

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E GENÉTICA DE**  
**BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO SERRANO.**

**Renata Chequeller de Almeida**

**Caxias do Sul, 2007**

**RENATA CHEQUELLER DE ALMEIDA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E GENÉTICA DE  
BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO SERRANO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Sergio Echeverrigaray  
Co-orientadora: Ana Paula L. Delamare

Caxias do Sul, 2007

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o êxito de meu trabalho, especialmente:

A Deus, que me bençoou e me iluminou nesta jornada para que eu jamais desistisse;

A minha co-orientadora, Prof. Dr. Ana Paula L. Delamare e ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray, pelos ensinamentos, pela paciência, por toda confiança em mim depositada, e sobretudo pela excelente orientação.

Agradeço a minha maravilhosa família, meu alicerce de vida, por todo amor, dedicação, ajuda e principalmente por todo incentivo para que chegasse onde me encontro: amo vocês!

A minha tia “Bob”, amiga de todas as horas, que incansavelmente com seu exemplo e carinho me guiou em todas as dificuldades de meu caminho;

A minha querida vó pelo apoio, pelo amor e por todas as orações a mim dedicadas;

Aos raros amigos, especialmente ao Alan, a quem nunca esquecerei por toda companhia, lealdade, e encorajamento. A fiel amiga Talita, que sempre esteve disposta a me escutar, a me animar e encher minha vida de graça quando os desânimos surgiram.

A todos os companheiros de jornada e amigos conquistados neste mestrado, em especial, as amigas Cristiane e Maria Fernanda, e ao grande amigo Jucimar, por toda a vivência, disposição e companheirismo: obrigada amigos!!!!

Ao inequecível amigo e professor de minha faculdade, Prof. Dr. Tabajara Gaúcho da Costa, o qual foi o grande incentivador para que eu acreditasse e nunca desistisse de meus sonhos.

E ainda, agradeço a Universidade de Caxias do Sul, funcionários e todos os professores que estiveram presentes e que contribuíram para meus ensinamentos.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 O queijo Serrano.....	4
2.2 O leite como matéria prima.....	6
2.3 Produção do queijo Serrano.....	9
2.3.1 Etapas do processamento do queijo Serrano.....	11
2.4 Bactérias Lácticas.....	13
2.5 Caracterização molecular de bactérias lácticas.....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1 Seleção das agroindústrias.....	21
3.2 Amostragem.....	21
3.3 Isolamento e seleção das bactérias lácticas.....	22
3.4 Identificação bioquímica de bactérias lácticas.....	22
3.5 Preparo das amostras para amplificação molecular.....	23
3.6 Caracterização de bactérias lácticas em queijos Serrano por TAP-PCR.....	23
3.7 Caracterização molecular dos isolados através de marcadores RAPD-PCR.....	23
3.8 Caracterização molecular dos isolados através de marcador ISSR-PCR.....	24
3.9 Caracterização molecular dos isolados através de marcador ERIC-PCR.....	25
3.10 Caracterização molecular dos isolados através de marcador BOX-PCR.....	25
3.11 Caracterização molecular dos isolados através de marcadores REP-PCR.....	26
3.12 Separação dos segmentos amplificados.....	26
3.13 Análise estatística dos dados.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
4.1 Caracterização morfológica e bioquímica das BALs em queijos Serrano maturados.....	28
4.2 Classificação molecular dos isolados de <i>Lactobacillus</i> através de TAP-PCR.....	34
4.3 Caracterização molecular das BALs presentes em queijos tipo Serrano maturados.....	37
4.4 Diversidade de <i>Lactobacillus</i> isolados durante o processamento e maturação de queijo Serrano.....	47
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características morfológicas e bioquímicas de bactérias lácticas isoladas de queijos Serrano comercializados.....	29
<b>Tabela 2.</b> Caracterização de isolados de <i>Lactobacillus</i> com base na capacidade de utilização de fonte de carbono.....	31
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> , temperaturas de anelamento, total e número de segmentos amplificados por isolado de <i>Lactobacillus</i> e porcentagem de segmentos polimórficos.....	40
<b>Tabela 4.</b> Correlação entre as distâncias obtidas com os marcadores BOX, REP, ISSR, RAPD e TAP- PCR.....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Queijos Serranos coletados nas agroindústrias da região de Criúva.....	6
<b>Figura 2.</b> Coagulação do leite durante o processo de produção de queijo Serrano.....	11
<b>Figura 3.</b> Corte do coalho, prévio a dessora.....	12
<b>Figura 4.</b> Queijo Serrano recentemente enformado com salga externa.....	12
<b>Figura 5.</b> Fluxograma de produção do queijo Serrano.....	13
<b>Figura 6.</b> Perfis eletroforéticos de fragmentos amplificados em <i>Lactobacillus</i> isolados de queijos Serrano (1- IBLac110 a 5- IBLac114) utilizando marcadores (A) RAPD-OPX-13, (B) REP-PCR, (C) BOX-PCR, (D) ISSR- (CA) <sub>8</sub> G e (E) TAP-PCR.....	35
<b>Figura 7.</b> Dendograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcador molecular TAP-PCR.....	36
<b>Figura 8.</b> Perfis eletroforéticos de fragmentos amplificados em <i>Lactobacillus</i> isolados de queijos Serrano (1- IBLac110 a 5- IBLac114) utilizando marcadores (A) RAPD-OPX-13, (B) REP-PCR, (C) BOX-PCR, e (D) ISSR- (CA) <sub>8</sub> G.....	39
<b>Figura 9.</b> Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcadores moleculares BOX-PCR(A) e REP-PCR (B).....	42
<b>Figura 10.</b> Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcadores moleculares RAPD (A) e ISSR (B).....	44
<b>Figura 11.</b> Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcadores moleculares RAPD, BOX, TAP e REP-PCR.....	46

**Figura 12.** Dendograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com os marcadores BOX-PCR e RAPD..... 48

## RESUMO

O queijo Serrano, oriundo da região nordeste do Rio Grande do Sul, caracteriza-se por ser um produto artesanal, fabricado com leite cru, sem adição de inóculo e sem prévia pasteurização. Os processos de fermentação e maturação são realizados unicamente pela microbiota proveniente do leite e aquela selecionada durante o procedimento. A falta de padronização, associada às precárias condições higiênico-sanitárias, resulta em um produto com uma diversificada população bacteriana, o que provoca críticas na qualidade microbiológica do produto final. A partir deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi classificar isolados de bactérias lácticas predominantes de doze amostras de queijos Serranos comerciais através de métodos bioquímicos e análises morfológicas, bem como caracterizá-los através do uso de métodos moleculares baseado em PCR: RAPD, ISSR, BOX, REP, ERIC e TAP. O resultado das análises demonstraram que os 33 isolados pertencem principalmente às espécies *L. plantarum* e *L. paracasei*. Além destas, também foram detectados *L. brevis* e *L. delbrueckii*. A presença de uma ou mais de uma espécie de *Lactobacillus* foi constatada nos queijos Serrano avaliados. Elevada correlação foi verificada entre a classificação bioquímica e os perfis obtidos através do método de TAP-PCR. Marcadores RAPD, BOX e REP-PCR apresentam elevada capacidade discriminatória em *Lactobacillus* isolados de queijos Serrano. Já os marcadores ISSR não foram confiáveis, separaram isolados considerados como idênticos com base em outros marcadores. Marcadores ERIC-PCR não amplificaram os isolados de *Lactobacillus*. O acompanhamento das populações bacterianas ao longo do processo de maturação de duas amostras de queijo Serrano permitiu verificar a presença de *L. plantarum* no início do processo e predominância de *L. paracasei* no

final da maturação. Em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho vêm confirmar a prevalência de *Lactobacillus* em queijos do tipo Serrano.

## ABSTRACT

Serrano cheese is a typical product from the highlands of northeast of Rio Grande do Sul State and also from the Araucaria plateau of Santa Catarina State. This cheese is characterized as an artisanal product obtained by natural fermentation of raw non-pasteurized cattle milk. The fermentation and ripening processes of Serrano cheese are performed by the natural microbiota from milk selected during the factoring process. The lack of starter cultures, the absence of thermal treatment, and the limited sanitary conditions adopted result in a product with poor microbiological quality and undefined physico-chemical properties. In this context, the objective of the present work was to classify 33 non-starter lactic acid bacteria (NSLAB), obtained from twelve commercial cheeses, using biochemical and morphological methods, and to proceed the characterization of NSLAB populations by different PCR-based molecular methods (RAPD, ISSR, BOX, REP, ERIC and TAP). Biochemical and molecular analysis showed high prevalence of *L. plantarum* and *L. paracasei*, with the eventual occurrence of *L. brevis* and *L. delbrückii*. The presence of one or more than one predominant species of *Lactobacillus* was observed in the different cheese samples. High correlation between biochemical classification and TAP-PCR was observed. RAPD, BOX and REP markers showed high discriminatory ability allowing the characterization and identification of all the *Lactobacillus* isolates obtained from Serrano cheese. ISSR markers showed no reliable results, since several isolates that were considered as identical by the other markers were separated by this method. ERIC-PCR did not amplified the *Lactobacillus* analyzed.. The evaluation of bacterial populations during the ripening process showed that *L. plantarum* is prevalent during the initial period, being gradually substituted by *L.*



*paracasei*. The overall results obtained in this work confirm the prevalence of *Lactobacillus* as LAB in Serrano cheese.

# 1. INTRODUÇÃO

O queijo, apesar de ser um alimento muito apreciado, pode ser definido como um produto derivado do leite (de vaca, ovelha, cabra, búfalo ou outros), resultante de um processo de produção cujas fases são a *coagulação*, a *retirada do soro*, a  *moldagem*, a *prensagem*, a *salmoura* e a *maturação*. Apesar de cada cultura ter desenvolvido suas próprias técnicas de fabricação, a fermentação do leite é considerada uma importante etapa no processamento da maioria dos queijos.

A fermentação, por sua vez, é produto da atividade metabólica das bactérias ácido lácticas, as quais exercem importante papel nas características organolépticas, aromáticas e químicas do produto final. Esse grupo de bactérias é caracterizado, portanto, por possuir um metabolismo fermentativo de açúcares no qual o ácido láctico apresenta-se como seu principal produto. As bactérias em questão pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e/ou *Pediococcus* que podem estar presentes na matéria- prima e/ou serem inoculadas durante o processo de produção.

O queijo Serrano, típico da região nordeste do Rio Grande do Sul , caracteriza-se por ser um produto artesanal, fabricado com leite bovino cru, sem adição de inóculo e sem prévia pasteurização. O conhecimento de sua produção tem sido transferido verbalmente ao longo de gerações até os dias atuais, o que resulta em um produto pouco padronizado. Os diferentes procedimentos na fabricação do queijo Serrano, associados à utilização de leite cru, levam a uma grande variação tanto nas populações bacterianas envolvidas na fermentação como nos microrganismos indesejáveis presentes no produto final. De acordo com trabalhos realizados, a fermentação láctica do queijo Serrano é realizada principalmente por bactérias ácido lácticas do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus*, podendo-se destacar uma importante flutuação populacional durante o processo de maturação.

Com vistas a minimizar os problemas relacionados às condições previstas para produção qualificada do queijo Serrano, torna-se premente a otimização dos diversos passos do sistema de fabricação, que vão desde a obtenção da matéria prima, fermentação e maturação até a estocagem do produto final.

Um ponto essencial na fabricação de qualquer gênero alimentício, particularmente tratando-se de queijos produzidos a partir do leite cru, é a caracterização da microbiota presente no produto final, de modo a garantir segurança alimentar para os consumidores, demonstrando, concretamente, que existe um processo de controle na produção dos alimentos postos à disposição do público consumidor.

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho foi classificar e caracterizar isolados de bactérias lácticas, assim como acompanhar a dinâmica das populações destas bactérias durante o processo de produção de queijo Serrano. Para tanto, as bactérias lácticas isoladas destes queijos comercializados na região serrana do Rio Grande do Sul foram classificadas em gênero e espécie através de análises morfológicas e bioquímicas, e caracterizadas molecularmente através do uso de métodos moleculares baseado em PCR (RAPD, ISSR, BOX, REP, ERIC e TAP-PCR).

É importante ressaltar que os resultados obtidos a partir deste estudo vêm a contribuir para a seleção de bactérias lácticas com características superiores e sua utilização como inóculo, o que, desta maneira, poderia resultar na obtenção de um produto típico dos Campos de Cima da Serra, bem como a padronização do sistema de produção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A história do queijo remonta a tempos antiqüíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como marco inicial da sua fabricação. Há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C e de achados arqueológicos que revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C. Durante o Império Romano, a produção de queijos aperfeiçoou-se, alcançando um alto padrão, mas foi somente no século XIX que se iniciou a produção em massa de queijos (Perry, 2004).

Segundo Furtado (1991), a produção de queijo no Brasil, do ponto de vista industrial, é relativamente recente, tendo início na década de 1920 com o estabelecimento de imigrantes dinamarqueses no sul de Minas Gerais e holandeses na região de Santos Dumont e Barbacena, também em Minas Gerais.

Embora o processo básico de produção de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida de cerca de 1000 tipos de queijos. Atualmente, a liderança na produção de queijos no Brasil pertence ao queijo tipo Mussarela seguido pelo queijo Prato e o Minas (Perry, 2004). O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro de queijos, com cerca de 215 mil t/ano, respondendo pela metade do consumo nacional (Teixeira *et al.*, 2007).

De acordo com a Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) número 146 de 07 de março de 1996, “Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial, ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.” A legislação

complementa essa definição reservando o nome “queijo” exclusivamente para produtos cuja base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea. Em outros termos, é um produto sólido derivado do leite, obtido através de sua coagulação com enzima ou ácido láctico, seguido de separação do soro. O queijo é um alimento de alto valor nutricional, de fácil conservação, consistindo em uma forma de conservação do leite, um alimento muito perecível, por períodos mais longos.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), em 2005, somente nos estabelecimentos registrados no SIF (Serviço de Inspeção Federal)/DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal) e MAPA, foram produzidos 500.000 toneladas de queijo, estimando representar apenas 60% do mercado total brasileiro, visto que grande quantidade de queijos ainda é produzida sem o conhecimento das autoridades sanitárias responsáveis no Brasil; são os queijos ditos “informais”.

Apesar de a produção e a comercialização de queijos coloniais serem no Brasil consideradas clandestinas, a prática tem sido freqüente e inevitável, uma vez que sua proibição acarretaria em um problema social, principalmente para populações que sobrevivem da renda dessa atividade (Ide & Benedet, 2001).

## **2.1 O queijo Serrano**

O queijo Serrano, oriundo da região de Criúva e dos Campos de Cima da Serra, nordeste do Rio Grande do Sul, e Planalto das Araucárias, sul de Santa Catarina, é um produto artesanal de pequena escala, que apresenta grande aceitação do consumidor. Sua história confunde-se com a da imigração italiana tendo assim sua origem possivelmente no final do século XIX.

De acordo com Souza *et al.* (2003), o queijo Serrano é produzido em regiões de altitude de 800 a 950 metros acima do nível do mar, as quais alcançam temperatura média de 4°C a 13°C no inverno e 18°C até 26°C no verão. Este queijo é caracterizado por ser um produto produzido a partir

de leite cru, de forte sabor, semiduro, que apresenta casca fina, uniforme e lisa, de coloração amarelo suave. É consumido logo após um pequeno período de maturação, usualmente de 30 dias, período em que melhor é aceito pelo público.

Entretanto, a legislação brasileira (Portaria nº146 de 07 de março de 1996) preconiza que o queijo fabricado e consumido a partir de leite cru deve ter um período mínimo de maturação de 60 dias antes do consumo. Pesquisas realizadas por Souza *et al.* (2003) constataram a importância de um tempo de maturação do queijo Serrano superior a trinta dias como fator de estabilização microbiológica deste produto artesanal, já que foi observado uma redução considerável na taxa de microrganismos indesejáveis.

A legislação gera, porém, situações de difícil solução, como ocorre, por exemplo, com o queijo Minas artesanal, fabricado nas regiões da Serra da Canastra, Serro e Salitre, em Minas Gerais, para o qual acredita-se que o tempo ideal de maturação é de apenas 20 dias (Perry, 2004).

O queijo Minas tradicional e/ou artesanal é produzido em fazendas e emprega o “pingo” como fermento, o qual varia de acordo com as características da região. Da mesma forma, esses queijos tradicionais, por serem produzidos por meio do “pingo”, variam também em suas características (Machado *et al.*, 2004).

