glucose e uma colônia selecionada foi utilizada na reação.

A mistura da reação (30 µL) foi composta de 1X Tampão PCR (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,4 µM de cada *primer* (Alpha DNA), 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) e água destilada livre de DNA e RNA (Gibco), em quantidade suficiente para completar o volume final da reação. A esta mistura foi adicionada uma colônia do isolado a ser testado.

A amplificação foi realizada em termociclador (TC-512 – Techne) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos: de 95°C por 20 segundos, para a desnaturação; 55°C por 2 minutos, para o anelamento dos *primers*; 55°C por 2 minutos, para a extensão; e 74°C por 2 minutos para a extensão final, no caso de *Lactobacillus plantarum* ou por 5 minutos, para a amplificação do DNA de *Lactobacillus paracasei*. As amostras foram mantidas a 4°C até a aplicação no gel.

#### 4.5. Eletroforese

Com o objetivo de realizar a detecção dos produtos da PCR, 5µL do produto amplificado pela reação de PCR foi misturado a 1 µL de tampão de carregamento 6X e submetido a uma eletroforese em gel de agarose (Bioagency) 1% corado com 1,0 µg/mL de brometo de etídio em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,098M; EDTA 0,002 M, pH 8,0 ). Foi utilizado como padrão molecular um marcador de 100 pares de base (Promega) e a eletroforese foi realizada em uma cuba eletroforética (Fisher Scientific) com fonte (Fisher Scientific) nas condições de 90 volts por 40 minutos.

A análise da similaridade entre os isolados foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas na análise da reação de PCR, onde diferenças e similaridades entre os isolados foram analisadas visualmente, sob luz UV, de acordo com o comportamento de migração das bandas dos produtos da reação de PCR. Os isolados foram considerados similares quando todas as bandas visíveis possuíam a mesma distância aparente de migração. Quando não houve possibilidade de comparação entre migração de bandas semelhantes, os isolados foram considerados diferentes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PCR de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Dos 19 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* analisados, nove (47,3%) foram confirmados como pertencentes a esta espécie de acordo com a técnica de PCR empregada: colunas 1, 7, 8, 9 e 10 (Figura 2) e colunas 11, 15, 16 e 18 (Figura 3). Segundo Beimforh *et al.* (1997), a PCR de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com os primers Lhis4R e Lhis3F gera um produto de 343 pb (pares de base).

