



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

**LUANA FARIA SILVA**

**Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de  
búfala**

São José do Rio Preto

2010

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA ISOLADA  
DE QUEIJO MUSSARELA DE BÚFALA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia

**Orientador:** Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

**Co-orientador:** Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto

2010

Silva, Luana Faria.

Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala / Luana Faria Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

153 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Co-orientador: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Queijo – Análise. 3. Ácido láctico. I. Penna, Ana Lúcia Barretto. II. Nogueira, Mara Corrêa Lelles. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 637.356

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

# **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA ISOLADA DE QUEIJO MUSSARELA DE BÚFALA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna  
Professor Adjunto  
UNESP - São José do Rio Preto  
Orientador

Profa. Dra. Kátia Sivieri  
Professor Doutor  
UNESP - Araraquara

Profa. Dra. Eleni Gomes  
Professor Adjunto  
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de novembro de 2010.

*“Dedico esta conquista aos meus pais Evaristo e Vera, e meus irmãos Evaristo Junior e Euclides, que sempre me apoiaram e acreditaram em meus projetos.*

*Dedico aos meus Avós Ranulfa e Ival, Francisco e Luzia (in memoriam).*

*Amo vocês !!”*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por me iluminar durante o desenvolvimento do projeto de Mestrado, e por cada dia que esteve ao meu lado me dando força e sabedoria.

Aos meus pais e irmãos que me apoiaram sempre, muito obrigada!

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna pela oportunidade, orientação, paciência e amizade, muito obrigada!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira pela co-orientação, colaboração, sugestões e amizade, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner pela colaboração e disposição em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira pela colaboração, confiança e disponibilidade do laboratório de Biologia Molecular para a realização das análises.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo e seus alunos Thiago e Janaina, pela colaboração para com as análises dos compostos voláteis.

À Profa. Dra. Eliana Lemos (Unesp Jaboticabal) e de sua aluna Elisângela pela colaboração para o uso do programa BioNumerics.

Aos Laticínios Búfalo Dourado e Tavolaro pela colaboração e disponibilidade para a realização das coletas.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao meu amigo Tiago Casella pelo auxílio com as coletas e análises, compreensão e amizade no decorrer deste projeto, muito obrigada!

Às minhas amigas Ana Maria, Daiane, Fernanda e Rafaela que sempre torceram por mim, muito obrigada!

Às minhas amigas Aline De Grandi, Catharina, Gisele Juliana, Michele, Vidiany, pelo companheirismo e amizade sempre, muito obrigada AMIGAS!

Agradeço às minhas companheiras do laboratório, pelo auxílio sempre.

Agradeço às minhas amigas da FAMERP, Gislaine, Keith e Milena, por tudo, muito obrigada AMIGAS!

A todos os funcionários da sessão de Pós-Graduação do IBILCE e do Departamento de Biologia e de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e auxílio na realização deste trabalho.

Aos técnicos Ginaldo, Luiz e Tânia pela amizade e auxílio sempre.

À Luceli e à Profa. Dra. Margarete (FAMERP), obrigada pelo auxílio e amizade.

*“ Tudo posso naquele que me fortalece ”*

(Filipenses 4:13)

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTA DE QUADROS E TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral .....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1. Aspectos gerais sobre o leite de búfala.....	23
3.1.1. Queijo Mussarela de búfala e tecnologia de fabricação .....	26
3.2. Bactérias ácido – lácticas (BAL).....	31
3.2.1. Isolamento e Identificação.....	40
3.2.1.1. Técnicas moleculares utilizadas para a identificação de BAL .....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Obtenção das amostras .....	51
4.1.1. Preparo das culturas lácticas .....	51
4.1.2. Processo industrial de fabricação do queijo Mussarela de búfala e pontos de coletas de amostras .....	52



4.2. Isolamento das bactérias ácido-láticas (BAL) e caracterização por coloração de Gram e teste de catalase .....	56
4.3. Triagem dos isolados .....	58
4.3.1. Cinética de acidificação .....	59
4.3.2. Determinação da atividade proteolítica .....	60
4.3.3. Determinação da assimilação de citrato .....	61
4.3.4. Caracterização dos compostos voláteis.....	62
4.4. Identificação genotípica dos isolados .....	63
4.4.1. Extração com kit “Easy DNA” TM.....	63
4.4.2. Análise por RAPD ( <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> ).....	64
4.4.3. Reação de PCR para o sequenciamento do gene 16S rRNA.....	65
4.4.3.1. Purificação do produto de PCR para o sequenciamento.....	66
4.4.3.2. Sequenciamento da região 16S rRNA .....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
5.1. Isolamento das bactérias ácido – láticas (BAL) .....	67
5.2. Identificação por coloração de Gram e teste de catalase .....	74
5.3. Identificação genotípica.....	78
5.3.1. Análise por RAPD ( <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> ) .....	78
5.3.2. Sequenciamento da região 16S rRNA .....	83
5.4. Cinética de acidificação.....	87
5.4.1. Determinação da atividade proteolítica .....	93
5.4.2. Utilização de citrato.....	98
5.4.3. Produção de compostos voláteis.....	100
6. CONCLUSÃO.....	111

