

Microbiota Láctica de Queijos Artesanais



ISSN 1677-1915
Dezembro, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 124

Microbiota Lática de Queijos Artesanais

*Laura Maria Bruno
Juliane Döering Gasparin Carvalho*

Embrapa Agroindústria Tropical
Fortaleza, CE
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Caixa Postal 3761
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
Home page: www.cnpat.embrapa.br
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior*
Secretário-Executivo: *Marco Aurélio da Rocha Melo*
Membros: *Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Antonio Calixto Lima, Diva Correia, Ingrid Vieira Machado de Moraes, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Ebenézer de Oliveira Silva*

Supervisão editorial: *Marco Aurélio da Rocha Melo*
Revisão de texto: *Jane Maria de Faria Cabral*
Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*
Foto da capa: *Juliane Döering Gasparin Carvalho*
Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agroindústria Tropical**

Bruno, Laura Maria

Microbiota láctica de queijos artesanais / Laura Maria Bruno, Juliane Döering Gasparin Carvalho – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

30p. 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, ISSN 1677-1915, 124).

1. Bactérias lácticas - Queijo artesanal. 2. Método de isolamento. I. Carvalho, Juliane Döering Gasparin. II. Título. III. Série.

CDD 637.30287

© Embrapa 2009

Autores

Laura Maria Bruno

Engenheira de Alimentos, D. Sc. em Ciências
Biológicas, pesquisadora da Embrapa
Agroindústria Tropical,
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici,
CEP 60511-110, Fortaleza, CE,
lbruno@cnpat.embrapa.br

Juliane Döering Gasparin Carvalho

Farmacêutica Bioquímica, D. Sc. em Tecnologia de
Alimentos, professora da Universidade Federal do
Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos,
Av. Mister Hull, 2977, Pici, CEP 60021-970
Fortaleza-CE, juliane.gasparin@ufc.br

Apresentação

O leite e seus derivados são produtos de grande relevância tanto por representarem importante fonte de renda, impulsionando a economia de diversas regiões, como é o caso do queijo Coalho na região Nordeste, como na alimentação humana, pela riqueza de nutrientes que fornecem.

Os produtos lácteos carregam consigo uma microbiota nativa que desempenha funções importantes no desenvolvimento de suas características sensoriais e na manutenção da saúde do homem. Essa microbiota, representada principalmente pelo grupo das bactérias ácido-láticas, tem sido amplamente estudada, quer seja pela busca por culturas lácticas adequadas para a fabricação de determinado produto, quer seja por propriedades específicas como a produção de bacteriocinas ou a atividade probiótica.

A Embrapa Agroindústria Tropical, ciente da relevância do estudo de organismos associados à produção de alimentos e, em particular, da participação e contribuição da microbiota láctica na produção de derivados de leite, pretende com esta publicação oferecer a estudantes e profissionais uma revisão atualizada sobre o isolamento e a caracterização dessa microbiota em queijos artesanais.

Vitor Hugo de Oliveira

Chefe-Geral da Embrapa Agroindústria Tropical

Sumário

Introdução.....	9
Bactérias Látricas	10
<i>Lactococcus</i>	13
<i>Lactobacillus</i>	14
<i>Stroptococcus</i>	15
<i>Leuconostoc</i>	16
<i>Enterococcus</i>	17
Métodos de Isolamento e Caracterização de Bactérias Látricas.....	19
Considerações finais	23
Referências	25

Microbiota Láctica de Queijos Artesanais

Laura Maria Bruno

Juliane Döering Gasparin Carvalho

Introdução

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). A pasteurização, por sua vez, além da destruição de microrganismos indesejáveis, também promove a destruição da microbiota láctica natural do leite, a qual é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (GRAPPIN e BEUVIER, 1997).

Além disso, o amplo uso de fermento láctico comercial em queijos fabricados a partir do leite pasteurizado resulta na perda das características típicas dos vários tipos de queijos quando comparados aos manufaturados com leite cru. Isto ocorre em consequência da substituição integral da complexa microbiota nativa presente no leite cru por fermentos lácticos comerciais uniformes, que conduzem a uma padronização cega do produto (MACEDO et al., 2004).