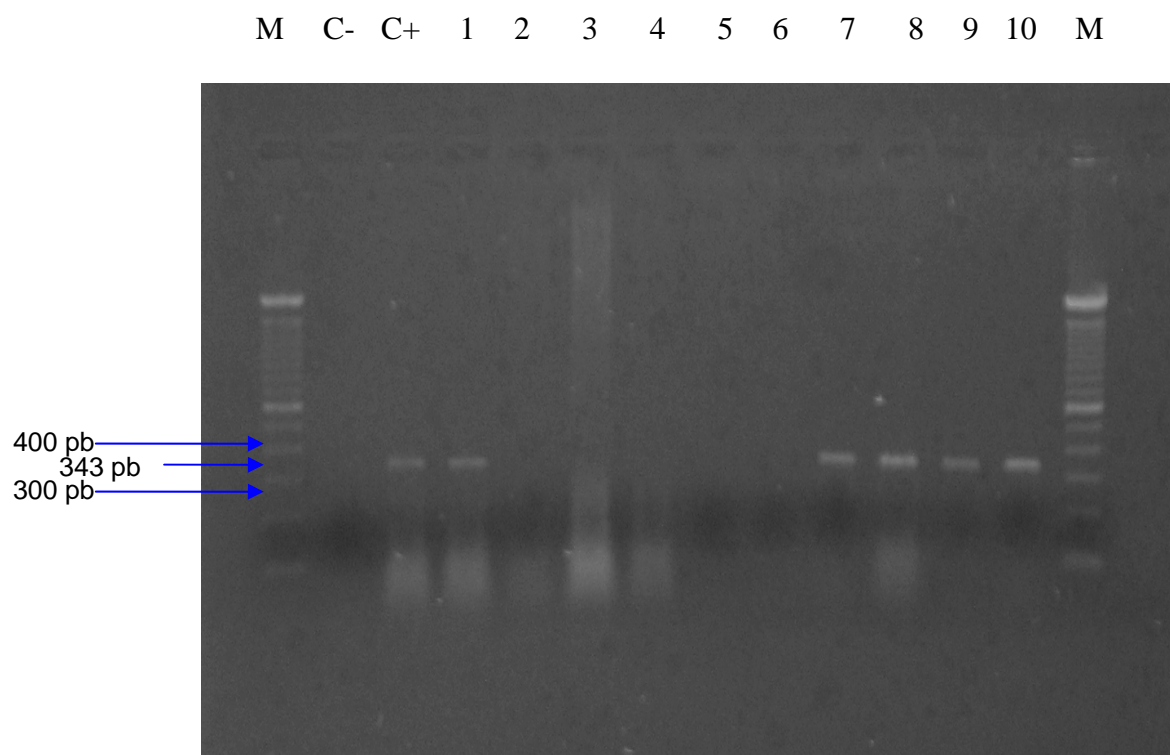


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lhis4R e Lhis3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 - controle positivo da reação; colunas 1-10: isolados testados.

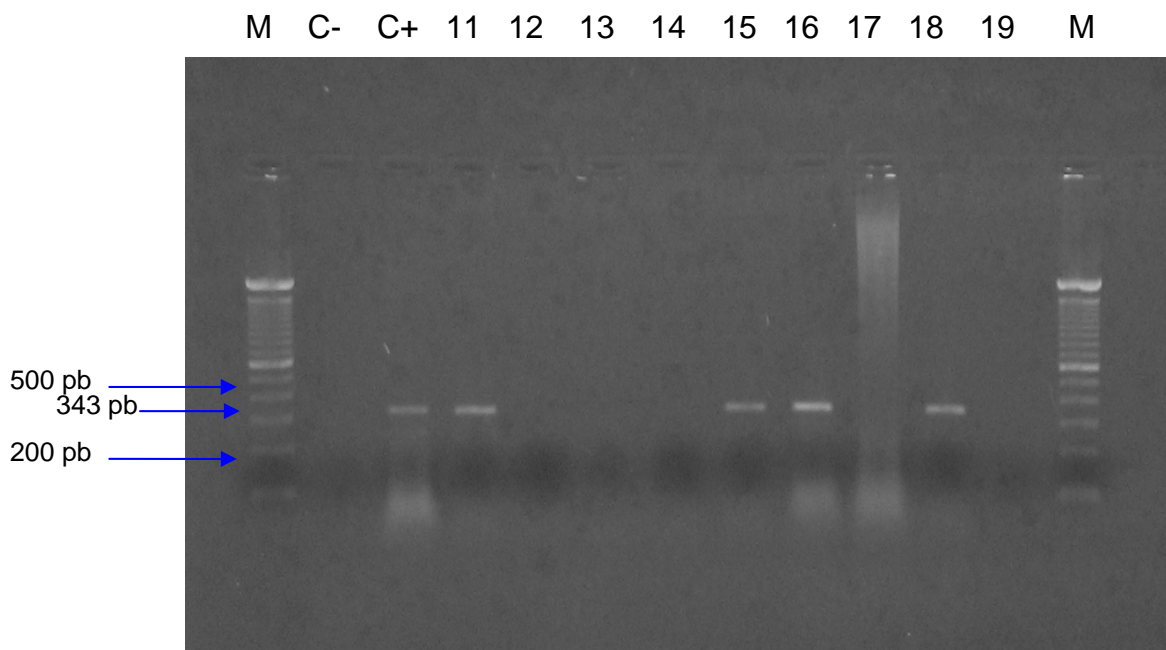


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lhis4R e Lhis3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 - controle positivo da reação; colunas 11-19: isolados testados.

As BAL testadas neste trabalho haviam sido previamente identificadas por Carvalho (2007) através de testes bioquímicos utilizando o sistema API 50CH em conjunto com o meio API 50CHL (BioMérieux). Tal sistema de identificação baseia-se no perfil de fermentação de 49 diferentes açúcares apresentado pelo microrganismo que está sendo identificado. Segundo Delgado e Mayo (2004) os testes bioquímicos e fisiológicos clássicos freqüentemente são pouco eficientes em separar biotipos atípicos de espécies fenotipicamente relacionadas, além de muitas vezes não permitirem a separação genética de subespécies, como no caso de *Lactococcus lactis*, que podem pertencer a subespécie *lactis* ou a subespécie *cremoris*

Diop *et al.* (2007) analisaram bioquimicamente, empregando o sistema API 50 CH (BioMerieux), e molecularmente (PCR) quatro BAL produtoras de bacteriocinas isoladas de uma variedade de alimentos fermentados no Senegal. De acordo com os pesquisadores, os resultados da identificação bioquímica não foram confirmados pela identificação molecular, pois enquanto a primeira mostrou que os quatro isolados pertenciam à espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a utilização da PCR identificou um dos microrganismos como *Enterococcus faecium*. Segundo os autores, foi priorizada a identificação molecular devido à sua concordância com análise morfológica previamente realizada. Além disso, a análise

bioquímica havia mostrado um baixo percentual de similaridade que pôde ser explicado pela inadequação do sistema API 50 CH em identificar *Enterococcus*.