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
8. ANEXOS .....	143

## RESUMO

No Brasil, o queijo Mussarela elaborado com leite de búfala, tem uma boa aceitação pelos consumidores e mercado em expansão. Entretanto, poucas são as pesquisas em âmbito nacional sobre a microbiota e influência das bactérias ácido-láticas utilizadas na produção, sobre a qualidade tecnológica deste queijo. O objetivo deste trabalho foi compor um banco de culturas representativo da microbiota isolada de queijo Mussarela fabricado com leite de búfala e efetuar a caracterização das bactérias ácido-láticas (BAL). Foram realizadas três coletas em dois laticínios (Laticínios A e B), em diferentes etapas do processo de fabricação, assim como no produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação) recém processado e com 14 e 28 dias de estocagem. Foi feita a contagem de colônias viáveis, isolamento dos mesófilos e termófilos, caracterização morfológica por coloração de Gram e teste de catalase. Foram obtidos 313 isolados que apresentaram características de BAL. As culturas isoladas das amostras do queijo do Laticínio B foram identificadas pela técnica de RAPD e sequenciamento do gene 16S rRNA e caracterizadas quanto à atividade acidificante, capacidade de utilizarem o citrato, atividade proteolítica e capacidade de produzirem compostos voláteis precursores de aromas. Para os dois laticínios, a população de microorganismos termófilos prevaleceu sobre os mesófilos. Os isolados foram identificados como *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Leuconostoc mesenteroides*. A velocidade máxima de acidificação para os isolados variou de 0,0005 e 0,0305 unidades de pH por minuto após 20 min e 18 h 50 min do início do processo de fermentação, respectivamente para termófilos e mesófilos. O tempo necessário para atingir o pH 5,0 variou de 4 h 50 min a 60 h do início da fermentação, sendo menor para os termófilos. As bactérias testadas foram capazes de utilizarem o citrato. Os compostos voláteis produzidos pelos isolados foram: ácido-acético,

acetona, acetaldeído, etanol, 3-hidroxi-2-butanona e 3-metil-butanol. A caracterização das culturas lácticas autóctones isoladas auxiliou no entendimento da dinâmica populacional das BAL presentes no queijo e na relação com sua qualidade. As culturas isoladas apresentaram potencial para aplicação industrial.

Palavras chave: Culturas autóctones, RAPD, seqüenciamento 16S rRNA, cinética de acidificação, compostos voláteis.

## ABSTRACT

In Brazil, the Mozzarella cheese prepared with buffalo milk has a good acceptance and market expansion. However, there are few national studies about microflora and influence of lactic acid bacteria, used in production, on the technological quality of this cheese. The aim this study was to compose a representative bank of the microbial cultures isolated from Mozzarella cheese produced with buffalo milk and to characterize the lactic acid bacteria (LAB). Three collections were performed in two dairy (Dairy A and B) at different stages of the manufacturing process as well as the finished product (Mozzarella cheese and whey conservation) newly processed and with 14 and 28 days of storage. It was followed a count of viable colony, isolation of mesophiles and thermophiles, morphological characterization by Gram staining and catalase test. It was obtained 313 isolates that exhibited characteristics of LAB. The cultures isolated of the cheese samples of the cheese from the Dairy B were identified by RAPD and 16S rRNA gene sequencing and characterized by acidifying activity, ability to utilize citrate, proteolytic activity and ability to produce volatile compounds that are flavor precursors. At two dairies, the population of thermophilic microorganisms was higher than mesophylic. The isolates were identified as *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Leuconostoc mesenteroides*. The top speed of acidification for the isolates ranged from 0.0005 and 0.0305 pH units per minute after 20 minutes and 18:50 of the beginning of the fermentation process, respectively for thermophiles and mesophiles. The time required to reach the pH 5.0 ranged from 4h50min to 60h the beginning of fermentation, and for the thermophiles time was shorter. The bacteria tested were able to metabolize citrate. The volatile compounds produced by bacteria were acetic acid, acetone, acetaldehyde,

ethanol, 3-hydroxy-2-butanone and 3-methyl-butanol. The characterization of lactic cultures isolated native helped in understanding population dynamics of LAB present in cheese and its relationship to quality. The isolated cultures showed potential for industrial application.

Keywords: autoctones culture, RAPD, 16S rRNA sequencing, Kinetics of acidification, volatile compounds

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

páginas

<b>Quadro 1 -</b>	Frações de caseína no leite de vaca e de búfala (ZICARELLI, 2004)	24
<b>Quadro 2 -</b>	Identificação de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos artesanais usando técnicas dependente e independente de cultivo	45
<b>Tabela 1 -</b>	População de bactérias láticas mesófilas e termófilas, isoladas das amostras coletadas no laticínio A, durante as etapas do processamento, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação), recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C.	69
<b>Tabela 2 -</b>	População de bactérias láticas mesófilas e termófilas, isoladas das amostras coletadas no laticínio B, durante as etapas do processamento, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação), recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C.	73
<b>Tabela 3 -</b>	Total de bactérias ácido-láticas isolados aleatoriamente das amostras provenientes das três coletas do Laticinio A.	76
<b>Tabela 4 -</b>	Total de bactérias ácido-láticas isolados aleatoriamente das amostras provenientes das três coletas do Laticinio B.	77

- Tabela 5 -** Similaridade (%) e código de acesso das sequências depositadas no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) das culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem e identificadas a partir do sequenciamento de 500 pb do gene 16S rRNA. 84
- Tabela 6 -** Cinética de acidificação das culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela e comerciais 89
- Tabela 7 -** Atividade proteolítica das culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala. 93
- Tabela 8 -** Compostos voláteis produzidos pelas bactérias ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. 101