Para minimizar tais problemas, tem-se buscado selecionar cepas que sejam parte da microbiota presente no leite cru e nos queijos artesanais, de modo a obter culturas iniciadoras e adjuntas especificamente preparadas para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos (MARINO et al., 2003; MACEDO et al., 2004; MENÉNDEZ et al., 2004; CARVALHO, 2007).

No Brasil também existe a preocupação em preservar queijos artesanais, pois muitos deles são referências culinárias regionais e representam importante fonte de renda para o pequeno produtor. Bactérias lácticas têm sido isoladas de leite e queijos artesanais de diferentes regiões brasileiras, entre elas o Ceará, com o intuito de selecionar microrganismos de interesse na fabricação de produtos lácteos de qualidade (BRUNO et al., 2004; BRUNO et al., 2007; CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007).

Este trabalho de revisão tem como objetivos relatar a participação e contribuição da microbiota láctica na produção de queijos artesanais, bem como expor os fundamentos básicos para a realização do isolamento e caracterização dessa população. Estas técnicas podem ser empregadas na seleção de cepas para o desenvolvimento de fermentos lácticos específicos, visando a preservação das características originais do produto tradicional nos queijos industrializados, elaborados com leite pasteurizado.

Bactérias Lácticas

Bactérias lácticas ou bactérias ácido-lácticas (BAL) são um grupo de microrganismos gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998).

Embora muitos gêneros constituam o grupo das BAL, elas também podem ser agrupadas em homofermentativas ou heterofermentativas, dependendo do produto ou produtos finais da fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glucose, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (CARR et al., 2002).

As BAL podem, ainda, ser classificadas de acordo com a temperatura de crescimento em mesofílicas e termofílicas. As mesofílicas crescem a uma temperatura ótima por volta de 30 °C e as termofílicas crescem a uma temperatura ótima de 42 °C (FOX et al., 2000).

O papel das BAL na fermentação de alimentos é duplo. Por um lado elas contribuem para a extensão da vida útil do alimento, geralmente por causa da degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima. Isto causa uma diminuição do pH, que torna o meio inóspito para a maioria dos microrganismos deterioradores e patogênicos. Adicionalmente algumas BAL também produzem peptídeos antagônicos contra outras bactérias gram-positivas. Por outro lado, o acúmulo de ácido produzido modifica as propriedades reológicas e organolépticas do produto, num processo que é complementado pela produção e, em alguns casos, pela secreção de enzimas hidrolíticas, principalmente proteinases e peptidases e ainda, embora em menor quantidade, de lipases e esterases (MADERA et al., 2003).

É interessante também ressaltar que, no caso específico das BAL heterofermentativas, sua utilização em alimentos é, sobretudo, pela sua capacidade de produzir compostos flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante. Isto ocorre porque os microrganismos heterofermentativos utilizam na fermentação de hexoses a via pentose monofosfato, produzindo, durante o processo de conversão de hexose em pentose, substâncias aromáticas, como aldeído e diacetil (CARR et al., 2002).

O emprego de BAL, na forma de fermento láctico, para elaboração de produtos lácteos fermentados é muito conhecido, principalmente na fabricação de leite acidificado, iogurte e queijos. No entanto, elas também são usadas no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais.

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de BAL. Sua principal função é promover uma acidificação

rápida durante o processo fermentativo e assim garantir a segurança do alimento (BERESFORD e WILLIAMS, 2004). O fermento láctico também tem a finalidade de contribuir para o desenvolvimento das características sensoriais desejadas do produto e pode ainda oferecer benefícios à saúde do consumidor, como os proporcionados pelos probióticos (BERESFORD e WILLIAMS, 2004).