Aleksandra *et al.* (2005), caracterizando a microbiota de leite fermentado através do sistema API ID 32 STREP, identificaram 12 isolados pertencentes à espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, dois isolados como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e três isolados como *Leuconostoc* spp. A identificação bioquímica da espécie foi confirmada pela PCR para todos os isolados de *Lactococcus lactis*, porém para a identificação da subespécie houve desacordo mostrando que outro método de identificação deveria ser usado para a confirmação das subespécies.

Delgado e Mayo (2004) analisaram 39 isolados de BAL provenientes de queijos fabricados sem adição de culturas iniciadoras. Os resultados da caracterização bioquímica identificaram todos os 39 isolados como pertencentes ao gênero *Lactococcus*. No entanto, os resultados das técnicas moleculares confirmaram que apenas 29 desses isolados eram *Lactococcus*, sendo 24 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e cinco *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Os outros dez isolados foram identificados como *Enterococcus*, sendo oito *E. durans* e dois *E. faecalis*.

## 5.2. PCR de *Lactobacillus*

A PCR de *Lactobacillus plantarum* com os primers Lpla2 e Lpla3 gera um produto de 248 pb (SONG *et al.*, 2000). Os resultados obtidos para os isolados do gênero *Lactobacillus* mostraram que dos cinco isolados identificados previamente como *Lactobacillus plantarum*, nenhum teve sua identificação confirmada pela PCR, uma vez que nenhum dos microrganismos analisados produziu um fragmento de 248 pb (Figura 4).

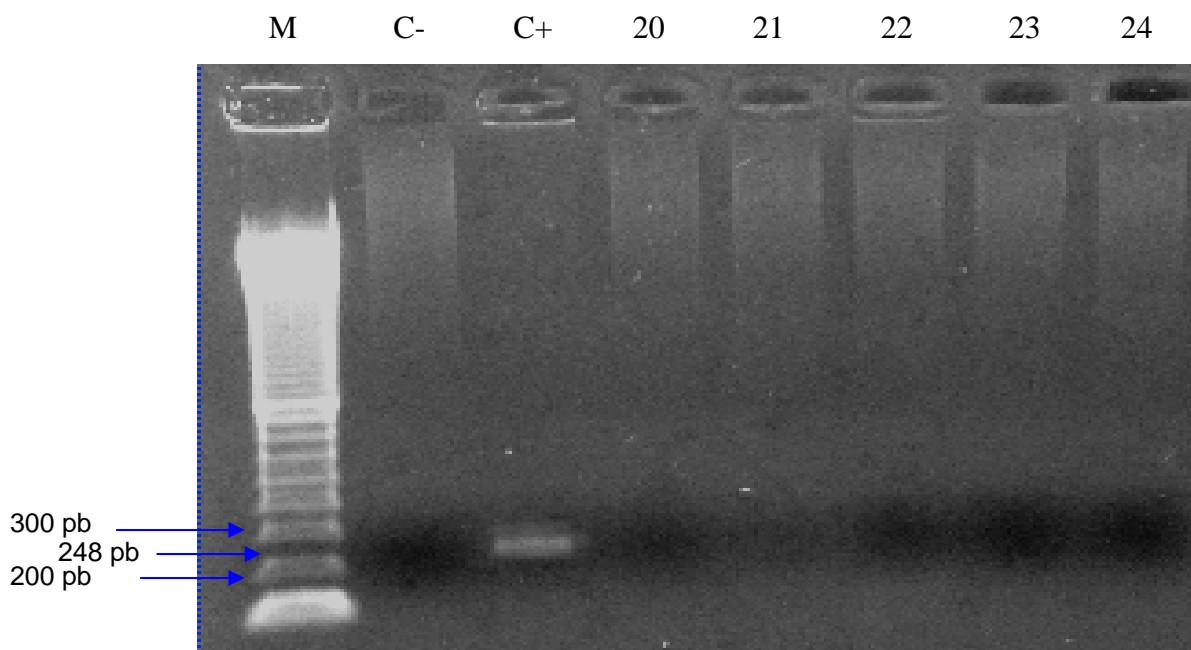


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpla2 e Lpla3 específicos para *Lb. plantarum*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação (água); coluna C+: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8914 - controle positivo da reação; colunas 20-24: isolados testados.