## LISTA DE FIGURAS

		páginas
<b>Figura 1 -</b>	Rotas bioquímicas de utilização do citrato pelas bactérias ácido-láticas.	40
<b>Figura 2 -</b>	Etapas do processo de fabricação dos queijos Mussarela de búfala dos laticínios A e B e pontos de coleta de amostras	54
<b>Figura 3 -</b>	Fragments de DNA separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 % em TAE 1X, seguindo o protocolo utilizado por De Dea Lindner (2008), com algumas modificações. A reação de PCR foi submetida a 45 ciclos de amplificação, com a etapa de desnaturação inicial a 95 °C/min, desnaturação a 94 °C/60 s, anelamento a 40 °C/1 min, extensão a 72 °C/2 min e extensão final a 72 °C/10 s. A eletroforese foi realizada em 3 h (30 min a 100 V e 2,5 h a 50 V). Os DNAs utilizados foram extraídos usando Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad California. Foi aplicado 3 µL de marcador de massa molecular de 1000 pb.	79
<b>Figura 4-</b>	Análises de <i>clusters</i> dos padrões de RAPD usando o primer M13 seguindo a metodologia de De Dea Lindner (2008), com algumas modificações. Foram analisadas 82 culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala. $\geq 90\%$ de similaridade, os <i>clusters</i> foram considerados sendo o mesmo biotipo. As chaves representam os <i>clusters</i> com $\geq 90\%$ de similaridade. Os clusters I, II, VI, IX, X e XIII são compostos pelas culturas isoladas de diferentes dias de coleta.	80

	<b>páginas</b>
<b>Figura 5-</b>	Curvas de acidificação das culturas mesófilas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem, cultivadas em ágar MRS. As culturas fermentaram o leite de búfala até atingir o pH 5,0. A cepa comercial <i>Lactobacillus casei</i> (LC-1 Chr. Hansen) foi usada como controle. 90
<b>Figura 6-</b>	Curvas de acidificação das culturas termófilas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem, cultivadas em ágar M17. As culturas fermentaram o leite de búfala até atingir o pH 5,0. A cepa comercial <i>Streptococcus thermophilus</i> (STM5, Fundação André Tosello) foi usada como controle. 90
<b>Figura 7-</b>	Formação de halo de hidrólise por culturas ácido-láticas proteolíticas. O diâmetro do halo de hidrólise em ágar leite representando a atividade proteolítica das culturas variou entre 10,55 e 19,66 mm. Para cocos termófilos e bacilo mesófilo identificado como <i>Lactobacillus fermentum</i> , respectivamente. 94
<b>Figura 8-</b>	Imagem representando o cultivo de bactérias ácido-láticas capazes de utilizar o citrato. 98
<b>Figura 9-</b>	Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 3 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. 102
<b>Figura 10-</b>	Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 25 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. 103
<b>Figura 11-</b>	Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 28 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. 104

- Figura 12-** Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 55 105  
(*Leuconostoc mesenteroides*) isolada do queijo Mussarela de búfala  
com 28 dias de estocagem.
- Figura 13-** Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 76 106  
(*Lactobacillus delbrueckii*) isolada do queijo Mussarela de búfala com  
28 dias de estocagem.

## 1 - INTRODUÇÃO

A produção de leite de búfalas no Brasil é de 92,3 milhões de litros (Associação Brasileira de Criadores de Búfalos – ABCB, 2009), com o aumento de cerca de 30% ao ano, envolvendo aproximadamente 150 indústrias produzindo os derivados do leite no país. Anualmente, estes laticínios produzem em média 18,5 mil toneladas de derivados, o que gera um faturamento bruto da ordem de US \$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de US \$ 17 milhões aos criadores, sendo que dos derivados, cerca de 70% é representado pelo queijo Mussarela de búfala.

O queijo Mussarela imerso em soro é o principal derivado de leite de búfala consumido pelos brasileiros, principalmente pratos de origem italiana, ou como aperitivo. O consumo deste produto tem aumentado durante os últimos 20 anos, estando presente em pratos de origem Italiana consumidos em diversos países. Este queijo é caracterizado por uma massa filada, com alta umidade e alto teor lipídico, apresenta corpo macio e coloração branca porcelanada. É elaborado seguindo a tecnologia de produção tradicional italiana, que usa culturas lácticas no processo de fermentação. O valor nutricional, aliado ao sabor do queijo Mussarela de búfala, o torna um alimento adicional à dieta diária de consumidores de ampla faixa etária.

As características sensoriais do queijo são decorrentes da ação do complexo enzimático das culturas ácido-láticas sobre os carboidratos, gorduras e proteínas, constituintes da matriz deste produto. As bactérias ácido-láticas mesófilas, tais como *Lactococcus lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, e termófilas, tais como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. helveticus*, são dominantes nas culturas utilizadas na elaboração do queijo Mussarela, participando da coagulação, acidificação e proteólise da

caseína no leite, conferindo-lhe textura, aroma e sabor.

Embora a microbiota láctica desempenhe importante contribuição à tecnologia de fabricação do queijo Mussarela de búfala, em nível nacional, há escassez de dados científicos sobre os aspectos morfo-fisiológicos, e principalmente, sobre as características genótípicas das espécies lácticas envolvidas, o que justifica a necessidade deste estudo. Considerando a taxa de crescimento da produção de leite de búfala e o interesse dos produtores na melhoria da qualidade dos produtos, os resultados obtidos poderão colaborar com o desenvolvimento da indústria brasileira de queijos, na busca de soluções inovadoras para a padronização do processo produtivo, melhoria da qualidade tecnológica e aumento da vida de prateleira dos produtos lácteos de massa filada.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral**

- compor um banco de culturas representativo da microbiota presente em queijo Mussarela fabricado com leite de búfala e caracterizar as bactérias ácido-láticas (BAL).