Os fermentos lácticos procuram reproduzir a microbiota láctica de queijos e, portanto, são compostos de BAL iniciadoras ou são culturas *starters* e microrganismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas. As BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante a elaboração do queijo e contribuem para o processo de cura. Já, os microrganismos secundários geralmente estão envolvidos na definição das características sensoriais do queijo (BERESFORD et al., 2001)

Os gêneros de BAL mais comumente encontrados em queijos são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000). A Tabela 1 apresenta a classificação dos gêneros de BAL de acordo com sua morfologia, temperatura de crescimento e produto formado.

Tabela 1. Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.

Gênero	Morfologia	T _{ótima} de crescimento	Tipo de ácido láctico formado	Fermentação de açúcar
<i>Lactococcus</i>	Cocos/cadeias	30 °C	L(+)	Homo
<i>Streptococcus</i>	Cocos/cadeias	42 °C	L(+)	Homo
<i>Enterococcus</i>	Cocos/cadeias	42 °C	L(+)	Homo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos/pares	30 °C	D(-)	Hetero
<i>Lactobacillus</i>	Bastões/pares	30 °C e 42 °C	D(-), L(+) e DL	Homo e hetero

Fonte: Adaptado de Fox et al. (2000) e Carr et al. (2002).

Lactococcus

Os lactococos são os microrganismos mesofílicos mais usados para a produção de ácido nas fermentações lácteas, pois são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Eles têm capacidade de crescer a 10 °C, mas não a 45 °C e em pH ótimo de 6,0–6,5, que são características importantes usadas na sua identificação. Na temperatura entre 20 °C e 30 °C, os lactococos levam de 10 horas a 20 horas para fermentar o leite cru. O número aproximado de células viáveis necessárias para realizar a coagulação ácida do leite é de 10⁸/ mL (TEUBER, 1995).

Entre as espécies conhecidas de lactococos, somente uma, *Lactococcus lactis*, é significativa na fermentação dos produtos lácteos, destacando-se, como mais importantes, as subespécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (FOX et al., 2000). Por sua vez, a variante *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* é capaz de converter citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (HASSAN e FRANK, 2001). As características que diferenciam estas subespécies são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características que diferenciam as duas subespécies de *Lactococcus lactis*.

Microrganismo	Metab. do citrato	Prod. de NH ₃ da arginina	Cresc. em diferentes T(°C) e				[NaCl]
			10	15	40	45	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	±	+	+	+	+	-	4%
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	±	-	+	+	-	-	2%

Fonte: Adaptado de Fox et al. (2000).

Lactococcus são geralmente predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa. Sua presença é reduzida durante o processo de cura, podendo até desaparecer após seis a oito semanas (FONTÁN et. al, 2001; LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000). Também é interessante ressaltar que Klijn et al. (1995) isolaram lactococos de diferentes fontes ambientais como solo e água de efluentes, indicando que estes microrganismos podem sobreviver fora do ambiente de laticínios.

Lactobacillus

As bactérias deste gênero possuem a forma de bastões e são as mais tolerantes ao meio ácido (HAMMES e VOGEL, 1995). No leite, iniciam o crescimento, preferencialmente, em pH próximo de 5,5–6,2, reduzindo-o para valores abaixo de 4,0 (HASSAN e FRANK, 2001).

De acordo com Fox et al. (2000), os lactobacilos podem ser divididos em três grupos baseados no produto final de sua fermentação. Orla-Jensen, em 1919, denominou o primeiro grupo de Thermobacteria, o segundo de Streptobacteria e o último de Betabacteria (CARR et al., 2002; HAMMES e VOLGEL, 1995).

O primeiro grupo é formado por lactobacilos termofílicos homofermentativos que utilizam apenas hexoses como fonte de carbono para produzir ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*).

No segundo grupo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos, que utilizam outras fontes de carbono além de hexoses (HASSAN e FRANK, 2001), sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, CO₂, álcool e H₂O₂. Este grupo inclui *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* que não são comumente encontrados no fermento láctico, mas estão associados à fermentação secundária, benéfica durante a cura do queijo (BERESFORD e WILLIAMS, 2004). Esses lactobacilos são chamados de *non starter acid lactic bacteria* (NSLAB), bactérias ácido-láticas não iniciadoras, geralmente encontrados em fermentos lácticos artesanais (CROW et al., 2001; FOX et al., 2000).