O “pingo”, segundo Perry (2004), se caracteriza por ser uma mistura complexa de bactérias lácticas, entre as quais destacam-se *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (95%) e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (5%). Este fermento é retirado na segunda etapa da cura, após a salga, sendo capaz de garantir não apenas as características mas também a sanidade do produto.

O queijo Serrano, altamente apreciado e consumido, é fabricado com leite cru sem a adição de inóculo inicial, apresentando, desta maneira, uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. A falta de conhecimento acaba, assim, por provocar críticas na qualidade microbiológica do produto, uma vez que os processos de fermentação e maturação ocorrem,

portanto, através do processo natural, sendo dependentes unicamente da microbiota existente (Souza *et al.*, 2003).

De acordo com uma pesquisa realizada no sul de Santa Catarina, os queijos serranos são encontrados em formatos retangulares (56%), redondos (28%) e quadrados (16%), com pesos que variam entre 500g e 2000g. Quanto à umidade, os queijos amostrados variaram entre 35 e 60%. O pH do produto varia entre 4,8 e 6,0. Variações na prensagem e teor de sal também foram constatadas. Tais dados apontam para a falta de padronização do queijo Serrano (Figura 1) e os conseqüentes problemas que esses produtos, também conhecidos como coloniais, enfrentam, principalmente em termos legais (Ide & Benedet, 2001).



Fonte: IB/UCS

Figura 1. Queijos do tipo Serrano coletados nas agroindústrias da região de Criúva.

## 2.2 O leite como matéria-prima

A matéria-prima utilizada na fabricação do queijo é o leite, constituído de água (87,30%), gordura (3,80%), proteínas (3,30%), lactose (4,90%) e sais minerais (0,72%) (Sgabieri, 2004). O conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades organolépticas e industriais (Noro *et al.*, 2006).

No Brasil, a qualidade higiênica insatisfatória do leite produzido é um problema crônico apesar de seu importante papel representado na alimentação da população (Lisita, 2005). Cerca de 48% da produção leiteira brasileira é realizada de forma clandestina, ou seja, à margem de qualquer

tipo de fiscalização efetiva por parte das autoridades competentes (Almeida Filho *et al.*, 2002). De excelente alimento que é, o leite pode vir a se tornar veículo de transmissão de doenças (Ide & Benedet, 2001).

O leite destinado à fabricação de queijo deve ser de boa qualidade e, tanto quanto possível, livre de contaminação bacteriana e agentes químicos como antibióticos, pesticidas, herbicidas, etc. A utilização de leite cru, por exemplo, é a causa de muitas preocupações, porque constitui a fonte de origem de inúmeros patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, entre outros (Perry, 2004).

A obtenção higiênica do leite, portanto, é o primeiro ponto crítico no processo de fabricação de queijos e de outros derivados, uma vez que o animal, os equipamentos e o ambiente da ordenha podem representar uma fonte importante de contaminação por microrganismos (Brito & Portugal, 2003). Desta forma, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade (Jay, 1996).

A carga microbiana do leite procedente de vacas sadias é desprezível, a menos que o animal possua mastite sub-clínica (Early, 2000). Ressalte-se que a mastite altera a composição do leite e reduz a produtividade do rebanho, situações que se refletem tanto no nível de aproveitamento da matéria-prima pela indústria quanto na qualidade dos produtos lácteos, no caso, o queijo. A presença de resíduos de antibióticos no leite é uma consequência do tratamento da mastite e da não observância de procedimentos adequados (Gigante, 2005).

Segundo Hayes (1993), o leite recém ordenhado, em condições de assepsia, contém entre  $5 \times 10^3$  e  $5 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, constituídos de contaminantes procedentes dos galactóforos, equipamentos de ordenha e manipuladores, de modo que deve ser resfriado tão rapidamente quanto possível para manter a qualidade bacteriológica. Do ponto de vista de Perry (2004), o nível de bactérias presentes no leite brasileiro de boa procedência é menor que  $10^6$  UFC/mL, compatível com as exigências do MAPA.



Exigências são feitas para obtenção de boa qualidade microbiológica do leite, o que pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4°C, no máximo 2h após a ordenha. Essas práticas permitem que o leite mantenha a qualidade microbiológica por até 72h, não significando, no entanto, a ausência de bactérias, já que o leite é um meio próprio para o crescimento de microrganismos (Perry, 2004).

Nesse sentido, torna-se da maior importância o controle do estado de saúde dos animais, bem como a manutenção de melhores condições de higiene possíveis durante a ordenha, beneficiamento e distribuição, visando garantir que um produto de qualidade chegue ao consumidor final com as desejáveis características físicas, químicas e nutricionais (Bonfoh *et al.*, 2003).

Considerando-se as evidências de que o leite produzido e consumido no Brasil nem sempre apresenta a qualidade desejada, o Ministério da Agricultura publicou, juntamente com setores científicos e econômicos do setor leiteiro, uma versão definida das novas normas de produção leiteira na Instrução Normativa 51 (IN 51) de 18 de setembro de 2002, a qual determina normas de produção, identidade e qualidade de leites tipo A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado (Nero *et al.*, 2005). De acordo com as normas, pode-se incluir a matéria prima do queijo Serrano, leite cru, no Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite cru tipo C.

O conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades organolépticas e industriais. Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para a detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria prima (Noro *et al.*, 2006).

Para efeitos produtivos, consideram-se diferencialmente os seguintes produtos nitrogenados: caseínas, proteínas do soro do leite, e nitrogênio não protéico (Oliveira, 2006). As proteínas presentes no soro correspondem a 20% das proteínas do leite sendo que a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoalbumina representam de 70 a 80% do total de proteínas do soro (Morr & Ha, 1993).

### 2.3 Produção do Queijo Serrano

Como outros queijos artesanais produzidos em outras localidades, o queijo colonial Serrano, utiliza leite cru que ao chegar no local de fabricação é filtrado em pedaços de tecido para, em seguida, receber a adição de coalho bovino (Ide & Benedet, 2001). Durante o processo de produção, não há fervura do leite, pasteurização ou tratamento térmico para reduzir a contagem de microorganismos não desejáveis; portanto, a fermentação e a maturação ocorrem como resultado de um processo natural, ou seja, dependente apenas da microbiota existente (Souza *et al.*, 2003). Como resultado deste processo, observa-se nos queijos uma variação na microbiota existente de produtor para produtor, que se reflete nas características sensoriais e físico-químicas dos produtos.

Esta técnica artesanal caracteriza-se por utilizar as bactérias lácticas nativas provenientes do leite cru para acidificar o meio, bem como promover a fermentação da lactose (Ide & Benedet, 2001).

Segundo Machado *et al.* (2004), além da técnica de fabricação empregada para cada propriedade rural, a falta de controle na temperatura ambiente e na umidade relativa no local de produção e maturação constituem fatores de interferência nas determinações feitas nesses queijos.

De acordo com os resultados descritos por Souza *et al.* (2003) existe uma variação significativa na umidade durante o processo de maturação nos períodos de verão e inverno, enquanto que o pH apresenta variação significativa somente no verão. Um fator relevante para a variação encontrada na umidade de queijos Serrano, na região de Santa Catarina, é a diferença na tecnologia entre fazendas, com modificações na prensagem, tamanho dos queijos, teor de sal (Ide & Benedet, 2001). Segundo Furtado (1991), o pH do queijo influi no sabor e sobretudo nas reações químicas durante a maturação.

A técnica de produção de queijo Serrano não utiliza nenhum tipo de fermento láctico, embora, segundo Lisita (2005), sua aplicação no início do processamento de queijos seja uma das formas de aumentar a acidez rapidamente e de estabilizar e/ou diminuir a multiplicação de

patógenos. Entretanto, para queijo Serrano, o processo ocorre unicamente com a utilização do coalho (Souza *et al.*, 2003), o qual, juntamente com o ácido láctico promovem a coagulação enzimática do leite.

A função do coalho, utilizado em todos os tipos de queijo, exceto nos frescos tipo Cottage, é coagular a caseína presente no leite. O coalho é composto pela enzima (s) renina (quimosina) e/ou pepsina, fosfoproteínas de ação proteolítica que atuam hidrolisando as ligações peptídicas da caseína, transformando-a em para-caseína que precipita em presença de íons cálcio, formando, então, a coalhada. Para queijos produzidos por coagulação ácida, utilizam ácidos orgânicos que reduzem o pH até o ponto isoeletrico da caseína (4,5). O coágulo ácido é frágil e quebradiço, enquanto o coágulo enzimático é mais firme e elástico. Nesse pH as micelas de caseína agregam-se e precipitam. Pode-se ainda adicionar cloreto de cálcio para ajudar na formação e na estrutura (consistência) do coalho. É utilizado, principalmente, quando o teor de proteína do leite não é o ideal (Perry, 2004).

A salga do produto também é responsável pelas notáveis diferenças sensoriais, físico-químicas e microbiológicas encontradas entre queijos Serrano, uma vez que as quantidades de sal e maneira como são realizadas não apresentam um padrão comum entre os produtores. Segundo Machado *et al.* (2004), o procedimento de salga, como é feito manualmente, provoca adição de diferentes quantidades de sal na superfície dos queijos, podendo ser, juntamente com a umidade relativa e temperatura locais, uma das causas que afetam as características finais do produto. Para o queijo Serrano, o leite cru, depois de filtrado, é salgado com 4 a 18g de NaCl por litro de leite (Souza *et al.*, 2003).

O sal, além de conferir gosto característico ou realçar o sabor, complementa a dessoragem e regula a acidez do queijo, favorecendo a liberação de água livre na massa pela diferença de pressão osmótica, propicia a formação da casca, conserva a caseína e é um fator determinante da flora de maturação (Spreer, 1975).

### 2.3.1 Etapas do processamento do queijo Serrano

A região serrana produz grande quantidade de queijos coloniais, mas não se têm dados exatos da produção anual. Esses queijos, produzidos no meio rural, são fabricados, na maioria das vezes, sem cuidado higiênico na sua elaboração. Segundo Souza *et al.* (2003), são necessários aproximadamente 10L de leite para produzir queijos de 14 a 17cm de diâmetro, 4 a 7cm de altura e 800 a 1200 g de peso.

A rotina de produção de queijo Serrano envolve as etapas mostradas a seguir e pode ser visualizado no fluxograma de produção demonstrados na Figura 5.

a) Ordenha→ o leite é retirado dos animais pela manhã ou no final da tarde, com o auxílio de ordenhadeira, transportado em recipientes de plástico ou em tarros até a sala de processamento, sem ser refrigerado. Os recipientes vazios são lavados com água quente.

b) Filtração→ ao chegar na sala de produção, o leite ao ser despejado no tanque de fermentação é filtrado em pedaços de tecidos; alguns produtores utilizam tanques de aço inox enquanto outros ainda produzem de forma rudimentar; a capacidade dos tanques (inox) varia de produtor para produtor, sendo encontrado na grande maioria, tanques de aproximadamente 100L.

c) Coagulação→ o leite estando presente no tanque, sua temperatura é ajustada para 35°C. Adiciona-se o coalho e homogeneiza-se durante dois minutos, aproximadamente. Após, o leite fica em repouso e a coagulação é iniciada, com duração de 60 a 75 minutos.



Figura 2. Coagulação do leite durante o processo de produção de queijo Serrano.

d) Corte e dessoragem → uma vez alcançado o grau de consistência (Figura 2), a coalhada é cortada manualmente com auxílio de um utensílio denominado mexedor (Figura 3), logo após o corte, ocorre a mexedura que leva em torno de 3 minutos.

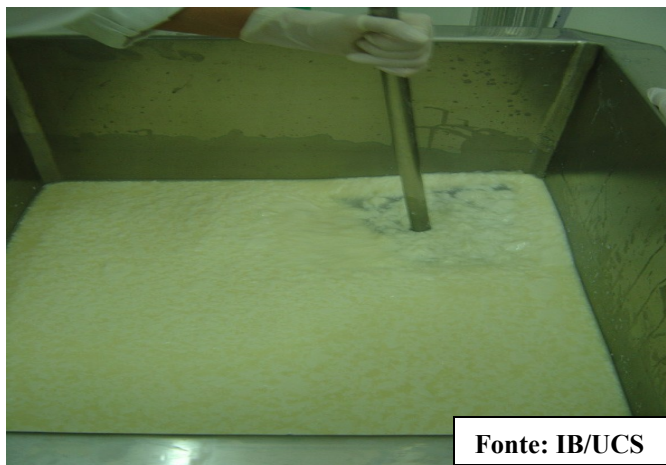


Figura 3. Corte do coalho, prévio à dessoragem.

Há um breve descanso antes da dessoragem, a qual é realizada empurrando-se a massa para um canto do tanque com auxílio de placas perfuradas que permitem a remoção do soro através de seus orifícios. O soro pode ser removido envolvendo-se a coalhada em sacos de tecidos tipo filó com prensagem manual. O soro é drenado a uma temperatura de 35-37°C (Souza *et al.*, 2003).

e) Enformagem → obtida a massa, esta é transferida para moldes plásticos, que variam sua capacidade de produtor para produtor, para ser então enformada (Figura 4). Em seguida, realiza-se a prensagem.

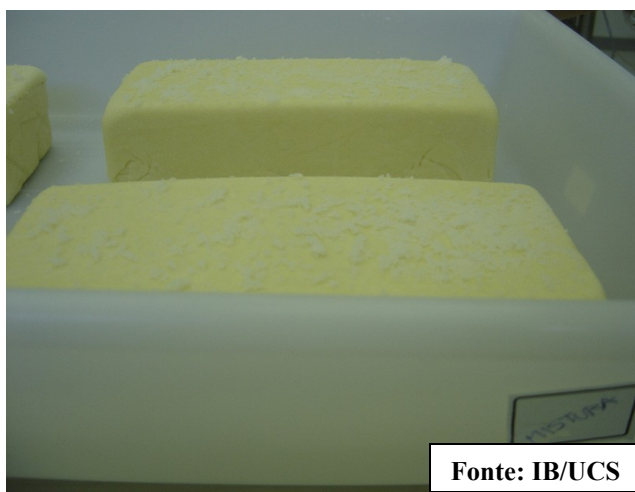


Figura 4. Queijo Serrano recentemente enformado com salga externa.

f) Prensagem 1 → com o auxílio de uma prensa, a massa contida no recipiente recebe pressão adequada, permanecendo por um período de tempo que varia de produtor para produtor, encontrando-se no intervalo de tempo de 4 a 8h.

g) Prensagem 2 → depois de realizada a primeira prensagem, o queijo é então virado, e prensado novamente.

h) Maturação → os queijos são maturados sem nenhum controle de temperatura e umidade, apresentando variações com a época do ano em que são produzidos e, em especial, com a casa de maturação. Durante a maturação, os queijos são invertidos diariamente e lavados com água quente uma vez por semana.

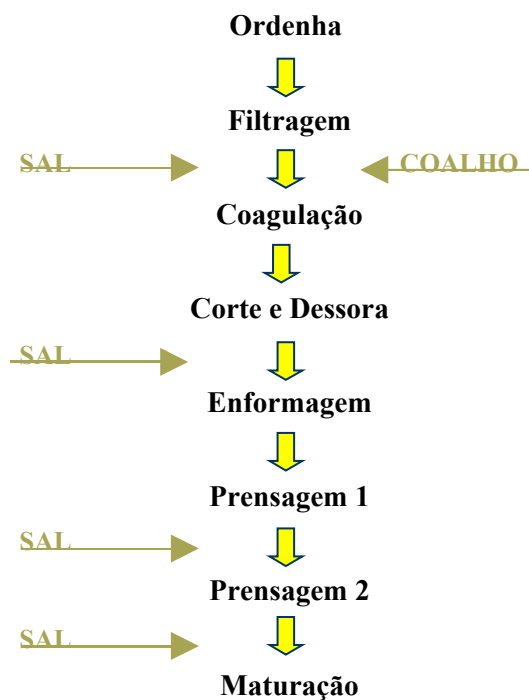


Figura 5. Fluxograma de produção do queijo Serrano.

## 2.4 Bactérias Lácticas

Com relação ao queijo Serrano, as bactérias que nele se encontram presentes podem ser consideradas dentro de um grupo definido como “non-starter lactic acid bacteria” (NSLAB), termo usado para descrever sua capacidade de crescer em baixas condições seletivas de pH, umidade,

temperatura e concentração de sal. As populações de NSLAB dependem, portanto, das condições do leite original e da seleção imposta durante o processo (Fitzsimons *et al.*, 1999).