Swaitzki *et al.* (2007) caracterizaram bioquimicamente e molecularmente espécies de *Lactobacillus plantarum* isolados de um embutido cárneo produzido artesanalmente no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Dos dez isolados analisados, apenas cinco tiveram seu resultado confirmado pela análise molecular.

Nigatu (2000) analisou amostras de um produto cárneo fermentado produzido no Japão e mostrou que os isolados que foram molecularmente identificados como *Lactobacillus plantarum*, exceto um isolado, foram bioquimicamente identificados como *Lactobacillus fermentum*. Vogel *et al.* (1994) mostraram que essas duas espécies apresentam diferenças metabólicas. Enquanto o *Lactobacillus plantarum* é um heterofermentativo facultativo, o *Lactobacillus fermentum* é um heterofermentativo obrigatório comprovando que essas espécies não são geneticamente relacionadas. Portanto, o desacordo entre os dados bioquímicos e moleculares demonstraram a reduzida acurância dos procedimentos bioquímicos na identificação de *Lactobacillus*.

De acordo com Song *et al.* (2000), a PCR de *Lactobacillus paracasei* com os *primers* Lpar4 e LU5 gera um produto de 312 pb. Em nosso estudo, dos 20 isolados de *Lactobacillus paracasei* analisados, 12 isolados (60%) produziram um produto de PCR de



312 pb e tiveram sua identificação confirmada pela técnica de PCR utilizada: colunas 25, 29, 31, 33, 34 e 35 (Figura 5) e colunas 36, 38, 39, 40, 41 e 42 (Figura 6).

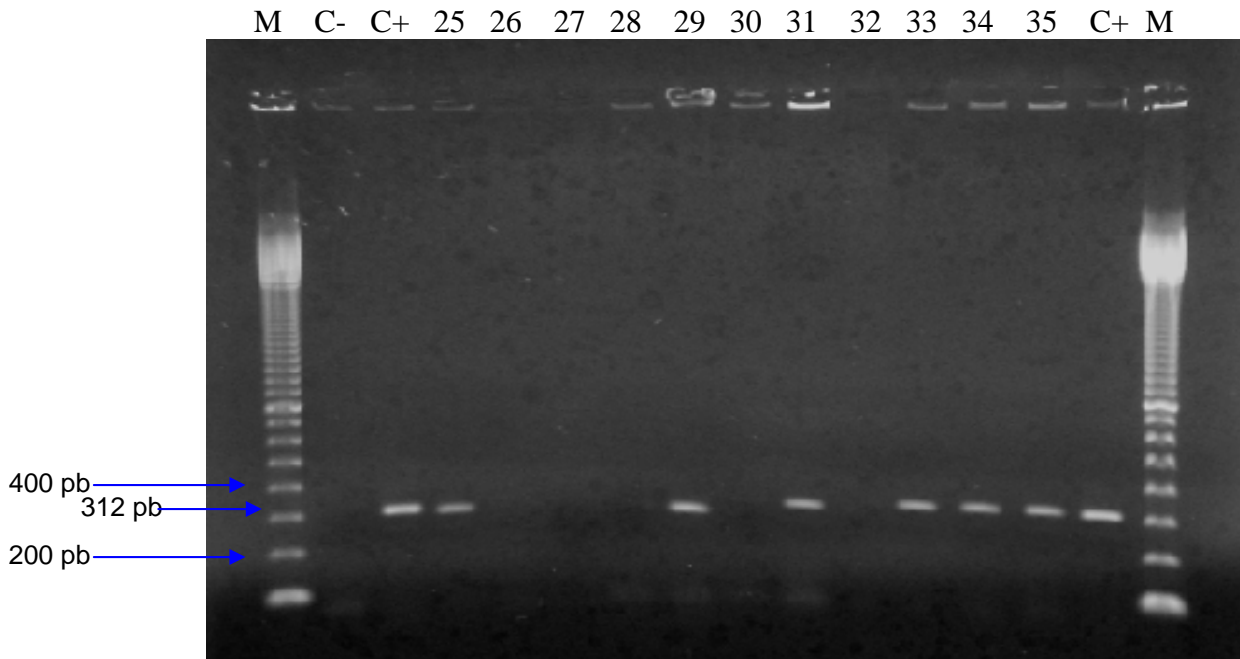


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação; coluna C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 - controle positivo da reação; colunas 25-35: isolados testados.