No terceiro grupo, estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono. Esses microrganismos podem produzir sabores indesejáveis e gás durante a cura do queijo (HASSAN e FRANK, 2001). Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*, que também não são encontrados no fermento láctico (FOX et al., 2000).

Os lactobacilos heterofermentadores obrigatórios são detectados com menor frequência em queijos (BERESFORD e WILLIAMS, 2004).

Streptococcus

O gênero *Streptococcus* englobava todos os microrganismos que hoje fazem parte dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Era subdividido em quatro grupos diferentes, de acordo com suas características fisiológicas: *lactis*, *enterococos*, *pyogenis* e *viridians* ou *oral*. Os dois primeiros grupos se tornaram gêneros independentes e os dois últimos permanecem no gênero *Streptococcus* (HARDIE e WHILEY, 1995; HOLT et al., 1994).

Muitas espécies deste gênero ainda estão sendo estudadas e reagrupadas de acordo com suas características taxonômicas, sendo que algumas delas são parasitárias do homem e outras são patogênicas. Por apresentarem características taxonômicas muito próximas, as espécies *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus thermophilus* foram, temporariamente, tratadas como uma única espécie: *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* e subsp. *thermophilus* (HARDIE e WHILEY, 1995).

Streptococcus thermophilus é a única espécie do gênero *Streptococcus* utilizada nas fermentações lácteas (HASSAN e FRANK, 2001), sendo considerada a segunda mais importante cultura iniciadora industrial, depois das culturas de *Lactococcus lactis* (HOLS et al., 2005). Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45 °C e também a 52 °C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE e WHILEY, 1995). Apresenta a habilidade de fermentar um pequeno número de carboidratos (HASSAN e FRANK, 2001), suporta uma concentração máxima de NaCl de 2,5% (FOX et al., 2000) e possui atividade proteolítica limitada. O pH ótimo para o crescimento do *S. thermophilus* é de 6,5 (HASSAN e FRANK, 2001).

Streptococcus thermophilus é tradicionalmente usado na fabricação de iogurte e de muitos queijos, como, por exemplo, os queijos Emmental,

Gruyère, Parmigiano e Grana, Mozzarella e Cheddar. Isto ocorre porque estas variedades são caracterizadas pelo emprego de temperatura elevada (50 °C–55 °C), requerendo o uso de fermento termofílico (MICHEL e MARTLEY, 2001). No processamento de queijos, *S. thermophilus* pode ser usado sozinho ou em combinação com alguns *starters* de lactobacilos ou mesofílicos (DELORME, 2008).

Na fermentação láctea o papel do *S. thermophilus* está relacionado a sua rápida conversão de lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008).

No entanto, a maior parte dos produtos lácteos submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação é acidificada pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* spp. A vantagem do uso combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* spp. é que os lactobacilos termofílicos desempenham o importante papel de utilizar a galactose, a qual não é utilizada pelo *S. thermophilus*. Dessa maneira, os lactobacilos termofílicos complementam a acidificação do queijo e reduzem o seu escurecimento (fenômeno conhecido como *browning*), que ocorre quando ele é aquecido (MICHEL e MARTLEY, 2001).

Leuconostoc

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são distinguidas das outras BAL por serem cocos heterofermentativos. Estas bactérias apresentam crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20 °C–30 °C. As duas espécies associadas aos produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* (FOX et al., 2000).

Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como microrganismo aromatizante (HASSAN e FRANK, 2001). A produção de diacetil, CO₂ e acetoína a partir do citrato é responsável pela qualidade organoléptica, consistência, textura e formação de

olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (DELLAGLIO et al., 1995).

Enterococcus

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais frequentes em alimentos. São encontrados em grandes proporções no trato gastrointestinal de mamíferos e também no solo, superfície das águas e plantas. Os enterococos chegam aos alimentos por meio de contaminações intestinais ou ambientais e multiplicam-se durante a fermentação (GIRAFFA, 2003), ocorrendo em grande número em produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2002). Esses microrganismos sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremas (CARIDI et al., 2003).