Detalhando-se esse aspecto, tem-se que as bactérias ácido lácticas (BAL) representam um grupo heterogêneo de bacilos e cocos, Gram positivos, e em geral catalase negativos, não esporulados, microaerófilos ou anaeróbios facultativos que convertem os carboidratos em ácido láctico (Early, 2000). As bactérias lácticas podem ser adicionadas ou não no início da produção de queijo; quando não adicionadas utiliza-se somente aquelas que já ocorrem naturalmente no leite. Este último caso é normalmente utilizado na fabricação de queijos artesanais a partir de leite não pasteurizado (Perry, 2004).

As BAL compreendem tanto microrganismos patogênicos (como *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*), como microrganismos não patogênicos (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sp.*, entre outras), aplicadas durante milênios na fermentação de leite (Bolotin *et al.*, 2001).

Segundo Herreros *et al.* (2007), as BALs são consideradas um dos múltiplos fatores que afetam a textura, o sabor e o aroma de queijos. Em conjunto, Herreros *et al.* (2007) apresentam as BALs divididas em dois grupos: microrganismos capazes de produzir ácidos e microrganismos que não contribuem para a produção de ácidos, mas que geralmente apresentam um papel significativo no processo de maturação de queijos.

As bactérias lácticas, além de contribuírem no processo fermentativo e conseqüentemente na qualidade organoléptica (por meio da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas) e química do produto final, também influenciam favoravelmente na qualidade bromatológica do produto através do abaixamento do pH, competição direta com outras populações bacterianas, produção de bacteriocinas e outros produtos antimicrobianos que limitam o desenvolvimento e reduzem a viabilidade de contaminantes espoliadores e/ou patogênicos (Piard & Desmazeand, 1991; Alexandre *et al.*, 2002; Sallami *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo a avaliação de populações de bactérias lácticas durante o processo de produção de queijos apontam para a contribuição de vários gêneros e espécies bacterianas, que se alternam durante as distintas fases da maturação. No caso do queijo Minas, *Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris* representam, respectivamente, 95 e 5% das bactérias lácticas presentes ou inoculadas (Ferreira *et al.*, 1992).

Os métodos utilizados para identificação dos microrganismos, durante décadas, foram baseados no comportamento bioquímico frente aos mais variados substratos. Os testes chamados "convencionais" para caracterização de um determinado microrganismo são baseados na observação da capacidade deste microrganismo de realizar determinadas reações bioquímicas. Nos últimos anos, várias técnicas têm sido propostas e avaliadas para simplificar e melhorar a precisão dos resultados de identificação de microrganismos. Os novos métodos podem ser classificados em três grandes grupos: técnicas bioquímicas miniaturizadas, técnicas imunológicas e técnicas genéticas (Franco & Langraf, 2002).

A identificação fenotípica clássica de BAL em produtos lácteos depende, principalmente, de critérios fisiológicos e bioquímicos. Entretanto, identificação em nível de espécie é demorada e freqüentemente ambígua. Devido a esse fato, muitas pesquisas têm se direcionado para o desenvolvimento de novos métodos fenotípicos que melhorem a identificação destes microrganismos. Métodos taxonômicos modernos aplicados às BALs envolvem a identificação molecular e incluem análises fenotípicas e genotípicas (Pérez *et al.*, 2000).

O API® (Biomérieux, França) é provavelmente o sistema de diagnóstico de Enterobacteriaceae mais largamente utilizado. Originalmente, esta base de dados era muito forte para isolados clínicos, mas nos últimos anos, tem sido expandida para cobrir isolados alimentícios, ambientais e industriais. Esta galeria vem sendo amplamente testada, com uma exatidão de resultados de 90,2 a 93% (Entis *et al.*, 2002).

Inúmeros trabalhos desenvolvidos com diversos tipos de queijos a nível mundial, apontam para a importância dos inoculantes e de suas composições para a qualidade dos produtos finais



(Centeno *et al.*, 1994; Cuesta *et al.*, 1996; Fontán *et al.*, 2001). Entre os gêneros mais comumente usados como bactérias lácticas iniciadoras em queijos incluem-se *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Perry, 2004).

Em se tratando de queijo Serrano, conforme dados levantados através de pesquisas, existe indicação de que as populações de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, e *Leuconostoc*) variam ao longo do processo de produção e maturação. De um modo geral, *Lactobacillus* são as bactérias lácticas preponderantes (> 50%) em todas as fases, enquanto *Lactococcus* estão presentes no início do processo, sofrendo redução ao longo do processamento, e *Enterococcus* aumentam em número no final do processo de maturação (Souza *et al.*, 2003). Entretanto, dados experimentais relativos à utilização de fermentos lácticos em queijos Serranos não são disponíveis.

## **2.5. Caracterização molecular de bactérias lácticas**

As bactérias ácido lácticas são de grande importância para indústrias de laticínios e outras indústrias de alimentos fermentados (Pérez *et al.*, 2000). Atualmente, as utilizações e aplicações propostas quanto ao uso de BALs, em diversos setores, têm crescido notoriamente. A partir deste aumento crescente, cria-se a necessidade de identificá-las de forma prática e precisa. A determinação e análise do genoma das bactérias lácticas, devido à sua enorme importância industrial, tem sido uma prioridade, pois, fornece informações para identificação e desenvolvimento das BALs não patogênicas e de interesse econômico (Fitzsimons *et al.*, 1999).

Em conjunto, Fitzsimons *et al.* (1999), têm evidenciado relação entre a presença destas bactérias e as características organolépticas.

O grande aumento na utilização de linhagens especializadas de BALs, em produtos fermentados e como culturas na produção de queijos, exigiu uma atenção especial na identificação destas linhagens. Além dos métodos clássicos de identificação (bioquímicos e morfológicos),

recentemente, muitas abordagens foram desenvolvidas para identificação molecular de bactérias, incluindo o uso de técnicas moleculares específicas, como plasmídeos modelo e eletroforese de campo pulsado. Estas técnicas oferecem um aumento na confiabilidade da identificação das linhagens, mas não são convenientes para utilização na rotina de laboratório (Welsh & McClelland, 1990).

Testes físico-químicos, bioquímicos e fenotípicos têm sido utilizados frequentemente para identificar taxonomicamente a microbiota de queijos. O desenvolvimento de técnicas moleculares de PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia pela Polimerase), para identificação de espécies bacterianas, oferece novas perspectivas nos estudos relacionados à filogenia e à taxonomia microbiana (Terzic-Videjevic *et al.*, 2007).

A técnica baseada em PCR é um dos mais importantes avanços na área de métodos rápidos em Microbiologia. Com esta técnica, é possível sintetizar milhares de cópias a partir de um único fragmento de DNA (Franco & Langraf, 2002). Dependendo do tipo de *primer* utilizado e das condições da reação, a amplificação aleatória de genomas bacterianos geram identificações adequadas para caracterização de gênero, espécie ou linhagens específicas (Fani *et al.*, 1993).

Para os marcadores moleculares baseados na técnica de PCR, na qual fragmentos de DNA são amplificados, encontram-se RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Em adição, para a análise de PCR com *primers* específicos, podem-se citar: TAP (*Triplicate Arbitrarily Primed*), REP (*Repetitive Element Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX (*BOX Element*) (Versalovic *et al.*, 1994).

De forma restrita, o seqüenciamento do genoma de algumas das mais importantes bactérias lácticas foi concluído, entre elas *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (linhagem IL1403) (Bolotin *et al.*, 2001), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus plantarum* ([www.cbs.dtu.dk/serevices/GenomeAtlas](http://www.cbs.dtu.dk/serevices/GenomeAtlas)).

O seqüenciamento de genes conservados, como rRNA (RNA ribossômico), amplificados por PCR é uma das metodologias moleculares mais usadas para a identificação de microrganismos.

Entretanto, a técnica de seqüenciamento requer equipamentos especiais e a realização do procedimento com centenas de isolados apresenta custo elevado (Moreira *et al.*, 2005).

Estudos mostram a necessidade de avaliar a heterogenicidade entre as linhagens bacterianas (Fitzsimons *et al.*, 1999). A análise por meio de RAPD tem sido utilizada para estimar a diversidade entre vários gêneros de bactérias tais como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus* isoladas de muitas origens (Baruzzi *et al.*, 2002) e a seqüência do 16S rRNA para a identificação taxonômica de biotipos.

A população de NSLAB no queijo Cheddar correspondem a *L. paracasei* (55%), *L. plantarum* (28%), e *L. curvatus* (14%) (Jordan & Cogan, 1993). No caso do queijo Genetoso, a população bacteriana encontrada foi: 137 linhagens caracterizadas como *Lactobacillus*, 125 *Lactococcus*, 58 *Leuconostoc* (González *et al.*, 2007).

De acordo com Psoni *et al.* (2003), o método de RAPD foi utilizado para explorar a diversidade genética de um total de 40 isolados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obtidos a partir de três queijos de leite de cabra cru. Para Baruzzi *et al.* (2002), a realização de testes bioquímicos e avaliação molecular a partir de RAPD, permitiram a caracterização e a evolução da microbiota láctica.

A utilização de identificação molecular por método de PCR tem sido aperfeiçoada pelo uso de um único *primer* arbitrário e degenerado de baixo poder de anelamento, o que permite ligar o DNA genômico em regiões, as quais possuem total ou parcial homologia, resultando na formação de produtos de PCR com regiões de amplificação em torno de 1000 pares de bases (Cusick & O'Sullivan, 2000). Este método de amplificação TAP-PCR, que utiliza um *primer* específico com regiões conservadas dentro do 16S rRNA, foi avaliado para identificação molecular de um vasto grupo do gênero de BAL (Cusick & O'Sullivan, 2000).

Sohier *et al.* (1999) utilizaram os métodos convencionais de amplificação de DNA para conduzir a identificação molecular de *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus brevis*. A identificação genômica de ambas as espécies ocorreu pela utilização da técnica RAPD-PCR e por

REP-PCR. Um único *primer* correspondente a uma seqüência arbitrária pode ser utilizado para gerar seqüências genômicas (William *et al.*, 1990).

O método REP-PCR, desenvolvido por Versalovic *et al.* (1991), é utilizado para avaliar o grau de similaridade entre diferentes isolados e, assim, produzir uma identificação espécie-específica. Este método utiliza uma curta seqüência repetitiva, altamente conservada, denominada de seqüência consenso (REP). Esta seqüência encontra-se presente inteiramente nas eubactérias, tem sido demonstrada por Gilson *et al.* (1991) que sua localização é conservada dentro de espécies bacterianas.

Em conjunto, Terzic-Videjevic *et al.* (2007) observaram mudanças nas populações de bactérias ácido lácticas através da identificação pelo método de REP, bem como na avaliação da composição química durante o período de maturação do queijo Zlata, também produzido com leite cru, por até 60 dias.

De acordo com Lindsay & Sharp (2006), o método de ERIC, também descrito como unidades repetitivas intergênicas, difere da maioria das outras seqüências repetitivas pelo fato de estas seqüências estarem distribuídas em grande número de espécies. As seqüências ERIC foram descritas primeiramente em *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e na maioria das enterobactérias, inclusive *Vibrio cholerae* (Hulton, 1991). O método de ERIC-PCR tem sido utilizado para investigar um vasto grupo de espécies bacterianas, igualmente para eucariotos, apesar do fato de muitos estudos demonstrarem evidências quanto a presença destas seqüências ERIC somente dentro do genoma de *Enterobacteriaceae* e espécies de *Vibrio* (Lindsay & Sharp, 2006).

De acordo com Bornet & Branchard (2001) outras abordagens e técnicas têm sido utilizadas para identificar o polimorfismo genético, bem como facilitar estudos em variabilidade, podendo citar os marcadores moleculares ISSR, os quais são marcadores semi-arbitrários amplificados pelo método de PCR na presença de um *primer* complementar para a seqüência microssatélite e, assim como RAPD, não requerem informação da seqüência amplificada. Cada banda amplificada

corresponde à seqüência delimitada por dois microssatélites invertidos, possuindo assim, maior reprodutibilidade devido ao maior comprimento dos primers (Zietkiewicz *et al.*,1994).

Este método amplamente utilizado em eucariotos, principalmente plantas e animais, tem tido raras aplicações em bactérias. De acordo com Muller *et al.* (2007), estudos realizados em *Proteus mirabilis* demonstraram baixa confiabilidade quanto à caracterização de isolados bacterianos. Dado este que contrasta com as observações de outros autores, os quais consideram as repetições em “tandem” como um sistema eficiente para a identificação bacteriana.

Nos estudos de diversidade genética, pode-se incluir o método de amplificação por marcador BOX, o qual amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic *et al.*, 1994). Famílias de seqüências de DNA repetitivos altamente conservadas estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (Lupski & Weinstock, 1992). Oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir das regiões flanqueadoras destas seqüências repetitivas e, quando usados em PCR, produzem uma amplificação seletiva de regiões genômicas localizadas entre os elementos BOX (Versalovic *et al.*, 1994). Os produtos de amplificação mostram um perfil específico para espécie e sub-espécie (Lupski & Weinstock, 1992).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O desenvolvimento deste trabalho foi realizado inteiramente no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

#### **3.1 Seleção das amostras de queijo**

As amostras de queijos Serrano foram coletadas nos municípios de Caxias do Sul, Bom Jesus e São Francisco de Paula, ao longo do processo de maturação (a cada 7 dias) e produto final do queijo Serrano.

#### **3.2 Amostragem**

Durante o período de junho a dezembro de 2005, foram amostrados diversos produtos ao longo da linha de produção do queijo Serrano. Um total de 62 bactérias lácticas foram isoladas e avaliadas a partir de doze queijos do tipo Serrano. O meio utilizado para crescimento das bactérias foi o meio Rogosa e meio M17, de acordo com procedimento descrito por Souza *et al.* (2003).

A amostragem consistiu de:

- a) cinco queijos maturados, sem licença de inspeção municipal, comercializados com a denominação de queijo Serrano em estabelecimentos comerciais de Caxias do Sul e Bom Jesus: IBLac101 a IBLac108 e IBLac126 a IBLac133;
- b) cinco queijos maturados, com licença de inspeção municipal, comercializados com a denominação de queijo Serrano em estabelecimentos comerciais e agroindústrias de Caxias do Sul: IBLac109 a IBLac125;
- c) dois queijos com acompanhamento do processo de produção (leite, coalhada e períodos de maturação, de 7 a 70 dias) coletados semanalmente, os quais correspondem a IBLac141 a IBLac170.

### **3.3 Isolamento e seleção das bactérias lácticas**

Foram pesados 25g de amostra, diluídos em 225mL de salina 1% peptonada tamponada (1% peptona, 0,5% cloreto de sódio, 0,35% fosfato dissódico, 0,15% de fosfato monopotássico, pH 7,2) e homogeneizadas. A partir desta, foram feitas seis diluições 1:10 seriadas em solução salina. Foi plaqueado 0,1mL de cada uma, em duplicata, em meio Rogosa ágar (1% peptona de caseína, 0,5% extrato de levedura, 2% dextrose, 0,6% fosfato de potássio monobásico, citrato de amônia 0,2%, 0,1% Tween 80, 1,5% acetato de sódio, 0,0575% sulfato de magnésio, 0,0034% sulfato de ferro II, 0,012% sulfato de manganês, 1,5% ágar, pH 5,5).

As colônias foram crescidas em atmosfera microaerófila e armazenadas a 28°C durante 72 horas. Foram selecionadas diferentes colônias e repicadas em meio ágar MRS-Man, Rogosa & Sharpe (1% peptona, 0,8% extrato de carne, 0,4% extrato de levedura, 2% glicose, 0,1% monooleato de sorbitano, 0,2% fosfato dipotássico, 0,5% acetato de sódio, 0,2% citrato de amônia, 0,02% sulfato de magnésio, 0,005% sulfato de manganês, 1,5% ágar, pH 6,2).

As placas foram armazenadas em atmosfera microaerófila a 28°C durante 72 horas. Foi coletada uma colônia isolada de cada placa. As colônias foram armazenadas em tubos inclinados contendo meio MRS (cobertas com Nujol) e também congeladas em 400µL de MRS adicionados de 400µL de glicerina 40%. Para cada colônia isolada, foi feita a coloração de Gram seguida de análise microscópica.

### **3.4 Identificação bioquímica de bactérias lácticas**

Para identificação do gênero, todas as amostras isoladas foram submetidas a coloração de Gram, prova microscópica, teste catalase, teste de crescimento em 10 e 45°C em meio MRS, tolerância em 6,5% NaCl em meio LB, produção de gás carbônico a partir de glicose, atividade proteolítica de degradação da caseína e coagulação do leite.