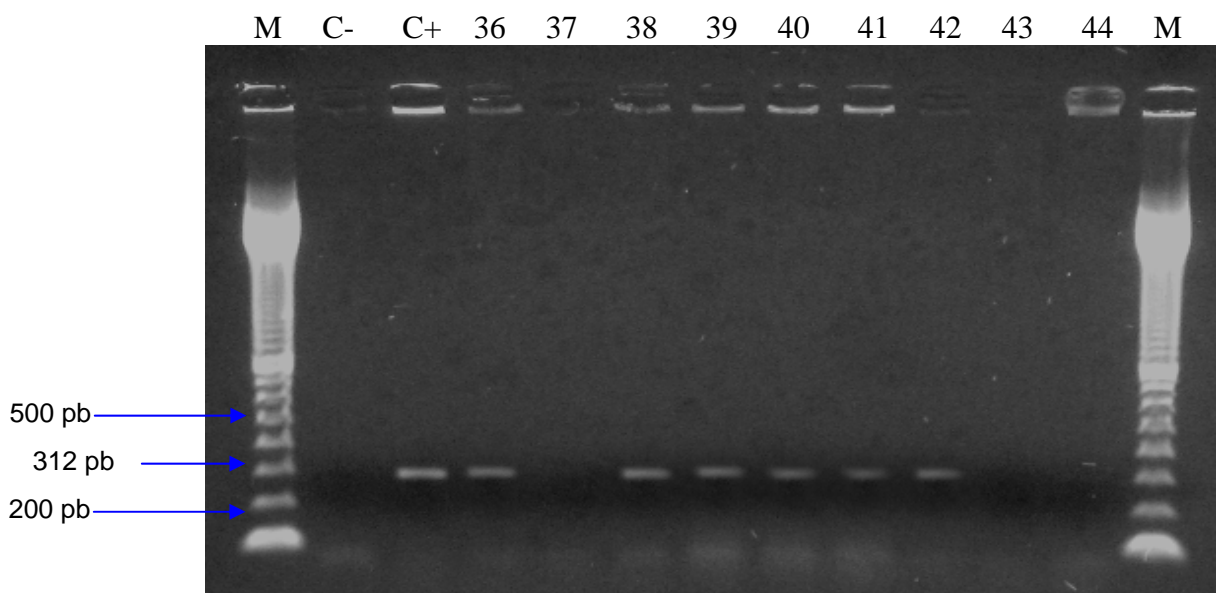


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. Coluna M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo da reação; coluna C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 - controle positivo da reação; colunas 36-44: isolados testados.

Kao *et al.* (2007), identificando *Lactobacillus* spp. isolados de probióticos, verificaram que os isolados identificados como *Lactobacillus paracasei* através do teste de fermentação dos carboidratos (API 50 CH (BioMerieux)) foram identificados como *Lactobacillus paracasei* ou *Lactobacillus casei* através de ferramentas moleculares. Esse resultado pode ser devido à mudanças na taxonomia dessa espécie. Estudos têm mostrado que o gênero *Lactobacillus* é um grupo heterogêneo com taxonomia instável (SCHLEIFER e LUDWIG, 1995).

Gomes (2007) identificou BAL isoladas de uma variedade de produtos, como queijo, leite, carne, vegetais e água comercializados em Ribeirão Preto, SP; como sendo *Enterococcus* spp. e observou que após a confirmação da identificação pela PCR um total de 78,8% dos isolados havia sido erroneamente identificado pelo sistema API 20 STREP. Segundo Velasco *et al.* (2004) e Devriese *et al.* (1995), este sistema não possui todos os testes necessários para uma correta diferenciação das espécies de enterococos.

Freqüentemente, a identificação das espécies é baseada em testes bioquímicos, como o perfil de fermentação de açúcares, mas pesquisas recentes têm mostrado que para algumas espécies essa ferramenta não é adequada (POT *et al.*, 1993). Uma clara identificação das espécies é dificultada devido à pequena variação das características bioquímicas entre as espécies de BAL (QUERE *et al.*, 1997). Além disso, o sistema API 50 CH apresenta baixa reprodutibilidade e uma base de dados incompleta, gerando problemas na identificação rotineira de BAL (VUYST e VANCANNEYT, 2007).