Os enterococos fazem parte da microbiota láctica secundária dos produtos lácteos. Eles são encontrados em muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa, a partir do leite cru e pasteurizado, como os queijos Feta, Kasseri, Manchego e Majonero (COGAN et al. 1997). A Tabela 3 apresenta uma lista de queijos europeus nos quais os enterococos foram estudados.

No Brasil, o gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Ceará (CARVALHO, 2007), assim como as isoladas do mesmo tipo de queijo produzido no Rio Grande do Norte (BRUNO et al., 2007).

Nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano (FONTÁN et al., 2001; MEDINA et al., 2001).

A presença desses microrganismos em queijos produzidos com leite pasteurizado ocorre por causa da sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10 °C–45 °C) e à sua resistência a altas temperaturas.

Tabela 3. Presença de enterococos em queijos europeus.

Origem	Queijo	Tipo de leite	Referência
Francês	Comté	Vaca	Bouton et al. (1998)
Francês	Roquefort	Vaca	Devoyod (1969)
Francês	Venaco	Cabra/ Ovelha	Casalta e Zennaro (1997)
Grega	Feta	Ovelha	Litopolou-Tzanetaki et al. (1993)
Grega	Kefalotyri	Ovelha	Litopolou-Tzanetaki et al. (1990)
Grega	Orinotyri	Ovelha	Prodromou et al. (2001)
Irlandês	Cheddar	Vaca	Gelsomino et al. (2001)
Italiano	Montasio	Vaca	Basso et al. (1994)
Italiano	Mozzarella	Vaca	Morea et al. (1999)
Italiano	Pecorino Pardo	Ovelha	Mannu e Paba (2002)
Italiano	Semicotto	Cabra	Suzzi et al. (2000)
Português	Serra da Estrela	Ovelha	Tavaria e Malcata (1998)
Espanhol	Armada	Cabra	Tornadijo et al. (1995)
Espanhol	Cebreiro	Vaca	Centeno et al. (1999)
Espanhol	Majonero	Cabra	Fontecha et al. (1990)
Espanhol	Manchego	Ovelha	Ramos et al. (1981)
Espanhol	Tetilla	Vaca	Menéndez et al. (2001)
Espanhol	San Simón	Vaca	García et al. (2001)

Fonte: Adaptada de Foulquié Moreno et al. (2006).

Dessa forma, os enterococos podem aumentar durante a refrigeração do leite e sobreviver à pasteurização. No entanto, a alta contaminação de enterococos em alguns queijos industrializados a partir do leite pasteurizado, geralmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a sua elaboração (GIRAFFA, 2003).

As espécies do gênero *Enterococcus* apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. Pesquisas realizadas por Durlu-Ozkaya et al. (2001) e Sarantinopoulos et al. (2002) mostraram que somente uma pequena parcela dessas espécies promoveu a redução do pH do leite para 5,0–5,2, após 16–24 horas de incubação a 37 °C.

O *E. faecalis* tem maior poder de acidificação que o *E. faecium*. Suzzi et al. (2000) observaram que o *E. faecalis*, isolado de queijos artesanais italianos, reduziu o pH de leite desnatado para 4,5 após 24 horas de fermentação.

A influência positiva dos enterococos no queijo se deve ao desenvolvimento de características sensoriais, por meio de reações bioquímicas durante a cura: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Além disso, algumas espécies de *Enterococcus* podem produzir bacteriocinas, motivo pelo qual elas são aplicadas como fermento láctico primário. Contudo, o seu maior uso ainda é como fermento adjunto (GIRAFFA, 2003).

O Advisory Committee on Novel Foods and Processors (ACNFP) permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento láctico em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003). No entanto, o uso de outras espécies de *Enterococcus* em queijos é questionado, pois há necessidade de mais estudos sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos desse uso (COGAN et al., 1997).