Para identificação das espécies, as amostras foram caracterizadas por teste de fermentação de 22 carboidratos, selecionados a partir da galeria API50® (BIOMÉRIEUX, França). Este teste foi realizado com adaptação da metodologia proposta pela empresa Biomérieux (2001) e pela descrição feita por Conter *et al.* (2005).

### **3.5 Preparo das amostras para amplificação molecular:**

Para identificação molecular, todas as bactérias foram crescidas em 1mL do meio MRS, 18-24h a 37°C. Após este período, as amostras foram homogenizadas em vórtex e diluídas em água destilada esterilizada. Desta suspensão de células, volumes específicos para cada técnica foram transferidos juntamente com uma reação final (tampão, nucleotídeos e Taq polimerase) como material a ser amplificado em TAP, RAPD, ERIC, ISSR, BOX, e REP-PCR.

### **3.6 Caracterização molecular de bactérias lácticas em queijos do tipo Serrano por TAP- PCR**

“Fingerprinting” genético dos isolados foi obtido através de “*triplicate arbitrary primer PCR*” (TAP-PCR), de acordo com o método proposto por Swearingen *et al.* (2001). Para conduzir o TAP, foi utilizado uma suspensão de células para cada cultura.

O *primer* utilizado foi 5' CAGCAGCCGCGGTAAT(W)C 3'. A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador (MJ Research PT100, Watertown, Mass, EUA). As temperaturas de anelamento foram de 38, 40 e 42°C. As reações (volume final 25µL) continham 9,2µL da água Milli-Q (esterilizada); 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25% Triton X100, 30 pMoles do *primer*, 1,5 unidade Taq DNA polimerase Invitrogen e 4µL de suspensão bacteriana diluída 1:50.

### **3.7 Caracterização molecular dos isolados através de marcadores RAPD-PCR**

Para a amplificação de DNA com marcadores moleculares RAPD, foram utilizados inicialmente 60 *primers* dos kits A, B e Z da Operon Technologies (Alameda, Califórnia, EUA),



que foram testados com as amostras selecionadas. Com base nos resultados obtidos, oito *primers* foram selecionados quanto ao número de bandas, intensidade das bandas e reproducibilidade (Tabela 2). As reações de RAPD foram realizadas em volume final de 25µL de acordo com o protocolo otimizado do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada. A reação para amplificação foi constituída de 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25% Triton X100, 50mM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 60 pMoles de *primer*, 1,5 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 12,88µL de água Milli-Q (esterilizada) e 2µL de suspensão bacteriana diluída 1:50.

As amplificações foram desenvolvidas utilizando termociclador (MJ Research PT100, Watertown, Mass, EUA). Os parâmetros de termociclagem para desnaturação, anelamento e extensão de fitas de DNA foram: 92°C por 4 minutos, seguidos por 39 ciclos de 92°C (45 seg), 40°C (1 min e 30 seg), 72°C (2 min), extensão final por 5 minutos a 72°C e, por fim, resfriamento a 4°C durante 5 min.

### **3.8 Caracterização molecular dos isolados através de marcadores ISSR**

Para a amplificação de DNA com marcadores molecular ISSR, foram selecionados cinco *primers* com base na reproducibilidade, distribuição, número e intensidade das bandas a partir de vinte *primers* iniciais (Tabela 3).

As reações de ISSR (volume final de 25µL) continham 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2% de formamida, 100µM de cada dNTP, 12,5 pMoles de *primer*, 1,5 unidade de Taq DNA polimerase, 11,95µL de água Milli-Q esterilizada; e 6µL de suspensão bacteriana diluída 1:40. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research INC., Watertown, Mass, EUA) com as seqüências de tempo e eventos: um ciclo inicial de 5 minutos a 92°C seguido por 40 ciclos a 94°C por 1 min para abertura de fitas de DNA, 45 segundos a uma temperatura específica para cada primer (42 a 56°C) para anelamento do *primer*, 2 minutos a 72°C para extensão da fita de DNA e extensão final por 5 minutos a 72°C, sofrendo resfriamento por 5 minutos a 4°C.

### 3.9 Caracterização molecular dos isolados através de marcador ERIC-PCR

Para amplificação de material genético com marcadores moleculares ERIC-PCR foram utilizados os seguintes primers: ERIC1- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C e ERIC2- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G. As reações foram realizadas de acordo com o protocolo otimizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada e continham (25µL volume final) 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25% Triton X100, 200µM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 30 pMoles de cada *primer*; 1,5 unidades de Taq DNA polimerase, 10,2µL de água Milli-Q esterilizada e 4µL de suspensão bacteriana diluída 1:40. O termociclador utilizado para amplificação dos segmentos de DNA foi MJ Research, Watertown, Mass, EUA.

Os produtos foram amplificados a partir dos parâmetros de termociclagem para desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA, o qual consistiu nas seguintes seqüências de tempo e eventos: 10 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 42°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final por 10 minutos a 72°C, sofrendo resfriamento por 10 minutos a 4°C.

### 3.10 Caracterização molecular dos isolados através de marcador BOX-PCR

Para a realização deste estudo, foi utilizado um único *primer* para amplificação do material genético analisado, sendo 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'. As reações de BOX continham: 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25% Triton X-100, 200µM de cada dinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 30 pMoles do *primer*, 1,5 unidade Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10,2µL de água Milli-Q esterilizada e 4µL de suspensão bacteriana diluída 1:50, apresentado volume final de 25µL.

A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research INC., Watertown, Mass, EUA) com a seguinte seqüência de tempos e eventos: desnaturação por 5 minutos a 94°C, 35 ciclos com

desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 2 minutos a 55°C, uma extensão por 2 minutos a 72°C e extensão final por 10 minutos a 72°C, sofrendo resfriamento por 15 minutos a 4°C.

### 3.11 Caracterização molecular dos isolados através de marcadores REP-PCR

Para este estudo foram utilizados dois oligonucleotídeos denominados REP1R-I e REP2-I com as seguintes seqüências respectivamente 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'; 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' (I- inosina). A reação de amplificação continha: 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25% Triton X-100, 200µM de cada dinucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 15 pMoles de cada *primer*, 1,25 unidade Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10,2µL de água Milli-Q esterilizada e 4µL de suspensão bacteriana diluída 1:40. Depois da primeira desnaturação, a 94°C por 5 minutos, cada amplificação consistiu de 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 1 minuto a 50°C de temperatura de anelamento dos *primers*, uma extensão por 2 minutos a 72°C e uma extensão final por 10 minutos a 72°C, sofrendo resfriamento por 10 minutos a 4°C.

### 3.12 Separação dos segmentos amplificados

Os produtos obtidos pelos marcadores foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão TBE 1X (50mM Tris, 50mM ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,3) sob corrente constante de 90 volts. A extensão de bandas, para todos os *primers* selecionados, seguiu um padrão de 6cm de corrida. Os géis foram corados com 0,5 µg de brometo de etídio (Sigma)/mL e as bandas visualizadas e fotografadas em sistema UV-VIS®. O tamanho dos produtos amplificados foi determinado por comparação com DNA de fagoλ digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. O peso molecular das bandas foi determinado utilizando o programa LabImage ([www.labimage.net](http://www.labimage.net)).

### 3.13 Análise dos dados

Os produtos amplificados obtidos na análise dos géis foram utilizados para a construção de matrizes de similaridade (distâncias de Jaccard), codificando presença (1) ou ausência (0) dos fragmentos. Para fins de análise, foram considerados todos os fragmentos entre 100 e 2000 pares de bases. A matriz binária (1/0) foi utilizada para cálculo dos coeficientes de similaridade Jaccard entre cada par de acessos. A relação entre as populações foi avaliada através da construção de dendrogramas utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages*). As análises estatísticas multivariadas foram realizadas com o auxílio do programa computacional SPSS versão 11.0 e Mega 2.0. A análise de permutações foram realizadas com o auxílio dos programas Winboot (Yap e Nelson, 1996).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados do presente trabalho foram separados em dois itens de acordo com os objetivos estabelecidos. Num primeiro momento, são apresentados os resultados referentes à avaliação de bactérias lácticas isoladas de queijos tipo Serrano maturados, comercializados na região serrana do Rio Grande do Sul. Num segundo momento, a análise das bactérias lácticas isoladas durante o processo de fabricação e maturação de queijo Serrano.

### **4.1. Caracterização morfológica e bioquímica das bactérias lácticas presentes em queijos tipo Serrano maturados**

Um total de 33 isolados de bactérias lácticas foram obtidos de doze queijos do tipo Serrano comercializados na região de Caxias do Sul e Bom Jesus. As bactérias lácticas foram isoladas em meio MRS por plaqueamento das amostras processadas de acordo com os procedimentos preconizados pelo Ministério da Agricultura e ANVISA.

A maior parte dos queijos apresentou mais de um tipo de colônia sendo que nos queijos A, K e L foram evidenciados quatro tipos morfológicos (Tabela 1). Todas as bactérias isoladas apresentaram forma de bacilos Gram positivos e catalase negativos, características das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Os isolados fermentaram glicose (acidificação do meio) mas não produziram gás, caracterizando-se como bactérias lácticas homofermentativas.

Dezenove dos 33 isolados (57%) exibiram crescimento a 10°C, característica considerada importante nas bactérias lácticas, pois permite a maturação de queijos em temperaturas relativamente baixas, o que, de um modo geral, favorece o desenvolvimento de produtos de melhor qualidade organoléptica e microbiológica (Cromie *et al.*, 1987). Sessenta por cento (vinte isolados) apresentaram crescimento a 45°C, sendo que 42% dos isolados bacterianos cresceram em ambas temperaturas limite.

**Tabela 1.** Características morfológicas e bioquímicas de bactérias lácticas isoladas de queijos tipo Serrano comercializados.

Cultura	Queijo	Gram	Formato	Catalase	Cresc. 10°C	Cresc. 45°C	LB*	LB* 6,5% NaCl	Ferm. Glicose	Ativ. Proteolítica	Coagulação
IBLac101	A	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,438	+
IBLac102	A	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,575	+
IBLac103	A	+	Bacilo	-	+++	++	+	-	+	4,206	+
IBLac104	A	+	Bacilo	-	-	+++	+	+	+	3,325	+
IBLac105	B	+	Bacilo	-	-	+++	+	+	+	3,188	+
IBLac106	B	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,878	+
IBLac107	C	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,151	+
IBLac108	C	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	2,418	+
IBLac109	D	+	Bacilo	-	+	-	+	+	+	3,413	+
IBLac110	E	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	4,275	+
IBLac111	E	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	4,023	+
IBLac112	F	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	3,000	+
IBLac113	F	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	3,465	+
IBLac114	F	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,780	+
IBLac115	E	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	4,458	+
IBLac116	G	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	4,100	+
IBLac117	G	+	Bacilo	-	+	+++	+	+	+	3,623	+
IBLac118	G	+	Bacilo	-	++	++	+	+	+	3,713	+
IBLac119	H	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	3,397	+
IBLac120	H	+	Bacilo	-	+++	++	+	+	+	3,795	+
IBLac121	I	+	Bacilo	-	+++	-	+	+	+	1,443	-
IBLac122	I	+	Bacilo	-	+++	++	+	-	+	4,177	+
IBLac123	I	+	Bacilo	-	+++	-	+	+	+	2,488	esc
IBLac124	J	+	Bacilo	-	+++	++	+	-	+	3,753	+
IBLac125	J	+	Bacilo	-	+++	-	+	+	+	2,703	esc
IBLac126	K	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	3,646	+
IBLac127	K	+	Bacilo	-	-	-	+	+	+	2,568	+
IBLac128	K	+	Bacilo	-	+	+++	+	+	+	3,135	+
IBLac129	K	+	Bacilo	-	+++	-	+	+	+	3,032	+
IBLac130	L	+	Bacilo	-	-	+++	+	+	+	3,750	+
IBLac131	L	+	Bacilo	-	+	+++	+	+	+	3,684	+
IBLac132	L	+	Bacilo	-	++	+	+	+	+	3,188	+
IBLac133	L	+	Bacilo	-	+	-	+	+	+	2,685	+

\* Caldo Lúria-Bertani

esc. – escureceu o meio

(+) pouco crescimento; (++) crescimento intermediário; (+++) elevado crescimento; (-) ausência de crescimento

Ativ. Proteolítica= diâmetro do halo (cm)/diâmetro do crescimento (cm).

Noventa por cento (30 isolados) mostraram-se halotolerantes, sendo capazes de crescer em meio contendo 6,5% de cloreto de sódio. Esta característica é essencial na produção de queijos, inclusive o queijo Serrano, já que no seu processamento ocorre a adição de sal para ressaltar o sabor

e, também, servir como agente seletivo para microrganismos. Bactérias halotolerantes foram identificadas em grande número em distintos tipos de queijos, inclusive no queijo Serrano (Souza *et al.*, 2003).

Como pode ser observado na Tabela 1, todos os isolados apresentaram atividade proteolítica, sobressaindo-se os isolados IBLac 121 e IBLac 122, ambos obtidos do queijo I. Da mesma forma, com exceção da cepa IBLac 121, os lactobacilos isolados de queijo Serrano exibiram capacidade de coagulação do leite, evidenciada na forma de halos de precipitação de caseína. A atividade proteolítica é essencial durante a maturação de queijos, sendo os lactobacilos os principais microrganismos responsáveis pela proteólise da caseína (Morea *et al.*, 1999).

A predominância de lactobacilos em queijos do tipo Serrano maturados foi constatada por Souza *et al.* (2003) e Andrade *et al.* (2006). Segundo estes autores, as bactérias lácticas presentes no queijo Serrano são lactobacilos, lactococos, enterococos e *Leuconostoc*. Estas populações bacterianas oscilam durante o processo de maturação, mas, sempre com a predominância de lactobacilos. A sobrenumeração de lactobacilos ao longo do período de maturação de queijos é atribuída à alta tolerância à acidez por parte destas bactérias (Caridi *et al.*, 2003). Considerando-se a elevada frequência destas bactérias ao longo de todo o processo, Souza *et al.* (2003) concluíram que os lactobacilos são os principais responsáveis pelas características organolépticas do queijo Serrano.

Entre outras características, uma diferença fundamental entre o queijo Serrano (oriundo do RS e SC) e o queijo do Serro de Minas Gerais, diz respeito às populações de bactérias lácticas utilizadas ou preponderantes. Enquanto no queijo Serrano predominam *Lactobacillus* oriundos do próprio leite e coalho (Souza *et al.*, 2003), o queijo do Serro é produzido adicionando-se um fermento composto por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris* (Ferreira *et al.*, 1992).

**Tabela 2.** Caracterização de isolados de *Lactobacillus* com base na capacidade de utilização de fonte de carbono.

	Glicerol	L. Arabinose	D Xilose	Galactose	Glicose	Frutose	Manose	Ramnose	Manitol	Sorbitol	Arbutina	Maltose	Lactose	Sacarose	Trehalose	Melezitose	Ribose	Esculina	Salicina	Inulina	Amido	Espécie Provável	Probabilidade*
Lac128	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,85
Lac101	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>L. paracasei</i>	0,76
Lac127	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,80
Lac104	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,87
Lac107	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,87
Lac105	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. paracasei</i>	0,82
Lac106	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. paracasei</i>	0,82
Lac133	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,81
Lac102	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>L. paracasei</i>	0,75
Lac113	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>L. paracasei</i>	0,89
Lac103	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i>	0,87
Lac110	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>	0,92
Lac118	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>	0,92
Lac117	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,78
Lac122	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,78
Lac109	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,80
Lac111	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,76
Lac115	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,76
Lac112	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,82
Lac120	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,82
Lac124	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,82
Lac125	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,82
Lac126	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,82
Lac119	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>	0,75
Lac108	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>	0,71
Lac114	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,74
Lac116	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,74
Lac130	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>L. plantarum</i>	0,84
Lac131	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,79
Lac132	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>L. plantarum</i>	0,87
Lac123	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>L. delbrueckii</i>	0,91
Lac121	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	<i>L. brevis</i>	0,71
Lac129	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>L. brevis</i>	0,92

\*A probabilidade corresponde a média das probabilidades individuais de assimilação de fontes de carbono com base na tabela do catálogo do sistema API50CHL da BioMérieux, S.A .

Conforme pode ser visualizado na Tabela 2, a análise da capacidade de utilização de fontes de carbono permitiu separar os isolados em quatro espécies, sendo onze isolados pertencentes ao grupo *Lactobacillus paracasei*, dezenove pertencentes a *L. plantarum*, dois representantes de *L. brevis* e um isolado classificado como *L. delbrueckii*. Nenhuma das características de fermentação



foi específica de uma das espécies, sendo a classificação decorrente da combinação de resultados.