Atualmente, a seqüência de rRNA, particularmente rRNA 16S, tem sido largamente utilizada para a caracterização de microrganismos pelo fato de conter alguns segmentos que são invariáveis em todos eles. Essa situação oferece a oportunidade de desenvolvimento de sondas para identificar um organismo ou um grupo de organismos. Em poucos casos, é necessário usar métodos alternativos de sequenciamento de rDNA para discriminar as espécies (TORRIANI *et al.*, 2001).

A crescente utilização de técnicas moleculares tem promovido significativas contribuições com alterações taxonômicas dos microrganismos. Devido a isso, bactérias que antes eram incluídas em um determinado gênero, hoje com as evidências genéticas, se encontram reclassificadas em outros gêneros e até mesmo, novos gêneros estão sendo criados (VANDAMME *et al.*, 1996).

## 6. CONCLUSÃO

A não confirmação da identificação bioquímica de parte dos isolados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) mostra a importância da implantação de técnicas moleculares aumentando a qualidade e a eficiência na identificação de microrganismos.

Do total de 44 isolados analisados, apenas 21 (47,7%) tiveram sua identificação confirmada pela técnica de PCR.

Dos 21 isolados que tiveram sua identificação confirmada, nove pertenciam à espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 12 eram *Lactobacillus paracasei* e nenhum dos isolados foram confirmados como *Lactobacillus plantarum*.

Os primers Lhis4R e Lhis3F usados para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Lpla2 e Lpla3 para *Lactobacillus plantarum* e Lpar4 e LU5 para *Lactobacillus paracasei* permitiram a amplificação dos trechos desejados.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>. Acesso em 18 de janeiro de 2008.

ALEKSANDRA, Martinovic *et al.* Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. **Acta Veterinaria**, Belgrade, v. 55, n. 4, p. 307-318, apr. 2005.

ANDRADE, Alex-Sandra Alexandre de. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no estado de Ceará**. 2006. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

AQUINO, Francisca Teresa Montenegro de. **Produção do queijo de coalho no estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**. 1983. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.

ARAÚJO, R. S.; NASSU, R. T. . Caracterização físico-química de queijo de Manteiga, queijo de Coalho e Manteiga da Terra, produzidos no estado do Rio Grande do Norte e do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 97, p.70-75, jun. 2002.

ARAÚJO, Romilda *et al.* Avaliação microbiológica do queijo artesanal da região de Araxá – MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 93-96, jul./ago. 2004.

BEIMFOHR, C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart v.20, p. 216-221, jun. 1997.

BENEVIDES, Selene Dahia *et al.* Estudo bioquímico e sensorial do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 193-206, jul./dez. 2000.

BERESFORD, T.P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v.11, n. 4, p. 259-274, jul. 2001.

BERESFORD, T.P.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>o</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. v. 1, General Aspects, p. 287-317.

BERNARDEAU, Marion *et al.* The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, aug. 2007.

BORGES, Maria de Fátima *et al.* Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de Coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31- 40, jan./ jun. 2003.

BRANCO, M. A. A. C. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 398-408, jun./dez. 2003.

BRASIL. **Portaria nº 146**, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Brasília, 50p.

BRASIL. **Instrução Normativa n.º 30** de 26 de julho de 2001. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra, queijo de Coalho e queijo manteiga. Secretaria da defesa Agropecuária (DAS). Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/indtnorm.html>>. Acesso em 27 de agosto, 2007.

BRUNO, Laura Maria *et al.* Avaliação microbiológica de queijos de Coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 217-220, 2005.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 131-149, sep. 1999.

CARIDI, A. *et al.* Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, London, v.20, n.2, p. 201-209, apr. 2003.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in microbiology**. New York, v. 28, n.4, p. 281-370, dec. 2002.

CARVALHO, Juliane Doering Gasparin *et al.* Bactérias ácido láticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializadas em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n.345, p. 221-224, jul./ago. 2005.

CARVALHO, Juliane Doering Gasparin. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 182 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CAVALCANTE, J. F. M. *et al.* Queijo Coalho produzido com “pool” de culturas lácticas isoladas de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 211-214, jul./ago. 2004.