Métodos de Isolamento e Caracterização de Bactérias Lácticas

As técnicas empregadas para a caracterização de microrganismos em queijos podem ser reunidas em três grupos:

- 1) Métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização fenotípica.
- 2) Métodos que envolvem o cultivo, seguidos da caracterização molecular.
- 3) Métodos que envolvem somente a caracterização molecular (BERESFORD et al., 2001).

Embora a microbiologia clássica dependa exclusivamente da primeira abordagem, a identificação de espécies de bactérias ácido-lácticas

usando apenas métodos fenotípicos apresenta limitações, sobretudo em relação à sensibilidade do método. Os métodos moleculares, por sua vez, apresentam como características a reprodutibilidade, automação, rapidez, sendo, muitas vezes, também independentes de cultivo (KALLIOPI et al., 2004).

Existe uma grande diversidade de meios de cultura para o isolamento de BAL em produtos lácteos. No entanto, a escolha do meio deve ser baseada nas características particulares do microrganismo a ser estudado, e, também, do produto ou do seu habitat (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001). Em geral, o ágar M17, desenvolvido por Terzaghi e Sandine, tem sido usado para o isolamento de BAL na forma de cocos, e o ágar Rogosa acidificado ou o ágar MRS, desenvolvido por Man, Rogosa e Sharpe, para o isolamento de BAL na forma de bastões (CARVALHO, 2007; MARINO et al., 2003; RICHTER e VEDAMUTHU, 2001).

A incubação em diferentes temperaturas de crescimento também é um fator importante para a seleção de microrganismos mesofílicos e termofílicos. Para o queijo Coalho, por exemplo, podem ser empregadas as temperaturas de 30 °C, para isolar BAL mesofílicas e 42 °C, para as termofílicas (CARVALHO, 2007).

As colônias isoladas nos meios já descritos são então purificadas, geralmente em ágar MRS, e submetidas aos seguintes testes: coloração de Gram, verificação da morfologia, teste de atividade de catalase e de produção de ácido (CARVALHO, 2007). Os microrganismos gram-positivos, produtores de ácido, com morfologia de cocos ou bastões são considerados BAL. No entanto, uma série de novos testes ainda é necessária para classificá-los em gênero e espécie.

Os testes fisiológicos e bioquímicos são bastante demorados e, para auxiliar na sua identificação, sistemas comerciais têm sido desenvolvidos, onde são utilizados diferentes conjuntos de substratos miniaturizados. Um exemplo disso é o Sistema API 50CH (bioMerieux). Também, visando diminuir o tempo e o custo da identificação, instrumentos automatizados para a identificação rápida de

microrganismos, como o VITEK®2 (bioMérieux, Marcy L'Étoile, França) e o Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, Md) são disponibilizados (EIGNER et al., 2005).

A identificação de bactérias ácido-láticas usando-se apenas métodos fenotípicos também apresenta limitações. Segundo Quere et al. (1997) uma clara identificação de espécies usando apenas métodos fenotípicos, particularmente dentro do gênero *Lactobacillus*, pode ser ambígua e complicada. Isso ocorre em razão da pequena variação de características como, por exemplo, o padrão de fermentação de açúcares, entre as espécies de BAL. A identificação bioquímica convencional de *E. faecium* também é bastante morosa, e às vezes inconclusiva, além de geralmente não diferenciar *E. faecium* de *E. durans*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (CHENG et al., 1997).

De modo geral, a identificação realizada apenas por meio de testes bioquímicos e fisiológicos clássicos é pouco eficiente para separar biotipos atípicos de espécies fenotipicamente relacionadas e, muitas vezes, não permitem a separação genética de subespécies, como no caso de *Lactococcus lactis*, que podem pertencer à subespécie *lactis* ou a subespécie *cremoris*, sendo esta última especialmente adequada para a fabricação de certos tipos de queijo, como o Cheddar (DELGADO e MAYO, 2004).