### **2.2 - Objetivos específicos**

- isolar as bactérias ácido-láticas *starter* (SLAB) e não *starter* (NSLAB) das amostras de leite, de amostras coletadas durante a fabricação e do queijo Mussarela de búfala;
- caracterizar genotipicamente os isolados obtidos pela técnica de RAPD e seqüenciamento do gene 16S rRNA;
- caracterizar os isolados quanto à propriedade tecnológica pela avaliação da atividade acidificante, capacidade de utilizar o citrato, capacidade proteolítica e capacidade de produzir compostos voláteis precursores de aromas.

### **3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 - Aspectos gerais sobre o leite de búfala**

O leite de búfala é considerado um alimento alternativo destinado à dieta de consumidores de ampla faixa etária, no entanto, no Brasil a ingestão deste produto *in natura* é restrita. O alto teor de gordura dificulta a assimilação do leite bubalino pelo organismo, além disso, esta matéria-prima também é considerada ácida (19°D) (FERREIRA et al., 1995). Assim, a secretaria de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPA), através da Portaria de nº 236, permite a adição máxima de 30 % do leite bovino ao bubalino, com intuito de sua normalização (FURTADO, 1990).

Apesar dos países asiáticos e da Itália se destacarem na produção do leite bubalino, no Brasil, a produção desse leite vem aumentando anualmente cerca de 30 % (ABCB, 2009). Segundo Buzi e colaboradores (2009), a melhoria na qualidade de produção e o significativo teor de proteínas e sais minerais presentes (em especial o cálcio), fazem com que este leite e seus derivados conquistem cada vez mais espaço no mercado.

O leite de búfala e seus derivados, produzidos principalmente na Itália, hoje se difunde por vários países, sendo que no Brasil, a sua produção é quase que na totalidade direcionada para a produção de queijo Mussarela (TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

Ccomparado ao leite de vaca, o leite bubalino apresenta uma percentagem mais elevada em todos os seus componentes. Apesar do seu alto percentual de gordura, o índice de colesterol do leite e da Mussarela é menor para os provenientes de búfalas em relação aos de vaca. A composição de 3,91 a 4,55 % de proteína e de 6,87 a 8,59 % de gordura, em relação ao leite de outras espécies (TONHATI; MUÑOZ; OLIVEIRA, 2000), permite que seu uso

seja uma alternativa economicamente mais favorável para a produção de queijos, entre outras variedades de produtos lácteos.

A composição do leite de búfala possui características próprias, que alteram conforme o período de lactação, a raça e a alimentação. Em geral, o leite bubalino apresenta 1,025 a 1,047 g/mL de densidade, 6,41 a 6,47 de pH, 14 a 20 °D de acidez (devido ao elevado teor de proteínas, em especial a caseína), -0,531 e -0,548 °C de crioscopia, 15,64 a 17,95 % de sólidos totais e 0,79 a 0,83 % de sais minerais (sendo até 25 % deste, composto por cálcio). Microbiologicamente, a qualidade do leite de búfala está intimamente relacionada aos hábitos do animal, clima e ao manejo de ordenha, bem como os fatores responsáveis pelas características físico-químicas (TEIXEIRA; BASTIANETO; OLIVEIRA, 2005).

As proteínas do leite de búfala (caseínas, albuminas e globulinas) são similares às daquelas do leite de vaca, porém não são idênticas e não são encontradas nas mesmas proporções. As proteínas do leite bubalino e bovino apresentam menores diferenças nas frações  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseína se comparado às frações  $\kappa$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína (Quadro 1). Pesquisas na Rússia demonstraram que a caseína do leite de búfalas apresenta 22 % mais aminoácidos essenciais do que a caseína do leite de vaca (TEIXEIRA; BASTIANETO; OLIVEIRA, 2005).



**Quadro 1** - Frações de caseína no leite de vaca e de búfala (ZICARELLI, 2004).

Frações	Búfala	Vaca	Búfala/Vaca
caseína	(%)	(%)	(%)
$\alpha_{s1}$	30,2	38,4	78,6
$\alpha_{s2}$	17,6	10,5	167,6
B	33,9	36,5	92,9
$\kappa$	15,4	12,5	123,9
Total	97,1	97,9	
$\alpha_{s1} + \alpha_{s2}$	47,8	48,9	97,7

A maior quantidade de  $\kappa$ -caseína presente no leite bubalino acelera a coagulação enzimática, o que requer menor quantidade de renina (ZICARELLI, 2004). Dessa forma, o ponto ótimo para a filagem de queijo Mussarela elaborado com o leite de búfala pode ser obtido com a coalhada em pH 4,9, enquanto com o leite bovino, em pH 5,0-5,2 (ADDEO; EMALDI; MASI, 1996).

A composição de aminoácidos da  $\kappa$ -caseína para as duas espécies difere na quantidade (mol/mol de proteína) de N-acetilgalactosamina (0-4,3 e 0-6,7) e de ácido siálico (5,5-8,5 e 3,5-4,3), respectivamente para leite de búfalas e vacas (ZICARELLI, 2004). Em leite bovino, a  $\alpha_{s1}$ -caseína tem um grupo fosfoseril na posição 115, carregado por aminoácidos hidrofóbicos. A interação desses grupos hidrofóbicos, provavelmente é responsável pelas características da fração  $\alpha_{s1}$ -caseína nas micelas. A ausência desse grupo na fração  $\alpha_{s1}$ -caseína no leite bubalino reforça o caráter não-polar da proteína (FERRANTI et al., 1998). Entretanto, a ausência de um grupo fosfato, o aumento na densidade e a sensibilidade das micelas de caseína pela quimosina no leite bubalino, pode explicar, em parte, a redução no tempo de

coagulação e o maior rendimento do queijo elaborado com leite búfala (ADDEO; MERCIER; RIBADEAU-DUMAS, 1980).