CHAMBA, J.- F.; IRLINGER, F. Secondary and adjunct cultures. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>o</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. v. 1, General Aspects, p. 191-206.

COGAN, T. M. *et al.* Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, aug. 1997.

CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjunct in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 275-283, jul. 2001.

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, n. 3, p. 309-319, 2004.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2, p. 235-278.

DESAI, A. R.; SHAH, N. P.; POWELL, I. B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n. 9, p. 3345-3351, sep. 2006.

DEVRIESE, L. A. *et al.* Identification of *Enterococcus* species isolated from foods animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 187-197, jul. 1995.

DIOP, M. B. *et al.* Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnological Agronomy Society Enviromental**. Belgium, v. 11, n. 4, p. 275-281, may. 2007.

DUARTE, D.A.M. *et al.* Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de Coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set. 2005

DURLU-OZKAYA, F. *et al.* Technologically important properties of latic acid bacteria from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v.91, n.5, p. 861-870, nov. 2001.

EELES, R. A.; STAMPS, C. A. **Polymerase chain reactions (PCR) - The technique and its applications**. Austin: R.G. Landes Company,1993.

EIGNER, U. *et al.* Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **Journal of Clinic Microbiology**. Washington, v. 43, n. 8, p.3829-3834, aug. 2005.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS (EPAMIG). **Os queijos na fazenda**. 3 ed. São Paulo: Editora Globo, 1989. Coleção do Agricultor - Laticínios. 219p.

ESTEPAR, J. *et al.* Biochemical and microbiological characterization of artisanal Peñamellera` cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 10, p. 737-746, oct. 1999.

FEITOSA, T. *et al.* 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, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

FLORENTINO, E. S.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de Coalho” produzido no Estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FONTÁN, M. C. G. *et al.* Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 25-33, feb. 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Animal Production and Health – The technology of traditional milk products in developin countries**, Roma, 1990, v. 85. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t0251e/T0251E13.htm>. Acesso em 31/01/2008.

FORTINA, M. G. *et al.* Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 4, p. 137-404, aug. 2003.

FOX, P. F. *et al.* **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 5. p. 54-97.

FRANZ, C. M.A.P. *et al.* *Enterococci* in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 2/3, p. 105-122, dec. 2003.

FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 1991. 297p.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, dec. 2003.

GOMES, Bruna Carrer. **Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Campinas, 2007.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, n. 12, p. 751-871, dec. 1997.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The genus *Streptococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2, p. 55-124.

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

HILUY, D. J.; ARAÚJO, R. E. S. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de Coalho comercializadas em Fortaleza – CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 28-36, mai/abr. 1999.



KALLIOPI, R.; COMI, G. COCOLIN, L. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. **Food Microbiology**. London. v. 21, n. 4, p. 481-487, aug. 2004.

KAO, Y.; LIU, Y.; SHYU, Y. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**. v. 40, n. 1, p. 71-79, jan. 2007.

KIDD, K. K.; RUANO, G. Optimizing PCR. In: McPHERSON, M. J.; HAMES, B. D.; TAYLOR, G. R. **PCR 2 – A practical Approach**. New York: Oxford University Press, 1995, p. 1-22.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: BROWN, T. A. **Essential Molecular Biology – A practical approach**. New York: Oxford University Press, 1991, v. 2, p 185 – 207.

KONEMAN, E. W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. Editora Médica e Científica. 5a. edição. Rio de Janeiro. 2001.

LIMA, Maria Helena. **Elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus***. 1996. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, feb. 2000.

MARINO, M.; MAIFRENI, M. RONDONINI; G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amesterdam, v. 229, p. 133-140, dec. 2003.

MEDINA, R. *et al.* Characterization of lactic acid bacteria in Ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, apr. 2001.

MENDES, E. S. *et al.* *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “Coalho” comercializados em Recife. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez., 1999.

MICHEL, V.; MARTLEY, F. G. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese – production and fate of galactose. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 317-325, may. 2001.

NASSU, R.T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, jul. 2001a.

NASSU, R. T. *et al.* Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no estado do Ceará. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1**. Embrapa, Fortaleza, CE, p. 1-28, dez., 2001b. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br>. Acesso em: 10/02/2008.

NASSU, R.T.; SILVA, M. A. A. P. da ; VIOTTO, W. H. Variações sensoriais em queijo de Coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, Recife. **Anais**. Recife: SBCTA, 2004. 2. CD-ROM.