A caracterização de isolados abaixo do nível de espécie pode ser usada para estimar a diversidade microbiana presente em populações naturais, e para determinar a contribuição tecnológica de espécies ou biotipos individuais durante os processos de fabricação e maturação de queijos. As cepas caracterizadas podem também representar uma fonte de variabilidade fenotípica e genética, a partir da qual novas cepas ou propriedades podem ser selecionadas (DELGADO e MAYO, 2004).

Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos como alternativa para identificação e classificação mais acurada de microrganismos. Muitos deles se baseiam no uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual tem sido empregada para confirmar a

identificação bioquímica de bactérias ácido-láticas isoladas de diversos tipos de queijos como, por exemplo, do queijo artesanal italiano Montasio (MARINO et al., 2003) e do queijo Coalho (QUEIROZ, 2008).

Na PCR específica, uma pequena sequência de nucleotídeos, específica da espécie de interesse, é escolhida e utilizada como *primer* para identificação do organismo. Na Tabela 4, são mostrados alguns exemplos de *primers* específicos para alguns tipos de BAL.

Tabela 4. Alguns *primers* para identificação de BAL.

Organismo	<i>Primer</i> (sequência 5' para 3')	Tamanho do produto do PCR (pb)	Referência
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CACTATGCTCAGAATACA CGAACAGCATTGATGTTA	968	Lick et al., 1996
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CTAGCGGGTGC GACTTTGTT GGCCAGCTATGTATTC ACTGA	312	Song et al., 2000
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT CCTGAACTGAGAGAATTTGA	248	Song et al., 2000
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	AAAGAATTTTCAGAGAAA ATTTAGAATTGGTTCAAC	343	Beimfohr et al., 1997
<i>Enterococcus faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Cheng et al., 1997
<i>Enterococcus faecalis</i>	CATGCGCAATTAATCGG CATAGCCTGTCGCAAAAC	444	Lleó et al., 1999

Queiroz (2008) utilizou a PCR específica para confirmação da identificação bioquímica de isolados de BAL de queijos Coalho. Entre 20 *Lactobacillus* selecionados e identificados bioquimicamente como *Lb. paracasei*, apenas 12 foram confirmados nesta espécie, enquanto que nenhum dos microrganismos previamente identificados como sendo *Lb. plantarum* tiveram a identificação confirmada.

Resultado semelhante foi obtido pelo mesmo pesquisador na identificação molecular de 19 isolados, primeiramente identificados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a qual confirmou que apenas nove deles pertenciam a esta espécie (QUEIROZ, 2008).

Métodos baseados em PCR, como o RAPD (amplificação randômica do DNA polimórfico) e o AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), têm sido também utilizados para tipagem molecular (GIRAFFA et al., 2004; GIRAFFA e ROSSETTI, 2004; GOBETTI et al., 2002; SESENA et al., 2004; VENTURA e ZINK, 2002). Essas técnicas são ferramentas rápidas e confiáveis para realizar o *fingerprinting* molecular com o objetivo de identificar e distinguir várias espécies de bactérias ácido-láticas de amostras clínicas, fecais, intestinais e de alimentos (VENTURA e ZINK, 2002). No caso da indústria de alimentos, isto permite a seleção, identificação, caracterização e rastreamento de bactérias ácido-láticas usadas em vários produtos alimentícios.

Outro método molecular que também pode ser utilizado na identificação é o sequenciamento. São utilizados *primers* para amplificação de uma região conservada nos microrganismos, a qual será posteriormente sequenciada. Tannock et al. (1999) propuseram um método baseado no sequenciamento da região espaçadora 16S-23S de isolados de *Lactobacillus*, seguido da comparação das sequências obtidas com as sequências depositadas no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.).

Considerações Finais

Para que se promova a melhoria e o desenvolvimento de produtos lácteos, tais como os queijos artesanais e/ou dos processos associados a sua produção, o conhecimento da microbiota láctica presente nesses alimentos e do seu papel no desenvolvimento das características desses produtos é essencial. Assim, a avaliação das bactérias ácido-láticas de queijos artesanais e o estudo de suas características tecnológicas é

uma etapa fundamental para a seleção de culturas lácticas que possam ser empregadas para a produção de queijo a partir do leite pasteurizado. Este tipo de seleção visa, em última instância, a preservação das características originais do produto artesanal, elaborado com leite cru, assegurada pela inoculação de uma cultura constituída dos microrganismos que realmente contribuem para o desenvolvimento das características do produto.