Todos os isolados apresentaram capacidade de fermentação de glicose e frutose. Apenas o isolado IBLac129, classificado com *L. brevis*, foi incapaz de metabolizar a manose. Da mesma forma, apenas o isolado IBLac 123, classificado com *L. delbruekii*, mostrou-se maltose negativo. O isolado IBLac119 foi o único a produzir ácido a partir de glicerol, característica rara na espécie de *L. plantarum*.

A separação dos isolados IBLac123, IBLac121 e IBLac129, como espécies distintas ao restante dos isolados, ocorreu principalmente devido às características: salicina negativa e arbutina negativa.

Alguns isolados classificados como *L. paracasei* apresentaram características fermentativas anormais para esta espécie, como a capacidade de fermentação de amido por IBLac101, IBLac102, IBLac105, IBLac106 e IBLac113, a produção de ácido a partir de D-xilose exibida pelo isolado IBLac102 e a reação negativa para arbutina do isolado IBLac127. Os cinco casos positivos para fermentação de amido foram duvidosos (baixa produção de ácido), fato esperado considerando-se a presença de maltotriose e outros polímeros de glicose de baixo peso molecular presentes na solução de amido que podem ser fermentados por alguns isolados mesmo não amilolíticos. Este ocorrência se torna particularmente relevante considerando-se a alta frequência de isolados maltose positivos. Além disso, cabe ressaltar que a chave de classificação utilizada não inclui todas as espécies de *Lactobacillus*, em particular, uma espécie altamente relacionada com *L. paracasei*, qual seja *L. casei*. Desta forma, no presente trabalho ambas espécies foram consideradas como grupo “paracasei”.

De acordo com a classificação bioquímica dos isolados de queijo Serrano, 57,6% foram *L. plantarum*, 33,3% *L. paracasei*, 6% *L. brevis* e 3% *L. delbruekii*.

A prevalência de distintas espécies de *Lactobacillus* identificadas no presente trabalho corroboram dados obtidos na análise microbiológica de outros queijos produzidos com leite cru sem adição de inoculante (Garabal, 2007). Neste sentido, Pérez *et al.* (2000) constataram cinco espécies

de *Lactobacillus* em queijo Tenerife, sendo as espécies predominantes *L. plantarum* (52,1%) e *L. paracasei* ssp. *paracasei* (36,6%), com baixa prevalência de *L. brevis*, *L. curvatus* e *L. pentosus*. Da mesma forma, López & Mayo (1997) constataram a presença de *L. plantarum* (41,1%), *L. casei* subsp. *pseudopantarum* (35,3%), *L. curvatus* (19,6%), e 4% de outros *Lactobacillus* não classificados.

Em levantamento realizado em queijos espanhóis tradicionais produzidos artesanalmente, pôde-se observar a presença de *L. plantarum*, *L. casei* e *L. curvatus*. Já estudos realizados em queijo Cheddar mostram que a espécie preponderante é *L. paracasei* (96,4%), observando-se, ainda, *L. plantarum* (2,1%), *L. curvatus* (0,3%), *L. brevis* (0,3%) e 0,9% de outras espécies não definidas (Fitzsimons *et al.*, 1999). Entretanto, de acordo com Peterson & Marshall (1990), a frequência das distintas espécies de *Lactobacillus* varia dependendo do local de produção e do ponto de maturação dos queijos tipo Cheddar.

A dificuldade de classificação de *Lactobacillus* com base no seu perfil de utilização de carboidratos é conhecida. De acordo com o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, várias espécies de *Lactobacillus* são de difícil classificação pelo uso apenas de testes bioquímicos. Por exemplo, a utilização de painéis de carboidratos não foi suficiente para separação de *L. fermentum* e *L. reuteri*, isolados de amostras de gastrointestinais de suínos (Pancheniak & Soccol, 2005). Situação semelhante foi observada por Togo *et al.* (2002) na tentativa de classificação de *Lactobacillus* isolados de "Chibuku" (bebida fermentada tradicional do Zimbábue), onde 20% dos isolados não foram incluídos a nenhuma espécie com base nos testes do kit API 50 CH. No caso de queijos, Pérez *et al.* (2000), realizando a identificação de *Lactobacillus* de queijo Tenerife, foram incapazes de classificar 5,7% dos isolados.

#### **4.2. Classificação molecular dos isolados de *Lactobacillus* através de TAP-PCR**

Visando confirmar a classificação bioquímica, os isolados foram analisados a partir do perfil obtido com marcadores TAP-PCR (triplicate AP-PCR). Os marcadores TAP-PCR utilizam *primer* conservado dentro do 16SrDNA e têm sido utilizados para avaliação de polimorfismos em diversas espécies de bactérias lácticas incluindo *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium* (Cusick e O'Sullivan, 2000). Este tipo de marcador, no qual apenas segmentos amplificados em três temperaturas de anelamento são considerados, apresenta maior reprodutibilidade do que outros métodos de *fingerprinting* baseados em PCR (Cusick & O'Sullivan, 2000).

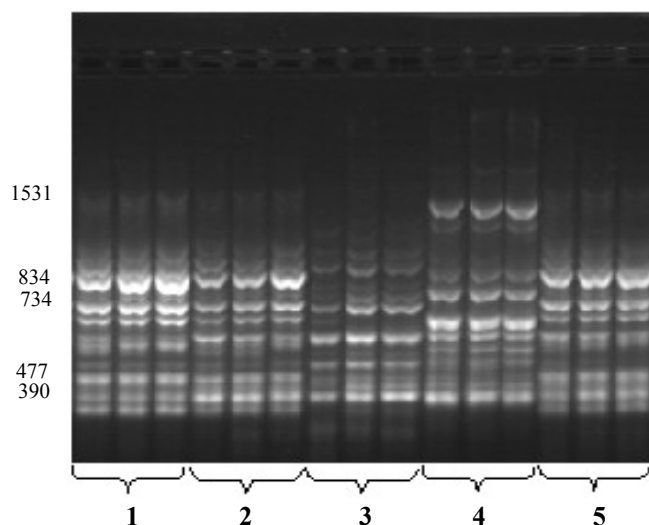
O TAP-PCR foi utilizado por Swearingen *et al.* (2001) para estudar as bactérias presentes em queijos Cheddar. Estes autores demonstraram que os 75 isolados obtidos exibiram dezoito perfis, sendo que os isolados de uma mesma espécie de *Lactobacillus* (*L. paracasei*) apresentaram oito perfis distintos. Estes dados indicam que o TAP-PCR apresenta boa capacidade discriminatória. Entretanto, há limitações quanto a sua utilização na classificação deste grupo de bactérias.

Dezesseis produtos de amplificação distintos foram observados para TAP-PCR, sendo identificados três a nove bandas, com uma média de 7,3 bandas por isolado. Neste caso, os segmentos amplificados variaram entre 283pb e 1789pb. Apenas um fragmento isolado específico, TAP<sub>764</sub> presente no isolado IBLac130, foi identificado. Um exemplo dos perfis obtidos com estes marcadores pode ser visualizado na Figura 6.

No caso de TAP-PCR, os amplicons obtidos em três temperaturas de anelamento (Figura 6) são comparados levando-se em consideração apenas aqueles presentes em todas as temperaturas. Assim sendo, estes marcadores apresentaram alta reprodutibilidade (98%) nos experimentos independentes realizados.

A matriz formada pela presença ou ausência de amplicons obtidos com TAP-PCR foi utilizada para o cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard e a construção de um dendrograma baseado no algoritmo UPGMA. Os coeficientes de similaridade variaram entre 1 (perfis idênticos) a 0,222 (diferença de sete bandas). Os resultados confirmam a capacidade

discriminatória do marcador TAP-PCR, sendo que os 33 isolados analisados exibiram onze perfis distintos, muitos dos quais diferindo em apenas uma banda (Figura 7).

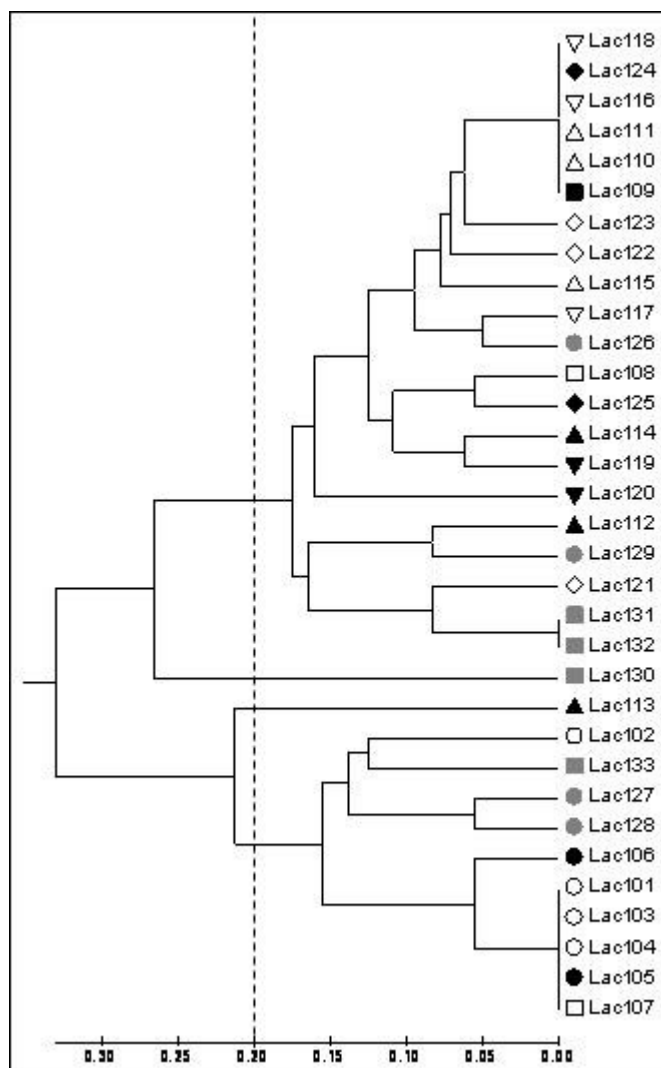


**Figura 6.** Perfis eletroforéticos de fragmentos amplificados em *Lactobacillus* isolados de queijos tipo Serrano (1- IBLac110 a 5- IBLac114) utilizando marcadores TAP-PCR.

Como pode ser observado na Figura 7, os marcadores TAP-PCR permitiram separar os isolados em três grupos com divergência inferior a 25%: o grupo I formado por 21 isolados, incluindo todos aqueles classificados como *L. plantarum*, *L. brevis*, e *L. delbrueckii*, o grupo II formado por apenas um isolado, classificado como *L. plantarum* com base nas suas características fermentativas, e o terceiro grupo constituído por onze isolados, todos pertencentes à espécie *L. paracasei*. Estes resultados demonstram elevada relação entre a classificação obtida com base em marcadores bioquímicos e TAP-PCR, confirmando, desta maneira, utilidade destes últimos na caracterização de espécies de *Lactobacillus*.

Os dois representantes de *L. brevis* foram incluídos ao grupo I, formado principalmente por *L. plantarum*. Neste sentido, cabe lembrar que análises filogenéticas baseadas no seqüenciamento do gene 16S rRNA e comparação entre genomas mostram alta similaridade entre estas duas espécies (Makarova *et al.*, 2006), sendo estas difíceis de se identificarem com base em marcadores bioquímicos e moleculares (Angelis *et al.*, 2001).

Dois amplicons, TAP<sub>433</sub> e TAP<sub>751</sub>, foram característicos dos isolados de *L. paracasei*. Por outro lado, o amplicon TAP<sub>533</sub> foi característico dos isolados do grupo I (*L. plantarum* e *L. brevis*), estando ausente em *L. paracasei* e *L. delbrueckii*. Estes amplicons poderiam ser utilizados para a construção de *primers* SCAR espécie específicos.



**Figura 7.** Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcador molecular TAP-PCR. Os símbolos correspondem aos queijos dos quais foram isoladas as cepas bacterianas. Queijos: A (○), B (●), C (□), D (■), E (△), F (▲), G (▽), H (▼), I (◇), J (◆), K (⊙) e L (▣).

No que diz respeito à origem dos isolados, todos aqueles obtidos dos queijos A e B foram classificados como *L. paracasei*. Já aqueles obtidos dos queijos D, E, G, H e J foram incluídos no grupo I e classificados como *L. plantarum*. Nos queijos C, F e L foi constatada a presença de *L. plantarum* e *L. paracasei*, enquanto no queijo K, foi constatada a presença de *L. paracasei*, *L. plantarum* e *L. brevis* e no queijo I, a presença de *L. delbrueckii*, *L. plantarum* e *L. brevis*.

Estes dados mostram grande variação quanto às espécies de *Lactobacillus* presentes na fase final da fermentação do queijo Serrano, incluindo queijos com apenas uma espécie majoritária a queijos com populações de várias espécies. Além de outros problemas, a variação de espécies de *Lactobacillus* responsáveis pelo processo fermentativo deve contribuir para a falta de uniformidade dos queijos tipo Serrano comercializados. Neste contexto, a seleção de cepas oriundas de queijos de alta qualidade e a sua utilização como inoculantes representa uma alternativa interessante para uniformização do queijo Serrano, sem, entretanto, alterar as suas características organolépticas.

### **4.3 Caracterização molecular das bactérias lácticas presentes em queijos tipo Serrano maturados**

Para fins de caracterização dos isolados de *Lactobacillus* obtidos a partir de queijos tipo Serrano maturados, foram utilizados cinco métodos baseados na técnica de amplificação de DNA (PCR). Os métodos avaliados foram BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, RAPD e ISSR.

Como pode ser observado na Figura 8, a amplificação de segmentos foi obtida em todos os métodos. Entretanto, no caso de marcadores ERIC, apenas bandas difusas foram detectadas em alguns isolados, não sendo assim consideradas no presente trabalho.

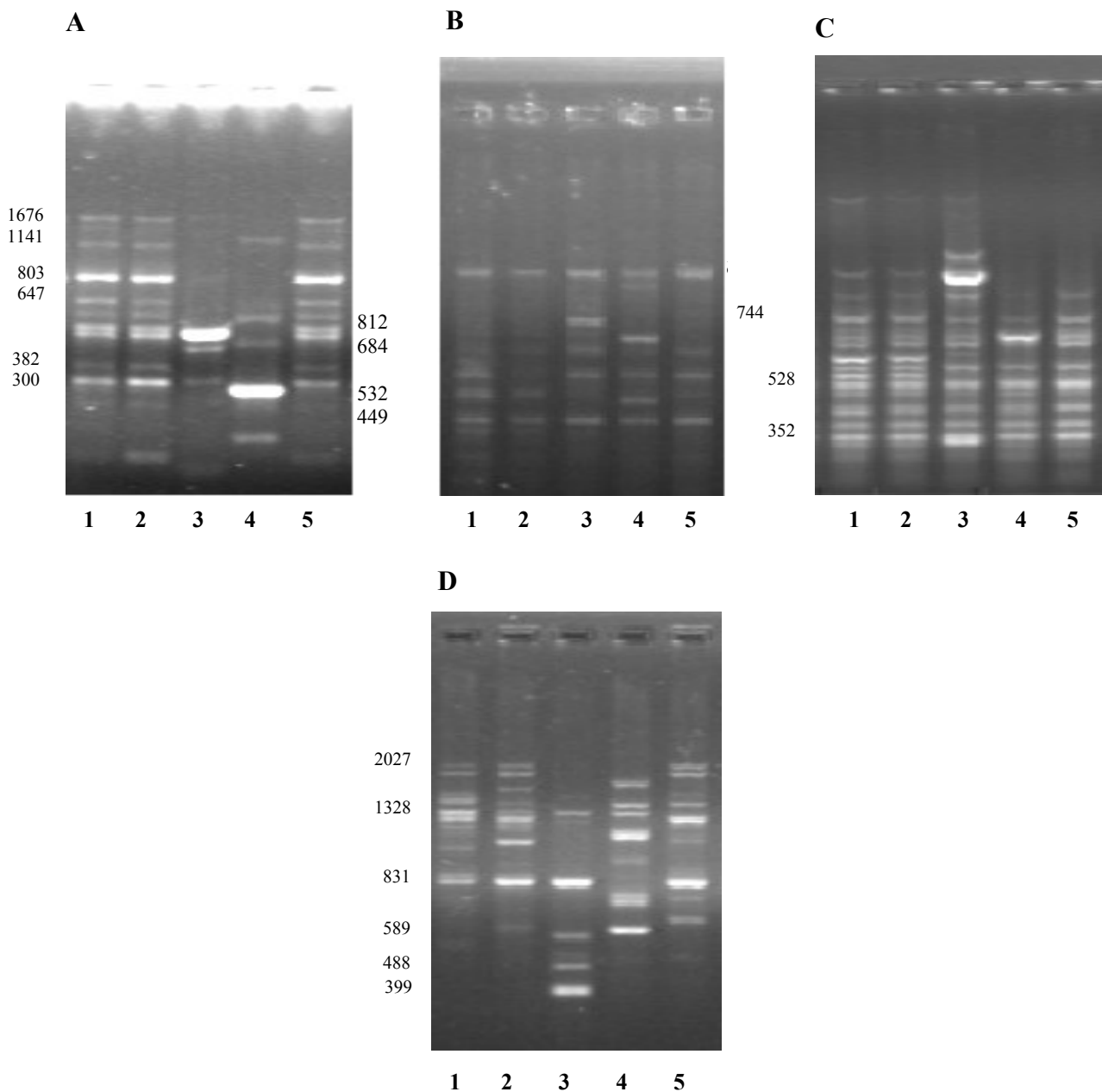
As seqüências iniciadoras utilizadas no ERIC-PCR foram desenhadas para a amplificação de seqüências repetitivas em enterobactérias (Hulton *et al.*, 1991), sendo utilizadas com sucesso na caracterização de diversas espécies e gêneros bacterianos como *Listeria monocytogenes* (Jersek *et al.*, 1999), *Bifidobacterium* (Ventura *et al.*, 2003), *Vibrio parahaemolyticus* (Wong & Lin, 2001) e *Staphylococcus* (Wieser & Busse, 2000), entre outros. Segundo Ventura & Zink (2002), marcadores

moleculares ERIC podem ser utilizados de forma eficiente para a caracterização de *Lactobacillus johnsonii*. A presença de elevado número de bandas difusas nos experimentos realizados com lactobacilos de queijo Serrano é indicativa de baixa homologia entre a seqüência iniciadora ERIC e o genoma das espécies de *Lactobacillus* analisadas neste trabalho.