A  $\beta$ -caseína do leite bubalino apresenta duas variantes ( $\beta$ A e  $\beta$ B) (FERRANTI et al., 1998), que se assemelham a  $\beta_{A2}$ -caseína do leite bovino, diferindo por quatro e cinco aminoácidos, respectivamente. As frações  $\beta$  e  $\alpha_{s1}$  da caseína compõem 70% da rede micelar protéica. A hidrólise da  $\beta$ -caseína do leite bubalino pela plasmina, produz as frações  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$  (ZICARELLI, 2004), sendo que a fração  $\gamma_2$  atua como marcador, permitindo detectar a presença (<1%) de leite de vaca em queijo Mussarela de búfala.

### **3.1.1 - Queijo Mussarela de búfala e tecnologia de fabricação**

O queijo Mussarela tradicional é elaborado com leite de búfala, tem origem italiana e é habitualmente produzida na região de Campânia, no sul do país e recebeu certificação europeia designada PDO (*Product of Designated Origin*, regulamento nº 1107) em junho de 1996, a fim de proteger sua integridade (DE CANDIA et al., 2007). Este queijo caracteriza-se por uma massa filada com alto teor de gordura (> 44 %) e umidade variando entre 55 a 62 %. Apresenta corpo macio de coloração branca porcelanada, sabor levemente ácido, com formato e peso variados, devendo ser conservada sob refrigeração em temperaturas positivas de até 10°C. Apresenta-se de várias formas, como: barra, manta, palito, nozinho, trança e a tradicional bola, comumente comercializada imersa em soro, sendo própria para consumo em, no máximo, 30 dias após a fabricação (PARENTE; MOSCHETTI; COPPOLA, 1998; ERCOLINI et al. 2004; ABCB, 2009).

A seleção da matéria-prima tem como critérios sua composição protéica e teor lipídico, parâmetros que contribuem para a qualidade e rendimento do produto final

(WOLFSHOON-POMBO, 1978; FURTADO, 1992).

Por originar-se de matéria-prima rica, o rendimento da mussarela elaborada com leite de búfala torna-se superior a dos demais queijos do mesmo tipo, podendo superar em aproximadamente 40 %, se comparado ao leite bovino (BASTIANETTO; ESCRIVÃO; OLIVEIRA, 2005). O seu sabor levemente adocicado e acidificado, aliado ao seu valor nutritivo, faz deste um produto bem aceito pelo consumidor (MACEDO et al., 2001).

Este derivado lácteo não é maturado e pode ser elaborado usando leite pasteurizado com a adição de culturas *starters* de bactérias lácticas ou seguindo a produção tradicional italiana, adicionando coalho e soro fermento no leite *in-natura* aquecido, sob boas condições higiênico-sanitárias (COPPOLA et al., 2001).

O soro fermento é uma “cultura microbiana natural” resultante da dessora advinda da coagulação do leite, o qual é armazenado e utilizado como “cultura *starter*” em processos subsequentes (ERCOLINI et al., 2004). Em queijos elaborados com o uso de soro fermento, os micro-organismos presentes durante a coagulação são os considerados responsáveis pela fermentação e acidificação do leite, com a consequente liberação de compostos importantes que possam influenciar na textura e sabor do produto final (AYAD et al., 2000; MAURIELLO et al., 2001, MAURIELLO et al., 2003).

No Brasil, o processo comumente utilizado na elaboração do queijo Mussarela com leite de búfala é semelhante ao usado na fabricação com leite de vaca. Para obter a massa do queijo, procede-se a coagulação do leite, que pode ocorrer por meio da produção de ácido láctico pelas culturas lácticas presentes no leite *in-natura*, pela acidificação direta ou por coagulação enzimática empregando o coalho. Durante a coagulação ocorre a hidrólise da  $\kappa$ -caseína e liberação de aminoácidos, desmineralização da coalhada, redução do pH e consequente dessora. As bactérias ácido-lácticas são capazes de se desenvolverem em meio

ácido, permitindo uma fermentação bem sucedida entre 4 horas (culturas termófilas) a 24 horas (culturas mesófilas). A filagem da massa acontece após a coagulação, fermentação e dessora, em pH entre 4,9-5,2, com a fusão realizada em água a 80-85°C e esticamento, até a obtenção de uma massa macia e homogênea. A moldagem e salga (opcional) da massa pode ser feita em solução a 20% de NaCl (FURTADO, 1991; TEIXEIRA; BASTIANETTO; OLIVEIRA, 2005).

O uso de técnicas alternativas viáveis, por acidificação direta com ácido láctico, ácido cítrico e glucona- $\delta$ -lactona para a elaboração do queijo Mussarela de búfala, não dispensa o processo tradicional de fermentação por bactérias ácido-láticas (BAL), assim, a variedade destes micro-organismos depende da cultura utilizada e, portanto, pode tipificar o produto obtido (CHERIGUENE et al., 2007).

A fermentação deste queijo pode ser obtida por fermentação espontânea e incontrolada a partir do leite *in-natura*, como muitos processos de fermentação tradicional, onde vários micro-organismos de origem alimentar, destacando as BAL autóctones, estão presentes na área de produção, no ambiente e no próprio leite, portanto, a associação natural destas bactérias desenvolvendo-se em soro fermento ou leite, é usada para produção do tradicional e típico queijo mussarela italiano (COPPOLA et al., 2001).