Referências

BEIMFOHR, C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 216-221, 1997.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

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

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; VASCONCELOS, N. M.; NASSU, R. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Isolamento e identificação preliminar de bactérias ácido lácticas de leite e queijo de coalho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 19., 2004, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. 1 CD-ROM.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, A. K. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. Caracterização de microbiota láctica isolada de queijos de Coalho comercializados no Rio Grande do Norte. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 15., 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: VC Eventos, 2007. 1 CD-ROM

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 201-209, 2003.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 28, n. 4, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHENG, S.; MCCLESKEY, F. K.; GRESS, M. J.; PETROZIELLO, J. M.; LIU, R.; NAMDARI, H.; BENINGA, K.; SALMEN, A.; DEL VECCHIO, V.G. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 5, p. 49-56, 1997.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.

CROW, V.; CURRY, B.; HAYES, M. The ecology of non starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjunct in New Zealand Cheddar. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 275-283, 2001.

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

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

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI. E.;

Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, 2001.

EIGNER, U.; SCHMID, A.; WILD, U.; BERTSCH, D.; FAHR, A. M. Analysis of the Comparative Workflow and Performance Characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 8, p.3829-3834, 2005.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2001.

FOULQUIÉ MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

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

GIRAFFA, G.; ANDRIGHETTO, C.; ANTONELLO, C.; GATTI, M.; LAZZI C.; MARCAZZAN, G.; LOMBARDI, A.; NEVIANI, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n. 2, p. 129-139, 2004.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v.237, n. 1, p. 133-138, 2004.

GOBBETTI, M.; MOREA, M. BARUZZI, F.; CORBO, M.R.; MATARANTE, A.; CONSIDINE, T.; CAGNO,R.; GUINEE, T.; FOX, P.F. Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v.12, n. 6, p. 511-523, 2002.

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

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

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

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

HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; DECARIS, B.; BOLOTIN, A.; DELORME, C.; EHRlich, S. D.; GUÉDON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 435-463, 2005.

HOLT, J. G.; GRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. Cap. 17.

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

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n. 2, p. 103-125, 1998.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; de VOS, W. M. Detection and characterization of lactose-utilizing Lactococcus spp. in natural ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 788-792, 1995.

LICK, S.; KELLER, M.; BOCKELMANN, W.; HELLER, K. J. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p. 74-77, 1996.

LLEO, M. M.; TAFI, M. C.; SIGNORETTO, C.; CERO, C.; CANEPARI, P. Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, n. 4 p. 345-353, 1999.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2 p. 233-240, 2004.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild Lactococcus lactis strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MARINO, M.; MAIFRENI, M. RONDONINI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1 p. 133-140, 2003.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in Ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 4, p. 559-563, 2001.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Characteristics of "Tetilla" pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1 p. 97-104, 2004.

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

QUEIROZ, A. A. M. **Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de queijo de Coalho no Ceará**. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

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

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1/2, p. 125-136, 2002.

SONG, Y.; KATO, N.; LIU, C.; MATSUMIYA, Y.; KATO, H.; WATANABE, K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**. v.187, n. 2, p. 167-173, jun., 2000.

SESENA, S.; SANCHEZ, I.; PALOP, L. Genetic diversity (RAPD-PCR) of lactobacilli isolated from "Almagro" eggplant fermentations from two seasons. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 1, p. 159-165, 2004.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANNINI, L.; GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-274, 2000.

TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONGS.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.

TESHIMA, E.; VIANA, A. C.; ASSIS, M. M. S.; FIGUEIREDO, H. M. Identidade e qualidade do queijo de coalho comercializado em Feira de Santana. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 194-198, 2004.

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

VENTURA, M.; ZINK, R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2 p. 141-154, 2002.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