Utilizando marcadores BOX-PCR, foram obtidos oito a treze produtos de amplificação por isolado, com uma média de 10,5 produtos (Figura 8). Considerando todos os isolados avaliados, foram identificados dezesseis produtos de amplificação distintos (Tabela 4) com pesos moleculares variando entre 333 e 1774pb. A maior parte destes produtos mostrou-se polimórfica (93,75%) indicando elevada capacidade discriminatória destes marcadores. Apenas duas bandas foram isolado-específicas, BOX<sub>1375</sub> e BOX<sub>815</sub>, presentes apenas nos isolados IBLac112 e IBLac119, respectivamente.

O menor número de segmentos amplificados foi obtido com REP-PCR (Tabela 4), com um total de apenas dez fragmentos, sendo identificadas de quatro a oito bandas por isolado (média de 5,7 bandas). Os segmentos amplificados por REP-PCR variaram entre 405 e 1623pb, a percentagem de bandas polimórficas foi de apenas 50%, indicando menor capacidade discriminatória. A técnica envolvendo amplificação de seqüências repetitivas (REP-PCR) permitiu discriminar entre *L. hilgardii* e *L. brevis* (Sohier *et al.*, 1999) e caracterizar geneticamente bactérias lácticas isoladas de queijo Comté (Depouilly *et al.*, 2004).

Como pode ser observado na Figura 8, os perfis eletroforéticos obtidos com os distintos métodos foram consistentes, permitindo evidenciar um número relativamente elevado de bandas diferenciais. A comparação entre perfis obtidos nas várias repetições realizadas permitiram determinar um elevado grau de repetibilidade (>92%) com os distintos marcadores empregados. Como esperado, a maior repetibilidade foi obtida com os marcadores BOX-PCR (95,7%). Os marcadores ISSR, apesar do tamanho dos *primers* empregados (17 pb), que teoricamente deveria garantir elevada repetibilidade, foi o sistema com menor repetição entre ampliações independentes (84%).



**Figura 8**-Perfis eletroforéticos de fragmentos amplificados em *Lactobacillus* isolados de queijos tipo Serrano maduros (1- IBLac110 a 5- IBLac114) utilizando marcadores (A) RAPD-OPX-13, (B) REP-PCR, (C) BOX-PCR, e (D) ISSR- (CA)<sub>8</sub>G.



**Tabela 3.** *Primers*, temperaturas de anelamento, total de segmentos amplificados, número de segmentos amplificados por isolado de *Lactobacillus* obtidos de queijos Serrano e percentagem de segmentos polimórficos.

<i>Primer</i>	Seqüência (5'-3')	Temperatura de anelamento	Total de segmentos amplificados	Número de segmentos amplificados por isolado	% de segmentos polimórficos
<b>RAPD</b>					
OPX 02	TTCCGCCACC	37°C	17	1 a 7	100
OPX 03	TGGCGCAGTG	37°C	13	2 a 6	100
OPX 08	CAGGGGTGGA	37°C	18	1 a 8	100
OPX 11	GGAGCCTCAG	37°C	12	1 a 4	100
OPX13	ACGGGAGCAA	37°C	13	1 a 8	100
OPB01	GTTTCGCTCC	37°C	19	4 a 11	79
OPZ12	TCAACGGGAC	37°C	13	0 a 6	100
OPZ13	GACTAAGCCC	37°C	16	1 a 5	100
			<b>121</b>		
<b>ISSR</b>					
P1	(AC) <sub>8</sub> T	50°C	20	1 a 7	100
P2	(AG) <sub>8</sub> A	50°C	13	2 a 7	92,3
P3	(GA) <sub>8</sub> T	50°C	16	1 a 5	100
P4	(CA) <sub>8</sub> G	48°C	22	2 a 7	100
P5	(CTC) <sub>5</sub> RC	48°C	13	3 a 7	100
			<b>84</b>		
REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC		10	4 a 8	50
REP 2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC	50°C			
TAP	CAGCAGCCGCGGTAATWC	38-42°C	16	3 a 9	62,5
BOX	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	55°C	16	8 a 13	93,75

W- (A/T), I- inosina; R- (A/G)

Como é evidenciado na Tabela 3, um total de 121 fragmentos foram obtidos utilizando-se oito seqüências decaméricas iniciadoras para RAPD. O número de segmentos obtidos variou entre doze para o *primer* OPX-11 e dezenove para OPB-01. O número de segmentos amplificados por isolado variou dependendo do *primer*. A menor porcentagem de bandas polimórficas foi evidenciada com o *primer* OPB-01, que apresentou o maior número de segmentos amplificados. Já a amplificação de seqüências entre regiões repetitivas (ISSR) gerou um total de 84 produtos de amplificação com peso molecular entre 272 e 2100pb. O número de segmentos amplificados foi maior que aquele obtido com RAPD. Entretanto, o número médio de segmentos amplificados por

isolado com cada *primer* de ISSR variou entre 3,33 e 4,96, valores muito próximos àqueles obtidos com RAPD.

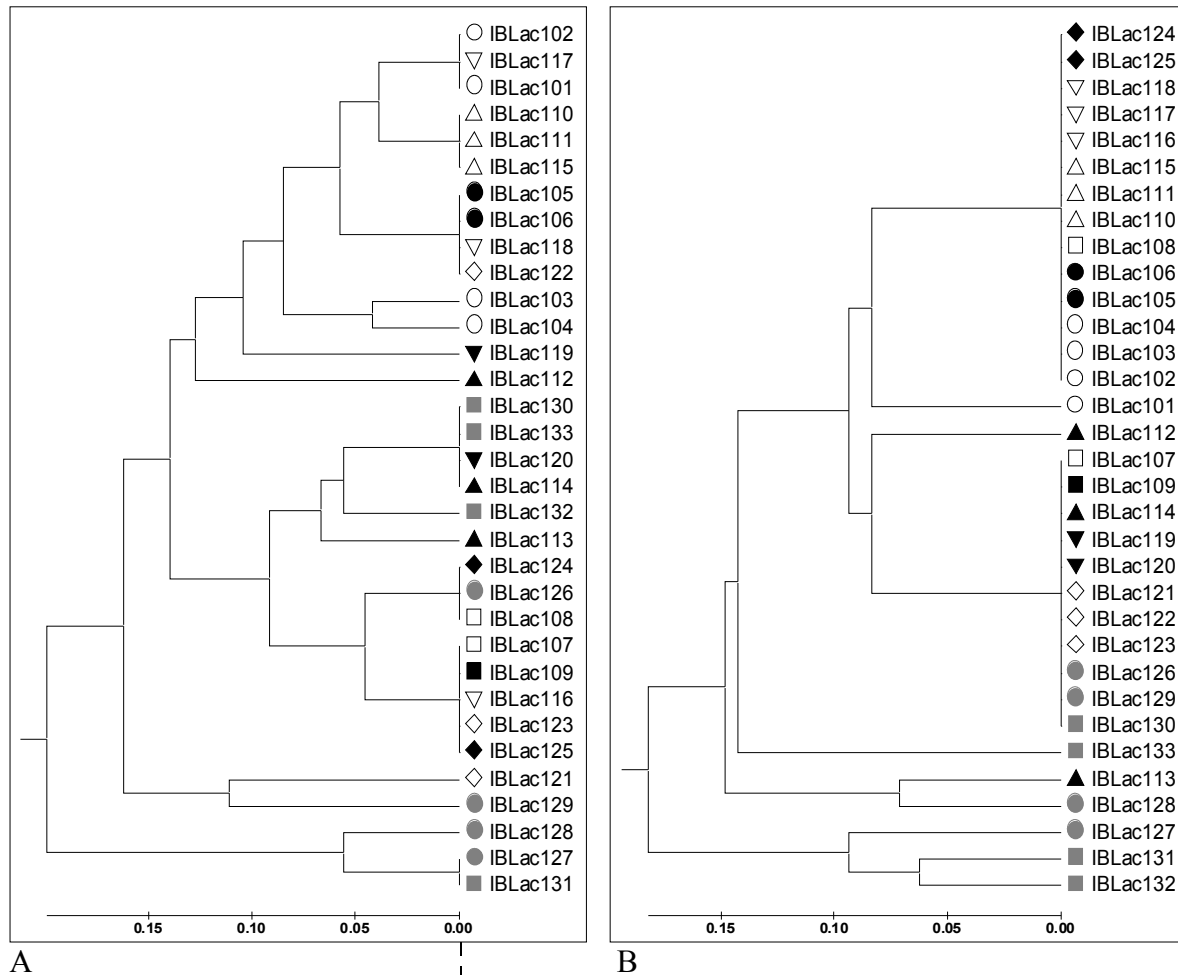
Marcadores RAPD foram aplicados com sucesso na identificação de *L. hilgardii* e *L. brevis* (Sohier et al., 1999), *L. delbrueckii* subespécies *bulgaricus* e *lactis* (Torriani et al., 1999), em estudo de lactobacilos de distintas espécies presentes em amostras de leite e/ou queijos (Fitzsimons et al., 1999; Angelis et al., 2001; Baruzzi et al., 2002). Nigatu et al. (2001) demonstraram que estes marcadores permitem discriminar entre espécies de *Lactobacillus*.

Os perfis obtidos com os distintos marcadores foram avaliados de forma a gerar matrizes binárias a partir das quais foram calculados os coeficientes de similaridade de Jaccard. A escolha deste coeficiente está associada ao fato de que o mesmo não leva em consideração as ausências de bandas como semelhança. Estas matrizes de similaridade foram, por sua vez, empregadas para a construção de dendrogramas utilizando-se o método UPGMA.

Como pode ser observado na Figura 9-A, a análise multivariada dos perfis obtidos com marcadores BOX-PCR permitiu separar os isolados em quatro grupos. Um grupo formado pelos isolados IBLac127 e IBLac 128, ambas classificadas como *L. paracasei* e isoladas do queijo K, e o isolado IBLac131 obtido do queijo L (*L. plantarum*). O segundo grupo foi formado pelo isolado IBLac129 (queijo K) e IBLac121 (queijo I) ambas classificadas como *L. brevis*. Os outros dois grupos incluíram quatorze isolados cada um. Os três isolados do queijo E (IBLac110, 111 e 115) apresentaram perfis idênticos, o mesmo ocorrendo nos isolados IBLac105 e 106, obtidos do queijo B. Bactérias isoladas de queijos distintos mostram perfis idênticos, fato que pode estar associado ao baixo número de bandas geradas com este sistema de marcadores. Apesar de uma certa tendência, os grupos formados pela análise dos marcadores BOX-PCR não mostraram relação com a classificação dos isolados de *Lactobacillus* analisados.

Apesar do baixo número de bandas, os marcadores REP-PCR permitiram a separação dos isolados em quatro grupos e a um isolado não agrupado (IBLac133). O primeiro grupo foi formado pelos isolados IBLac127 (*L. paracasei*), 131 e 132 (*L. plantarum*), os dois últimos oriundos do

queijo L. O segundo grupo incluiu os isolados IBLac113 e 128, ambos classificados como *L. paracasei*. Os dois grupos maiores foram formados por doze e quinze isolados, respectivamente. Dado o reduzido número de segmentos discriminantes (apenas cinco), grande parte das cepas mostraram perfis idênticos (Figura 9-B)



**Figura 9.** Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcadores moleculares BOX-PCR (A) e REP-PCR (B). Os símbolos correspondem aos queijos dos quais foram isoladas as cepas bacterianas. Queijos: A (○), B (●), C (□), D (■), E (△), F (▲), G (▽), H (▼), I (◇), J (◆), K (○) e L (■).

Dos marcadores disponíveis, o mais empregado em estudos de diversidade genética de bactérias lácticas, em especial *Lactobacillus*, têm sido RAPD. Estes marcadores apresentam diversas vantagens (*primers* aleatórios, baixo custo, alta capacidade discriminatória), mas são considerados de baixa reprodutibilidade (Ferreira & Grattapaglia, 1996). A análise dos 33 isolados

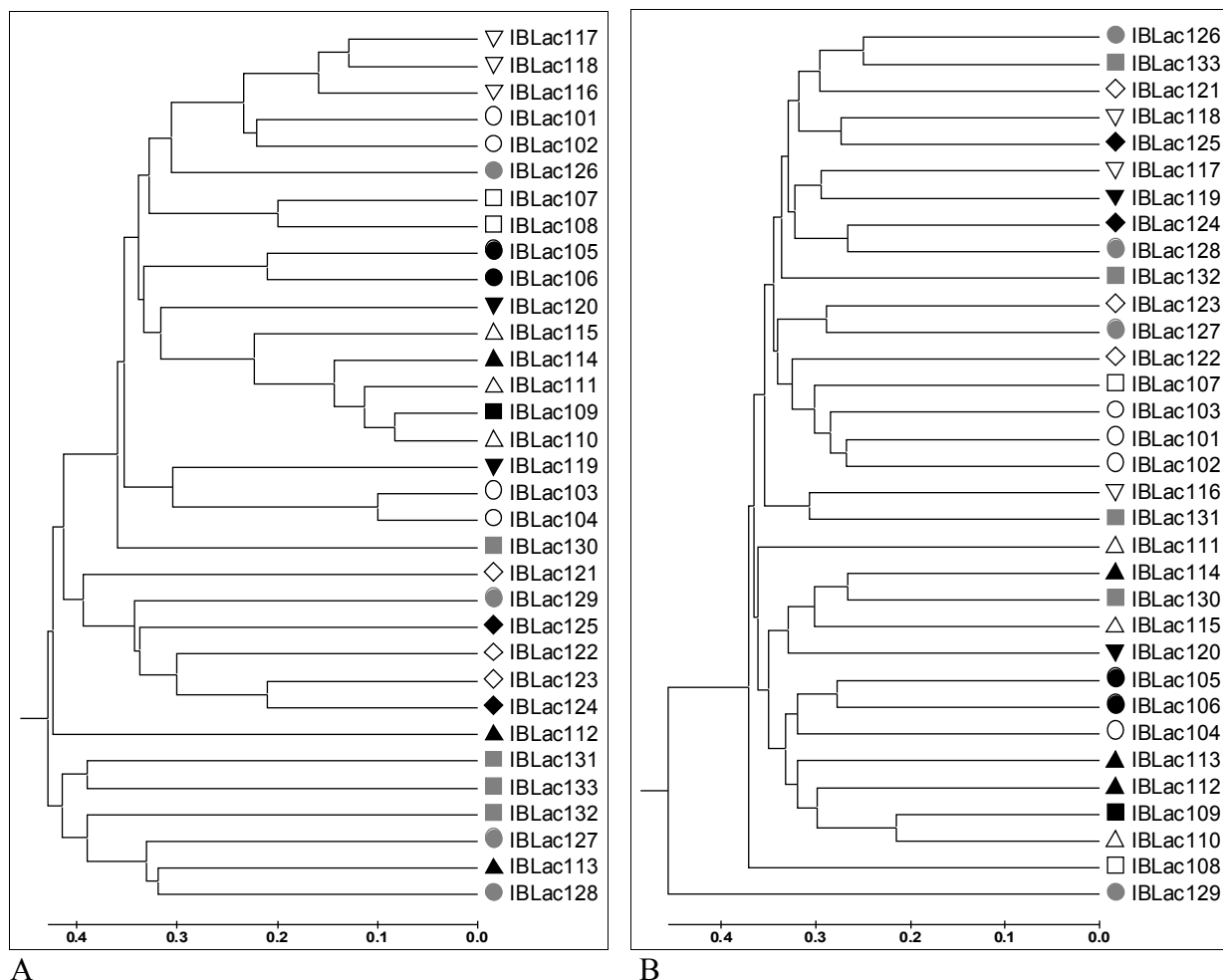
de *Lactobacillus*, através da utilização de oito seqüências iniciadoras decaméricas selecionadas, permitiu diferenciar 121 segmentos amplificados, os quais foram utilizados para a construção de uma matriz binária e, posteriormente, a determinação de distâncias de Jaccard.