NIGATU, A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.89, n. 6, p. 969-978, aug. 2000.

OUADGHIRI, M. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 267-271, oct. 2005.

PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de Coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio grande do Norte. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33-37, jan./fev. 1999.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. jun./set. 2005.

PIARD, J-C. *et al.* Bactérias lácticas. **Biociência & Desenvolvimento**. Brasília. v. II, n. 8, p. 80-84, mai/jun. 1999.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 217-218, jun. 1995.

POT B. *et al.* Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. **Journal of General Microbiology**, London. v. 139, n.3, p. 513-517, mar. 1993.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford. v. 82, n. 6, p. 783-790, may. 1997.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 47, p. 483-493.

SANTOS, Margareth Teixeira Marques dos. **Efeito do tratamento térmico do leite na qualidade do queijo Minas**. 1990. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

SARANTINOPOULOS, P. *et al.* Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 8, p. 621-647, aug. 2001.

SCHLEIFER, K.H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 18, p. 461-467, 1995.

SEBRAE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de Coalho produzido no Ceará**. Série estudos tecnológicos. Fortaleza: SEBRAE/CE, 1998. 208p.

SENA, M. J. *et al.* Características físico-químicas de queijo de Coalho comercializado em Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 41-44, jul. 2000.

SESEÑA, S.; SÁNCHEZ, I.; PALOP, L. Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from “Almagro” eggplant fermentations from two seasons. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam. v. 238, n. 1., p. 159-165, sep. 2004.

SONG, Y. *et al.* Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific *primers* derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam. v.187, n. 2, p. 167-173, jun. 2000.

SOUSA, S.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C. P. Isolamento de espécies de *Listeria* em queijo de massa crua tipo Coalho comercializada na cidade de João Pessoa – PB. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CBCTA, 2000. p. 4.145.

SOUSA, R. A. *et al.* Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza-CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo-SP, v. 20, n. 138, p. 66-69, jan.-fev. 2006.

SOUZA, Ana Carolina Mamana Fernandes de. **Comparação das técnicas de PCR em Tempo Real e PCR para o estudo dos genes MYCN, DDX1 e NAG em pacientes portadores de neuroblastoma.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STILES, ME.; HOLZAPFEL, WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-29, apr. 1997.

SAWITZKI, M. C. *et al.* Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausages. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo. v. 38, n. 3, p. 547-552, jul-sept. 2007.

TEUBER, M. The genus *Lactococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2, p.173-234.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2, p. 235-278.

TORRIANI, S.; FELIS GE.; DELLAGLIO F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence Analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington. v. 67, n. 8, p. 3450-3454, aug. 2001.

VANDAMME, P. *et al.* Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington. v. 60, n. 2, p. 407-438, jun. 1996.

VELASCO, D. *et al.* Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. New York. v. 49, n. 3, p. 151-156, jul. 2004.

VOGEL, R. *et al.* Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. United Kingdom. v. 44, n. 2, p. 223-229, apr.1994.

VUYST, L. DE, VANCANNEYT, M. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. London. v. 24, n. 2, p. 120-127, apr. 2007.

WILLIAMS, A. G.; CHOI, S.-C.; BANKS, J. M. Variability of the species and strain phenotype composition the non-starter acid lactic bacterial population of Cheddar cheese manufactured in a commercial creamery. **Food Research International**, Barking. v.35, n. 5, p. 483-493, mar. 2002.

## APÊNDICE

Apêndice 1: Identificação bioquímica e origem dos isolados analisados

Nº amostra	Nº isolado	Identificação Bioquímica	Origem do isolado
1	134	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
2	378	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
3	414	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
4	453	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
5	456	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
6	457	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
7	466	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Queijo de Coalho
8	613	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
9	626	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
10	639	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
11	688	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
12	698	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Massa de Queijo
13	718	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
14	960	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
15	963	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
16	969	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
17	1033	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
18	1083	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
19	1113	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leite Cru
20	275	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijo de Coalho
21	682	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Leite Cru
22	700	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Leite Cru
23	787	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Leite Cru
24	1119	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Queijo de Coalho
25	270	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
26	373	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
27	455	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
28	460	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
29	483	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
30	485	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
31	1018	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
32	1020	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
33	1024	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
34	1042	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
35	1120	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
36	1122	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
37	1123	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
38	1126	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
39	1131	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
40	1133	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
41	1134	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
42	1135	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
43	1179	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho
44	1191	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	Queijo de Coalho