Certos queijos elaborados a partir de leite *in-natura* apresentam aromas e propriedades sensoriais particulares em relação aos que são produzidos com leite pasteurizado (ALBENZIO et al., 2001; POZNANSKI et al., 2004; FRANCIOSI et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2010), o que está diretamente relacionado com as propriedades fisiológicas e bioquímicas das BAL presentes neste leite, sendo responsáveis pela qualidade do produto (FRANCIOSI et al., 2009).

As características sensoriais são manifestadas em decorrência da fermentação da

lactose, fermentação de citrato e hidrólises das proteínas. Segundo McSweeney e Sousa (2000) o sistema proteolítico é essencial para o desenvolvimento das BAL no leite, entretanto, pequenos peptídeos e aminoácidos livres, liberados pela hidrólise, são precursores do sabor e aroma.

A proteólise das proteínas do leite durante a produção do queijo Mussarela de búfala ocorre em uma série de eventos devida à ação combinada de proteases endógenas do leite, enzimas de coagulação e a atuação das culturas *starters* e da microbiota contaminante. Durante o processo de coagulação, a proliferação da população de BAL presente, resulta em uma rápida acidificação do soro e em uma proeminente proteólise secundária apresentada por endo e exo-peptidases celulares e proteinases (DE SIMONE et al., 2009).

Durante a fermentação do leite, a produção de ácidos pelas BAL reduz o pH do meio, o que facilita a separação do soro pela ação do coalho, reduzindo assim a umidade. Portanto, baixo pH e baixa umidade impede o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes. Assim como durante a fermentação, mudanças no pH da Mussarela de búfala persistem no período de estocagem sob refrigeração. Estas alterações acontecem devido à proteólise promovidas pelas BAL que prossegue durante esse período (CORTEZ et al., 2008).

A vida de prateleira do queijo Mussarela de búfala imersa em soro está estritamente ligada à qualidade do leite usado (leite *in-natura*), com o processo tecnológico e com as condições de estocagem (LAURIENZO et al., 2008). No entanto, novos sistemas de embalagens, a base de géis naturais e o uso de componentes químicos, como lisozima e ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) (SINIGAGLIA et al., 2008), tem apresentado efeitos promissores, como a manutenção das propriedades sensoriais durante a estocagem desse queijo, sem a necessidade de tratamento químico ou térmico do leite e sem interferir na qualidade do produto (LAURIENZO et al., 2006).

Para a produção do queijo Mussarela, a atuação principal das bactérias no leite deve ocorrer precocemente, diferente dos queijos maturados, que exalam aromas mais acentuados devido à atuação das BAL durante os meses de maturação (IMHOF; BOSSET, 1994). Dentre os compostos produzidos pelas BALs, o diacetil é um composto industrialmente importante, derivado do metabolismo do citrato (BROADBENT; STEELE, 2005), o qual confere sabor e aroma em vários derivados lácteos, principalmente em queijos (COGAN, 2007).

Estudos recentes têm mostrado que os queijos artesanais apresentam uma microbiota particular para diferentes tecnologias de produção e área geográfica de origem. Nestes queijos, a microbiota é bastante heterogênea e modifica-se durante o período de estocagem ou maturação do queijo, sendo que as cepas dominantes no primeiro estágio não necessariamente predominam ao longo do tempo (MANNU; PABA, 2002).

Processos industriais em larga escala utilizam culturas iniciadoras (*starters*), as quais aceleram e padronizam o processo de produção, não necessitando de uma variabilidade de micro-organismos para a fermentação durante o processo de fabricação do queijo Mussarela de búfala. Geralmente são selecionadas culturas lácticas termófilas como *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para a elaboração da Mussarela, as quais apresentam particularidades importantes para este queijo (MOREA et al., 1998). No entanto, muitos produtos derivados de leite ainda são elaborados a partir de fermentação espontânea, não selecionando BAL iniciadoras, obtendo uma gama de produtos com diferentes aromas, consistência e qualidade microbiológica (STILES; HOLZAPFEL, 1997; COGAN et al., 1997; MOREA; BARUZZI; COCCONCELLI, 1999; GERNIGON; SCHUCK; JEANTE, 2009).

### 3.2 - Bactérias ácido-láticas (BAL)

Como um dos vários produtos elaborados a partir de fermentação por micro-organismos, o queijo está a mais de oito mil anos fazendo parte da dieta humana. No entanto, até o século 20, a fermentação do leite para esse fim manteve-se em processo não regulamentado. A partir de então, a caracterização das bactérias ácido-láticas (BAL) têm mudado o ponto de vista sobre a fermentação (BOTINA; TSYGANKOY; SUKHODOLETS, 2006).

As BAL foram isoladas primeiramente de leite *in-natura* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; CHERIGUENE et al. 2007) e têm sido encontradas em fontes alimentares e produtos fermentados como carne, produtos lácteos, vegetais, bebidas, entre outros (GOBBETTI; CORSETTI, 1997; LIU, 2003; O'SULLIVAN; ROSS; PHILL, 2002; CHERIGUENE et al., 2007). Esses micro-organismos estão naturalmente distribuídos pela natureza e podem ser isolados de solos, água, plantas, silagens e também do trato intestinal de animais e humanos (BRUNO E CARVALHO, 2009)

O termo BAL refere-se, principalmente, ao metabolismo basal dessas bactérias, como a fermentação de hexoses, produzindo, sobretudo, o ácido lático (DE DEA LINDNER, 2008). As BAL são os micro-organismos mais comuns presentes em leites usados na elaboração de diversas variedades de queijos (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995; STILES; HOLZAPFEL, 1997). O metabolismo e a interação entre as diferentes linhagens são responsáveis pela produção de ácidos e a coagulação do leite, assim como, para o desenvolvimento de outros componentes, que em conjunto, fornecem específicas propriedades sensoriais aos produtos lácteos. O estudo da bioquímica, fisiologia e genética desses micro-organismos permitiram melhor selecionar as culturas para o uso comercial e produção de

derivados lácteos com qualidade, uma vez que, a qualidade desses produtos está intimamente relacionada a uma microbiota láctica rica que desempenhe o papel na fermentação (BROADBENT; ESTEEL, 2005).