Como pode ser observado na Figura 10-A, não foram obtidos grupos bem definidos, como aconteceu com os métodos envolvendo regiões repetitivas ou TAP-PCR. Entretanto, os isolados se distribuíram de forma semelhante àquela obtida com os outros marcadores, agrupando-se aqueles obtidos de um mesmo queijo. Por exemplo, os isolados IBLac 128 (*L. paracasei*) e 127 (*L. plantarum*) obtidos do queijo K, IBLac131, 132 (ambos *L. plantarum*) e 133 (*L. paracasei*) obtidos do queijo L, IBLac 105 e IBLac106 oriundos do queijo B (*L. paracasei*), IBLac 116, 117 e 118 do queijo G classificados como *L. plantarum*, entre outros. Cabe ressaltar que os marcadores RAPD, de um modo geral, apresentam boa capacidade discriminatória em *Lactobacillus*, mas não são capazes de identificar estas bactérias em nível de espécie (Angelis *et al.*, 2001).

No caso particular de RAPD, cepas com variações inferiores a 20% de distância de Jaccard podem ser consideradas como idênticas, fato determinado experimentalmente através da repetição de um mesmo grupo de oito cepas em cinco ampliações independentes. Esta correção é necessária no caso de RAPD devido à baixa especificidade dos *primers* e conseqüente surgimento de segmentos inespecíficos.

Utilizando-se cinco seqüências iniciadoras microsátélites, foram obtidos 84 segmentos amplificados distintos. Assim, como ocorreu no caso de RAPD, não foi possível definir grupos após análise dos resultados de ISSR (Figura 10-B). Todas as cepas avaliadas apresentaram perfis distintos e não foi possível observar as relações entre isolados de um mesmo queijo como ocorreu nos outros marcadores utilizados. Seqüências iniciadoras, incluindo repetições em *tandem* têm sido apontadas como marcadores de alta capacidade discriminatória em diversos organismos, como as bactérias *Helicobacter pylori* (Marshall *et al.*, 1996), *Neisseria* (Peak *et al.*, 1999), *Proteus mirabilis* (Cieslikowski *et al.*, 2003), entre outras. Entretanto, estudos realizados recentemente em *Proteus mirabilis* (Muller *et al.*, 2007, in press) mostram que apesar da sua elevada capacidade

discriminatória, estes marcadores apresentam baixa confiabilidade quanto à caracterização de isolados bacterianos.



**Figura 10.** Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com marcadores moleculares RAPD (A) e ISSR (B). Os símbolos correspondem aos queijos dos quais foram isoladas as cepas bacterianas, queijos: A (○), B (●), C (□), D (■), E (△), F (▲), G (▽), H (▼), I (◇), J (◆), K (○) e L (■).

A análise de correlação entre as distâncias obtidas com os distintos marcadores empregados mostrou correlação positiva (Tabela 4) entre as distâncias calculadas com BOX-PCR, REP-PCR, TAP-PCR e RAPD. No entanto, as correlações obtidas entre as distâncias com estes marcadores e

aquelas calculadas com base nos perfis de ISSR não foram significativas ou de muito baixa significância, confirmando os dados obtidos por Muller *et al.* (2007) em *Proteus mirabilis*.

**Tabela 4.** Correlação entre as distâncias obtidas com os marcadores BOX, REP, ISSR, RAPD e TAP-PCR.

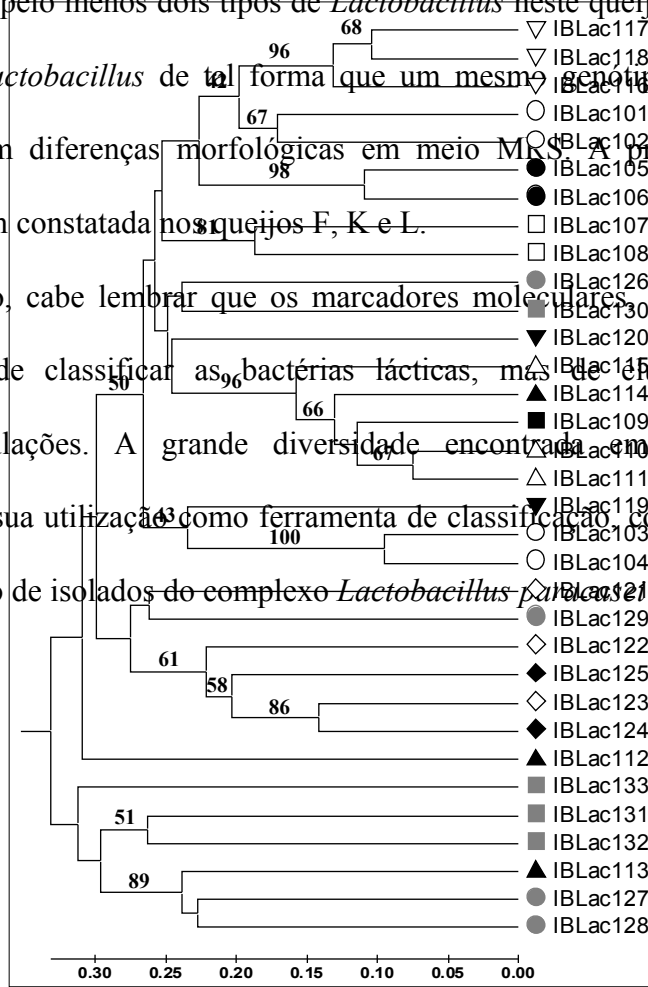
	BOX-PCR	REP-PCR	ISSR	RAPD	TAP-PCR
BOX-PCR	1,000	0,685**	0,147 <sup>ns</sup>	0,652**	0,513**
REP-PCR		1,000	0,009 <sup>ns</sup>	0,547**	0,533**
ISSR			1,000	0,167*	0,185*
RAPD				1,000	0,606**
TAP-PCR					1,000

Ns: não significativo; \* significativo em nível de 5%; \*\* significativo em nível de 1%.

Considerando a alta correlação obtida, foi realizada uma análise conjunta dos dados obtidos com BOX-PCR, REP-PCR, TAP-PCR e RAPD. Os resultados desta análise, apresentados na Figura 11, mostram importante diversidade nos *Lactobacillus* isolados de queijo Serrano produzidos na região nordeste do Rio Grande do Sul.

Como pode ser observado na Figura 11, as quatro cepas isoladas do queijo A formam grupos separados, um com as cepas IBLac101 e 102 e outro com IBLac103 e 104. Estes resultados mostram a existência de pelo menos dois tipos de *Lactobacillus* neste queijo e indicam a existência de pleomorfismo em *Lactobacillus* de tal forma que um mesmo genótipo é isolado a partir da seleção de colônias com diferenças morfológicas em meio MRS. A presença de mais de um *Lactobacillus* foi também constatada nos queijos F, K e L.

Do mesmo modo, cabe lembrar que os marcadores moleculares de um modo geral, não possuem a finalidade de classificar as bactérias lácticas, mas de elucidar a dinâmica e a variabilidade das populações. A grande diversidade encontrada em algumas espécies de *Lactobacillus* impede a sua utilização como ferramenta de classificação, como mostrou Fitzsimons *et al.* (1999) na avaliação de isolados do complexo *Lactobacillus paracasei* em queijos Cheddar.



**Figura 11.** Dendograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com os marcadores moleculares RAPD, BOX-PCR, TAP-PCR e REP-PCR. Os símbolos correspondem aos queijos dos quais foram isoladas as cepas bacterianas. Queijos: A (○), B (●), C (□), D (■), E (△), F (▲), G (▽), H (▼), I (◇), J (◆), K (○) e L (■).

Em conjunto, os resultados obtidos confirmam a prevalência de *Lactobacillus* na fase final de maturação do queijo Serrano, assim como a presença de poucas cepas preponderantes em cada um dos queijos comercializados. Dados semelhantes foram obtidos quando analisadas as populações bacterianas em outros queijos não inoculados. Angelis *et al.* (2001) observaram a ocorrência de nove espécies de *Lactobacillus* em queijos Cheddar não inoculados, sendo que *L. plantarum* correspondeu a 32% dos isolados, *L. brevis* a 15%, *L. paracasei* a 12%, *L. curvatus* a 9% e as outras espécies a percentagens menores. Já Fitzsimons *et al.* (1999), avaliando queijos Cheddar maduros não inoculados na Irlanda, evidenciaram uma alta frequência de *L. paracasei*

(96,4%) e apenas 2,1% de *L. plantarum*. Esta discordância aparente demonstra que a prevalência de uma espécie bacteriana em um tipo de queijo depende de diversos fatores locais e que as características regionais de um produto lácteo fermentado são em grande parte decorrentes das populações bacterianas características.

Swearingen *et al.* (2001) e Herreros *et al.* (2007), entre outros, mostraram que o isolamento e seleção de bactérias lácticas locais, e sua utilização como inóculo, pode melhorar significativamente a qualidade do produto final fermentado. Desta forma, o estudo das populações bacterianas presentes em queijo Serrano e a seleção de bactérias lácticas com características superiores (atividade proteolítica e peptidásica, produção de ácido láctico, produção de diacetil, entre outras), pode contribuir para a padronização e melhoria deste tipo de queijo característico dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.

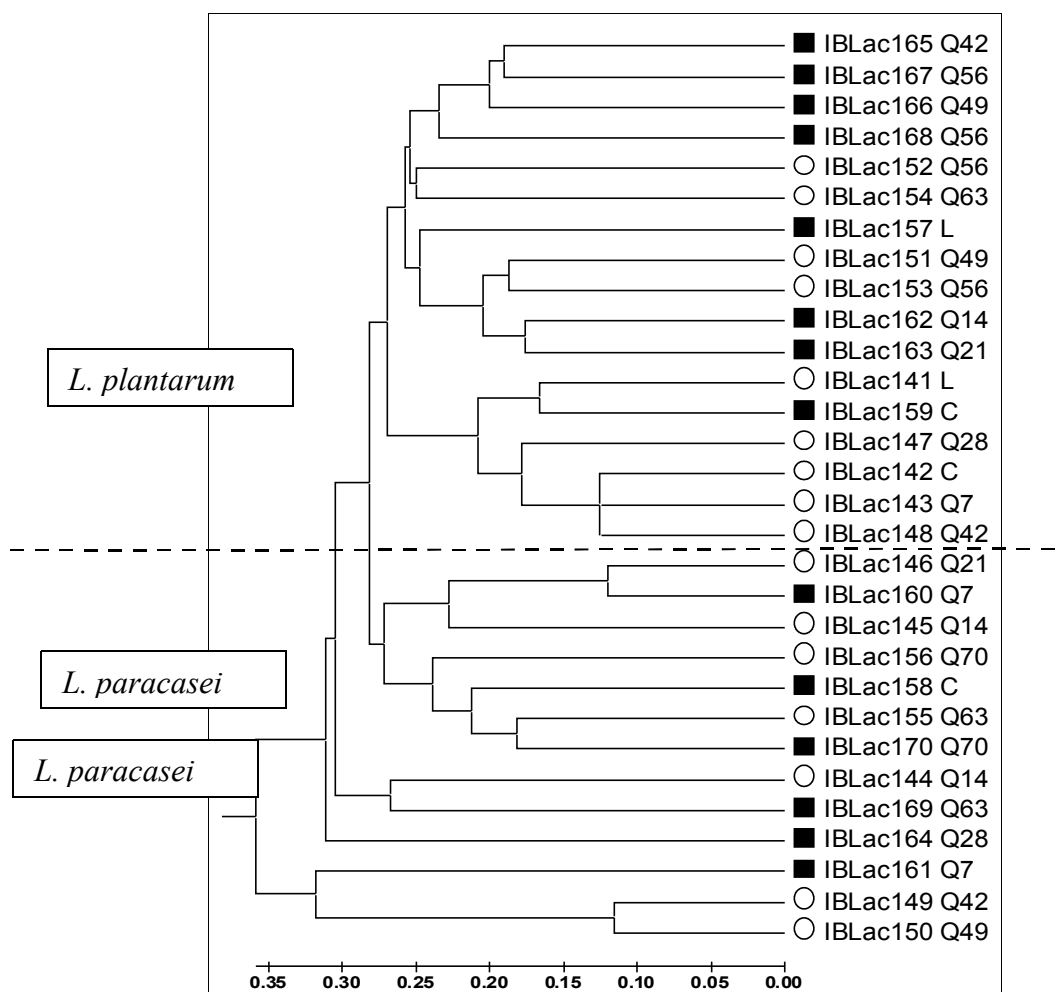
#### **4.4. Diversidade em *Lactobacillus* isolados durante o processamento e maturação de queijo Serrano**

A fim de avaliar-se a dinâmica das populações de *Lactobacillus* durante a produção e a maturação de queijo Serrano, amostras de leite, coalho e queijos em distintos períodos de maturação foram plaqueadas em meio MRS para o isolamento das bactérias lácticas mais representativas. Assim sendo, colônias com morfologia diferentes presentes nas placas foram isoladas e posteriormente caracterizadas utilizando-se marcadores moleculares selecionados com base nos resultados obtidos nos experimentos com *Lactobacillus* isolados de queijos maduros comerciais. Um total de 30 isolados, sendo dezesseis do queijo M (IBLac141-IBLac156) e quatorze do queijo N (IBLac157-IBLac170) foram isolados e caracterizados.

Como pode ser observado na Figura 12, bactérias presentes no leite e no coalho se mantiveram durante todo o processo de maturação do queijo. Por outro lado, algumas cepas que possivelmente se encontravam em baixas quantidades no leite e coalho surgiram como microrganismos preponderantes em determinados momentos durante o sistema de maturação. Estes



dados confirmam a flutuação populacional que caracteriza os processos fermentativos envolvendo mistura de microrganismos como o processo de fabricação de queijos.



**Figura 12.** Dendrograma (UPGMA) baseado nos resultados obtidos com os marcadores BOX-PCR e RAPD. Amostras obtidas durante o processo de produção e maturação do queijo M (○) e do queijo N (■).

Como pode ser observado na Figura 12, as duas espécies predominantes em queijos Serrano maduros, *L. plantarum* e *L. paracasei*, foram evidenciadas durante o processo de maturação dos dois queijos avaliados. Dentre os 30 isolados analisados, 56,7% foram classificados como *L. plantarum* e 43% como *L. paracasei*. Entretanto, no leite de ambos os queijos foi apenas observado *L. plantarum*, surgindo *L. paracasei* na coalhada do queijo M. A partir do sétimo dia de maturação

as amostras passaram a exibir a presença de *L. paracasei*, espécie que se mantém até o término do processo de maturação. Considerando-se os resultados obtidos com ambos os queijos, a espécie *L. plantarum* predomina no início do processo de maturação, enquanto *L. paracasei* ocorre fundamentalmente no final do processo.

No caso particular das populações de *Lactobacillus*, durante o processo de maturação de queijos, Baruzzi *et al.* (2002) demonstraram que diversas espécies (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentatum*, *L. gasseri*, e *L. paracasei*) e cepas destas bactérias, se alternam como bactérias majoritárias ao longo da maturação, sendo que apenas algumas delas podem ser detectadas nas amostras de leite e coalho. Presumivelmente, as cepas não detectadas nas amostras iniciais têm sua população aumentada durante o processo. Dados semelhantes foram obtidos por outros autores, como Swearingen *et al.* (2001) e Torres-Llanez *et al.* (2006).

Levantamentos realizados por Souza *et al.* (1999) e pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia mostram que apesar da ocorrência de *Lactobacillus* como bactérias dominantes na produção de queijo Serrano, outras bactérias (*Lactococcus* e *Leuconostoc*) ocorrem em quantidades variadas ao longo do processo fermentativo. Dados semelhantes foram evidenciados durante o processo de produção de outros queijos não inoculados, como Cheddar (Swearingen *et al.*, 2001), Scamorza Altamura (Baruzzi *et al.*, 2002), Mexican Fresco (Torres-Llanez *et al.*, 2006), Genestoso (González *et al.*, 2007) e Zlatar (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2007).

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível relacionar as conclusões apresentadas a seguir:

- Pelo menos quatro espécies de *Lactobacillus* ocorrem em queijos Serrano comercializados, sendo *L. plantarum* e *L. paracasei* as espécies mais representativas.
- A presença de uma ou mais de uma espécie de *Lactobacillus* foi constatada em queijos tipo Serrano comerciais. Esta variação quanto às bactérias lácticas responsáveis pelo processo fermentativo deve contribuir para a elevada variação organoléptica destes queijos.
- Os marcadores TAP-PCR demonstraram alta correlação com a classificação bioquímica de isolados de *Lactobacillus* presentes em queijo Serrano, servindo como alternativa ou sistema confirmatório de classificação.
- Marcadores RAPD, BOX e REP-PCR apresentam elevada capacidade discriminatória em *Lactobacillus* isolados de queijo Serrano, permitindo sua caracterização e identificação molecular dos mesmos.
- Os coeficientes de similaridade obtidos com os marcadores RAPD, BOX-PCR e REP-PCR apresentaram elevada correlação com aqueles calculados a partir de marcadores TAP-PCR, o mesmo não ocorrendo com os dados de ISSR.
- Os marcadores ISSR mostraram elevada capacidade de discriminação. Entretanto, estes marcadores não foram confiáveis chegando a separar isolados considerados como idênticos com base em outros marcadores.
- Flutuação de espécies de *Lactobacillus* foi constatada ao longo do processo de maturação de dois queijos tipo Serrano avaliados, sendo constatado, a predominância principalmente de *L. plantarum* no início do processo e de *L. paracasei* no final da maturação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo). **Disponível (online)** em <http://www.abiq.com.br> (20 de dezembro).
- Alexandre, D.P.; Silva, M.R.; Souza, M.R.; Santos, W.L.M. (2002). Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Méd. Veter. Zoot.** 54: 1-7.
- Almeida Filho, E.S.; Lindner, A.L.; Almeida, D.S.; Sigarini, C.O.; Ferreira, M.B. (2002). Perfil microbiológico do queijo tipo Minas frescal de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá. **Higiene Alimentar.** 16: 51-58.
- Andrade, C.C.P.; Mandelli, F.; Delamare, A.P.L.; Echeverrigaray, S. (2006) Isolamento de bactérias lácticas visando a seleção de um inoculante para a produção de queijo Serrano. XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Curitiba, PR.
- Angelis, M. de; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J.; Corbo, M.R.; Gobbetti, M. (2001). Characterization of Non-starter lactic acid bacteria from Italian Ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2011-2020.
- Baruzzi, F.; Matarante, A.; Morea, M. (2002). Microbial community dynamics during the Scamorza Altamura cheese natural fermentation. **J. Dairy Science.** 85: 1390-1397.
- Biomérieux. Api 50 CHL médium. (2001). **Disponível (online)** em [http://courses.ag.uidaho.edu/fst/fstmmbb417/api50\\_CHL\\_medium.pdf](http://courses.ag.uidaho.edu/fst/fstmmbb417/api50_CHL_medium.pdf). (20 de maio 2007).
- Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarne, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* spp. *lactis* IL1403. **Genome Research.** 11: 731-753.
- Bonfoh, B.; Wasem, A.; Traoré, A. N.; Fané, A.; Spillmann, H.; Simbé, C. F.; Alfaroukh, I. O.; Nicolet, J.; Farah, Z.; Zinsstag, J. (2003). Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako. **Food Control.** 14: 495- 500.

- Bornet, B.; Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**. 19:209-215.
- Caridi, A.; Micari, P.; Caparra, P.; Cufari, A.; Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes cheese Pecorino del Poro. **Dairy J.** 13: 191-200.
- Centeno, J.A.; Rodríguez Otero, J.L.; Cepada, A. (1994). Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) throughout cheesemaking and ripening. **J. Food Safety**. 14: 229-241.
- Cieslikowski, T.; Gradecka, D.; Mielczarek, M.; Kaca, W. (2003). Tandem teramer- based microsatellite fingerprinting for typing of *Proteus mirabilis* strains. **J. Clin. Microbiol.** 41:1673-1680.
- Conter, M.; Muscariello, T.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Vergara, A.; Campanini, G.; Ianieri, A. (2005). Characterization of lactic acid bacteria isolates from an Italian dry fermented sausage. **Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma**. 25:167-174.
- Cromie, S.J.; Giles, J.E.; Dulley, J.R. (1987) Effect of elevated ripening temperatures on the microflora of Cheddar cheese. **J. Dairy Res.** 54: 69-76.
- Cuesta, P.; Fernández-García, E.; González de Lano, D.; Montilla, A.; Rodríguez, A. (1996). Evaluation of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega 1 Pitu chesse during ripening. **J. Dairy Science**. 79: 1693-1698.
- Cusick, S.M.; O'Sullivan, D.J. (2000). Use of a single, triplicate arbitrarily primed- PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 2227- 2231.
- Depouilly A.; Dufrene F.; Beuvier E.; Berthier F. (2004) Genotypic characterization of the dynamics of lactic acid bacterial population of Comté cheese. **Lait**. 84: 155-167.
- Early, R. (2000). **Tecnología de los productos lácteos**. 2 ed. Zaragoza. 459p.

- Entis, P.; Fung, D.Y.C.; Griffiths, M.W.; McIntyre, L.; Russell, S.; Sharpe, A.N.; Tortorello, M.L. (2002). Rapid Methods for Detection, Identification and Enumeration. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed.p. 89-126.
- Fani, R.; Damiani, G.; Di Serio, C.; Gallori, E.; Grifoni, A.; Bazzicalupo, M. (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. **Mol. Ecology**. 2: 243-250.
- Ferreira, C.L.L.F.; Moura, K.R.P.; Botinhon, L.; Coelho, A.A.; Schiller, O.R. (1992). Avaliação tecnológica de culturas lácticas nacionais – produção de queijo Minas. **Rev. Inst. Lact. Candido Tertes**. 47: 279-281.
- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargen**. 2:11-53.
- Fitzsimons, N.A.; Cogan, T.M.; Condon, S.; Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of Non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3418-3426.
- Fontán, M.C.G.; Franco, I.; Prieto, B.; Tormadizo, M.E.; Carballo, J. (2001). Microbiological changes in “San Simón” cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**. 18: 25-33.
- Franco, B.D.G.M.; Langraf, M.(2002). **Microbiologia de alimentos**. Atheneu, 182p.
- Furtado, M.M. (1991). **A arte e a ciência do queijo**. 2.ed. Globo.297p.
- Garabal, J.I. (2007). Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. **Int. Microbiol.** 10: 1-3.
- Gigante, M.L. (2005). Por um queijo de melhor qualidade. **Jornal da Unicamp**. 300:3.
- Gilson, E.; Saurin, W.; Perin, D.; Bachelier, S.; Hofnung, M. (1991). The BIME family of bacterial repetitive sequences. **Res. Microbiology**. 142: 217- 222.

- González, L.; Sandoval, H.; Sacristán, N.; Castro, J.M.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Science Direct**. 18: 716- 722.
- Hayes, P.R. (1993). **Microbiología e higiene de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza. p97-102.
- Herreros, M.A.; Arenas, R.; Sandoval, M.H.; Castro, J.M.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. (2007). Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. **Science Direct**. 17: 328-335.
- Hulton, C.S.J.; Higgins, C.F.; Sharp, P.M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol. Microbiology**. 5:825-834.
- Ide, L.P.A.; Benedet, H.D. (2001). Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina. **Ciênc. Agrotec**. 25: 1352-1358.
- Jay, J.M. (1996). **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman & Hall. 661p.
- Jersek, B.; Gilot, B.; Gubina, M.; Klun, N.; Mehle, J.; Tcherneva, E.; Rijpens, N.; Herman, L.; (1999) Typing of *Listeria monocytogenes* Listeria monocytogenes strains by repetitive element sequence-based PCR. **J. Clin. Microbiol**. 37:103-109.
- Jordan, K.N.; Cogan, T.M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacterial in Irish Cheddar cheese. **J. Agric. Food Res**. 32: 47-55.
- Lange, C.C.; Brito, J.R.F. (2003). Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas. In: Brito, J.R.F; Portugal, J.A.B (Eds.) **Diagnóstico da Qualidade do Leite, Impacto para a Indústria e a Questão dos Resíduos de Antibióticos**. Embrapa, Juiz de Fora. pp. 117-138.
- Lindsay, A.W.; Sharp, P.M. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. **Mol. Biol. Evol**. 13:1156-1168.

- Lisita, M.O. (2005). Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Piracicaba, Brasil.
- López, S.; Mayo, B. (1997) Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. **Let. Appl. Microbiol.** 25: 233-238.
- Lupski, J.R.; Weinstock, G.M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology.** 174: 4525-4529.
- Machado, E.C.; Ferreira, C.L.L.F.; Fonseca, L.M.; Soares, F.M.; Pereira Júnior, F.N. (2004). Características físico- químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do serro, Minas Gerais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 24: 516-521.
- Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; Shakhova, V.; Grigoriev, I.; Lou, Y.; Rohksar, D.; Lucas, S.; Huang, K.; Goodstein, D.M.; Hawkins, T.; Plengvidhya, V.; Welker, D.; Hughes, J.; Goh, Y.; Benson, A.; Baldwin, K.; Lee, J.H.; Diaz-Muñiz, I.; Dosti, B.; Smeianov, V.; Wechter, W.; Barabote, R.; Lorca, G.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Ganesan, B.; Xie, Y.; Rawsthorne, H.; Tamir, D.; Parker, C.; Breidt, F.; Broadbent, J.; Hutkins, R.; O'Sullivan, D.; Steele, J.; Unlu, G.; Saier, M.; Klaenhammer, T.; Richardson, P.; Kozyavkin, S.; Weiner, B.; Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **PNAS.** 103: 15611-15616.
- Marshall, D.G.; Coleman, D.C.; Saliman, D.J.; Xia, H.; O'Morian, C.A.; Smith, C. (1996). Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* using short oligonucleotide probes containing repetitive sequences. **J. Appl. Bacteriol.** 81:509-517.
- Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Gabinete do Ministro. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Disponível (online)** em [http:// extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218)



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Disponível (online) em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>

Morea, M.; Baruzzi, F.; Cocconcelli, P.S. (1999). Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. **J. Appl. Microbiol.** 87:574-582.

Moreira, J.L.S.; Mota, R.M.; Horta, M.F.; Teixeira, S.M.R.; Neumann, E.; Nicoli, J.R.; Nunes, A.C. (2005) Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**. 5: 1-9.

Morr, C.; HA, E.W. (1993). Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food science and nutrition**. 33: 431-476.

Muller, G.; Zacaria, J.; Michelin, L.; Delamare, A.P.L.; Costa, S. O. P., Echeverrigaray, S. (2007) Comparison of different PCR based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Braz. J. Microbiol.** (in press).

Nero, L.A.; Mattos, M.R.; Beloti, V.; Barros, M.A.F.; Pinto, J.P.A.N.; Andrade, N.J.; Silva, W.P.; Franco, B.D.G.N. (2005). Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 25: 191-195.

Nigatu A.; Ahrné S.; Molin G. (2001). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. **Antonie van Leeuwenhoek**. 79: 1-6.

Noro, G.; González, F.H.D.; Campos, R.; Dürr, J.W. (2006). Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **R. Bras. Zootec.** 35:3.

Oliveira, V.M. (2006). Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico- química, análises bacteriológicas e

sensoriais. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Medicina veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói, Brasil.

- Pacheniack, E.F.R.; Soccol, C.R. (2005) Biochemical characterization and identification of probiotic *Lactobacillus* from swine. **B. CEPPA**. 23: 299-310.
- Peak, I.R.A.; Jennings, M.P.; Hood, D.W.; Moxon, E.R. (1999). Tetranucleotide repeats identify novel virulence determinant analogues in *Neisseria meningitidis*. **Microb. Pathog.** 26: 13- 23.
- Pérez, G.; Cardell, E.; Zárata, V. (2000). Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. **Lait**. 80: 589-600.
- Peterson, S.D.; Marshall, R.T. (1990) Nonstarter Lactobacilli in Cheddar cheese: a review. **J. Dairy Science**. 73: 1395-1410.
- Perry, K.S.P. (2004). Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**. 27.2:293-300.
- Piard, J.C.; Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria-1. Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**. 71: 525-541.
- Psoni, L.; Kotzamanidis, C.; Yiangou, M.; Tezanetakis, N.; Litopoulou-Tezanetaki, E. (2007). Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. **Science Direct**. 114: 211- 220.
- Sallami, L.; Kheadr, E.E.; Fliss, I.; Vuilleumard, J.C. (2004). Impact of autolysis, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of Cheddar cheese. **J. Dairy Science**. 87: 1585-1594.
- Sgabieri, V.A.(2004). Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro do leite. **Revista de Nutrição**. 17:4.
- Sohier, D.; Coulon, J.; Lonvaud-Funel, A. (1999). Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. **Int. J. Syst. Bact.** 49: 1075-1081.

- Souza, C.F.V.; Dalla Rosa, T.; Ayub, M.A.Z. (2003). Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**. 34: 260-266.
- Spreer, E. (1975). **Lactologia Industrial**. Zaragoza. 461p.
- Swearingen, P.A.; O'Sullivan, D.J.; Warthesen, J.J. (2001). Isolation, characterization, and influence of native nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality. **J. Dairy Science**. 84: 50-59.
- Teixeira, L.V.; Fonseca, L.M.; Menezes, L.D.M. (2007). Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 59:1.
- Terzic-Vidojevic, A.; Vukasinovic, M.; Veljovic, K.; Ostojic, N.; Topisirovic, L. (2007). Characterization of microflora in homemade semi- hard Zlata cheese. **Science Direct**. 114: 36-42.
- Togo, C.A.; Sara, B.; Feresu, S.B.; Mutukumira, A.N. (2002). Identification of *Lactic Acid Bacteria* isolated from Opaque beer (Chibuku) for potential use as a starter culture. **J. Food Technol Africa**. 7: 93-97.
- Torres-Llanez, M.J.; Vallejo-Córdoba, B.; Días-Cinco, M.E.; Mazorra-Manzano, M.A.; González-Córdoba. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. **Food Control**. 17: 683-690.
- Torriani, S.; Zapparoli, G.; Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* **Appl. Environ. Microbiol**. 65: 4351-4356.
- Ventura, M.; Zink, R. (2002). Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiol. Lett**. 217:141-154.

- Ventura, M.; Meylan, V.; Zink, R. (2003). Identification and Tracing of *Bifidobacterium* Species by Use of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences. **Appl Environ Microbiol.** 69: 4296-4301.
- Versalovic, J.; Schneider, M.; de Bruijn, F.; Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.** 5:25-40.
- Yap, I.V.; Nelson, R.J. (1996). **Winboot**: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. 22p.
- Welsh, J.; McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.** 18: 7213- 7218.
- Wieser, M.; Busse, H.J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **Int. J. SySt. Evol. Microbiol.** 50: 1087-1093.
- William, J.D.; Kubelik, A.R; Livak, K.; Rafalski, J.A; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res.** 18: 6531- 6535.
- [www.cbs.dtu.dk/serevices/GenomeAtlas](http://www.cbs.dtu.dk/serevices/GenomeAtlas)
- Wong, H.C.; Lin, C.H. (2001) Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. **J. Clin. Microbiol.** 39: 4233-4240.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genomics.** 20: 176-183.