Desde os primeiros estudos sobre a atuação das BAL, cresce sustentavelmente a produção de lácteos fermentados, em especial o queijo. Com relação à fisiologia, as BAL são responsáveis pela fermentação e produção de ácidos, tornando sua aplicação cada vez mais importante em produtos lácteos (BROADBENT; STEELE, 2005; CHERIGUENE et al., 2007; DE DEA LINDNER, 2008). Além disso, a biodiversidade das bactérias envolvidas na produção de queijos e outros derivados lácteos pode ser considerada um fator fundamental para a manutenção das características típicas de sabor e aroma do produto (DEMARIGNY et al., 1997; ERCOLINI et al., 2001b; MARINO, MAIFRENI; RONDININI, 2003). Assim, a produção de queijos de alta qualidade requer uma estreita atenção para a caracterização, diferenciação e manutenção das cepas de BAL envolvidas no processo (GIRAFÀ et al., 2003).

Existem várias substâncias produzidas por BAL, podendo ser ácidos orgânicos (como ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999). Esses micro-organismos também produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as quais transformam os nutrientes fundamentais do leite e dos seus derivados em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (VILJOEN, 2001). A degradação da caseína, por exemplo, por proteinases e peptidases contribui para a formação da textura e características sensoriais dos queijos, redução do pH e retenção de umidade na massa pelos aminoácidos e peptídeos livres. Os aminoácidos formados podem



ainda ser degradados em aminas, ésteres, ácidos e tióis, os quais contribuem para a produção de aromas (PRIETO et al., 2002; BENFELDT; SORENSEN, 2001).

Estudos filogenéticos com base em comparações da seqüência do DNA ribossomal e proteínas conservadas sugerem uma posição ancestral na evolução de bactérias Gram-positivas com menos de 50% de guanina (G) e citosina (C) no genoma para o grupo pertencente à BAL. Entretanto, *Bifidobacterium* spp. apresentam mais de 50% de G + C e pertencem ao filo actinomicetos (FRANCIOSE et al., 2010).

BAL são organismos Gram-positivos, não esporulantes, catalase e oxidase negativo (DE DEA LINDNER, 2008; BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006). Formam um grupo bastante heterogêneo quando se refere à capacidade de assimilar oxigênio podendo ser anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias e microaerófilas. Apresentam morfotipos bacilares ou em cocos, e caracterizam-se por apresentar tolerância ao ácido. São estritamente fermentadores, produzindo ácido láctico como principal metabólito (BROADBENT; STEELE, 2005). Esses micro-organismos requerem uma elevada exigência nutricional, composta essencialmente por aminoácidos e vitaminas (FRANCIOSE et al., 2010).

Este grupo consiste em um número de gêneros diversos e podem ser homofermentativos ou heterofermentativos. Os homofermentativos produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose e os heterofermentativos, além do ácido láctico, são capazes de produzir diversos produtos, incluindo dióxido de carbono, ácido acético e etanol a partir da fermentação da glicose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

São considerados do grupo das BAL os micro-organismos dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacilus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (CHERIGUENE et al., 2007).

A associação natural de BAL no queijo Mussarela de búfala imerso ao soro foi investigada por Coppola e colaboradores (1988, 1990), porém com poucas informações sobre a microbiota lática envolvida. Sobretudo, cepas de *Lactobacillus* ssp. pertencentes a espécies *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* e cocos como *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus* ssp., *Leuconostoc mesenteroides*, assim como *Enterococcus faecalis* têm sido encontrados nesse queijo (ERCOLINI et al., 2001b; ERCOLINI, 2004).

As culturas láticas, comuns em queijo Mussarela de búfala, podem ser classificadas em bactérias ácido-láticas *starter* (*Starter Lactic Acid Bacteria* - SLAB) ou iniciadoras, quando são capazes de metabolizar a lactose e, em não *starter* (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB), se apresentando durante o processo de fabricação e período de estocagem. Segundo De Dea Lindner (2008), SLAB mesófilas como *L. lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* e termófilas como *S. thermophilus*, *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são dominantes em culturas usadas na elaboração de queijo Mussarela. Parente, Moschetti e Coppola (1998) detectaram essas espécies no soro fermento (NWC - *natural whey culture*) empregado na elaboração de Mussarela de búfala.

Culturas *starters* são compostas por dois tipos de bactérias: as produtoras de ácidos e as produtoras de aromas. Os ácidos podem ser produzidos por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e *Lc. lactis* subsp. *lactis*, enquanto o aroma é produzido por *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Portanto, diretamente ou não, os metabólitos produzidos por esses microorganismos influenciam na obtenção de uma variedade de texturas, sabores e aromas do produto (SAMARZIJA et al., 2001).

As culturas não *starter* (*Non Starter Lactic Acid Bacteria* - NSLAB) geralmente são originárias do leite *in-natura*, do ambiente de produção e, em quantidade minoritária, do soro

fermento natural, como espécies do gênero *Propionibacterium*, que assimilam outros substratos, como o citrato (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006), ou mesmo, quando requerem fonte exógena de peptídeos ou aminoácidos, liberados pela proteólise da caseína por SLAB, podendo assim modificar o sabor e o aroma original do produto final. As NSLAB têm como fonte energética alternativa os aminoácidos liberados da autólise das SLAB, assim como, os resíduos de carboidratos liberados de glicoproteínas e glicolipídeos presentes no leite (WILLIAMS; WITHERS; BANKS, 2000). Dessa forma, a associação das bactérias NSLAB com as SLAB pode, em sinergia, contribuir positivamente para a qualidade do produto final.

Em diferentes variedades de queijos, elaborados com leite *in-natura* ou pasteurizado, a classe dominante de NSLB são lactobacilos facultativos homofermentativos, especialmente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus*, e estrictos heterofermentativos, particularmente *Lactobacillus brevis*, sendo encontrado em menor quantidade (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). Entretanto, cepas de *Enterococcus faecalis* são isoladas apresentando-se como cultura *starter* na elaboração de queijo Cheddar e Mussarela, sendo responsáveis por aromas característicos (DEVRIESE et al., 1995), assim como cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, freqüentemente são isolados de leite *in-natura* e queijos, sendo comumente usados como culturas *starters* nas indústrias alimentícias (CROW, 1993; CENTENO; CEPADA; RODRIGUEZ-OTERO, 1996).

BAL do gênero *Leuconostoc* são usualmente encontradas em vinhos e líquidos contendo açúcar e em cavidade oral e trato intestinal de homens e animais (CAI et al., 1998). *Leuconostoc* são também amplamente encontradas em derivados lácteos como os queijos, e são capazes de utilizar o citrato presente (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006). O gênero *Pediococcus* também pode estar presente em leite e seus derivados, porem são

encontrados com mais frequência em bebidas fermentadas, como os vinhos. *Streptococcus thermophilus* geralmente estão presentes em diversos produtos lácteos (COPPOLA et al., 2001; CHERIGUENE et al., 2007), incluindo queijo Mussarela de búfala.

Espécies do gênero *Streptococcus*, apesar de estarem presentes na maioria dos produtos lácteos, não estão entre as mais importantes do ponto de vista da sua aplicação prática na indústria leiteira, uma vez que, a maior parte das bactérias desse gênero é considerada patogênica, sendo agentes causadores de doenças infecciosas em animais e humanos (BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006). Porém, a espécie *Streptococcus thermophilus* é amplamente usada na elaboração de vários tipos de queijos. Esta bactéria é capaz de metabolizar a lactose, contribuindo para a acidificação e propriedades sensoriais do produto (DELORME, 2008; GALIA et al., 2009). Assim como os *Streptococcus*, o gênero *Enterococcus* também pode ser considerado patogênico (encontrado em isolados clínicos), ao mesmo tempo em que é usado como cultura *starter* na elaboração de derivados lácteos (EATON; GASSON, 2001, MORENO et al., 2006).

Em muitos casos, BAL presentes no leite utilizado na elaboração do queijo Mussarela têm sido comercializadas como culturas *starters* para esse processo. Estas culturas são compostas apenas de *Streptococcus thermophilus* ou de uma cultura mista de *S. thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, capazes de metabolizar a lactose (COPPOLA et al., 2001; COPPOLA et al., 2006; DE CANDIA et al., 2007).

Lactobacilos é um grupo de BAL bem representativo sobre os outros presentes em leite e seus derivados. Podem ser representados por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* (CHERIGUENE et al., 2007). Medina e colaboradores (2001) relataram que 8% dos *Lactobacillus* isolados de leite e queijo de ovelha no Norte da

Argentina eram *Lb. acidophilus*. *Lactobacillus* ssp. e espécies de *Lactococcus lactis* são encontrados principalmente em queijos de massa filada elaborados com leite *in-natura* (PARENTE et al., 1997). Segundo Morea e colaboradores (1998), cepas de *Lactobacillus plantarum* 2S30 são as mais prevalentes em Mussarela, originárias do leite e soro fermento.

A biodiversidade dos micro-organismos envolvidos na produção do queijo Mussarela é um fator importante para a qualidade do produto, o que leva a investigação da associação microbiana natural, responsáveis pelo processo fermentativo e qualidade desse típico produto italiano (MOREA; BARUZZI; COCCONCELLI, 1999).

O uso de cepas selvagens (autóctones), denominadas *starter* ou iniciadoras do processo de fermentação, parece promissor para o desenvolvimento de novos aromas (*flavours*) já que essas provavelmente produzem mais enzimas conversoras de aminoácidos que as *starters* comerciais (CENTENO; CEPADA; RODRIGUEZ-OTERO, 2002).

Estudos demonstram a habilidade das cepas autóctones de BAL em produzir aromas distintos comparados com aqueles produzidos por culturas *starters* comerciais. Porém, essas cepas podem apresentar baixa atividade acidificante, e assim, devem ser combinadas com cepas industriais para preparar culturas *starters* com cepas definidas (*defined-strain starter cultures*) (AYAD et al., 2000).

A percepção sensorial dos produtos lácteos é um processo complexo, influenciado por muitos fatores, tais como a composição de componentes flavorizantes, a textura e a aparência do produto (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005), que podem ser originados de ações microbianas, enzimáticas e químicas. A proteólise, que ocorre por ação de enzimas do leite, coalho e micro-organismos, é o principal evento bioquímico.

Segundo Morea e colaboradores (1998), cepas de *L. casei* subsp. *casei* e cepas de *W. hellenica* apresentam propriedades proteolíticas bastante acentuadas em leite. Segundo

Savijoki e colaboradores, (2006), o sistema proteolítico das BAL permite o seu desenvolvimento no leite durante o processo de fermentação, auxiliando dessa forma, o desenvolvimento e viabilidade de BAL fastidiosas, que requerem uma fonte exógena de peptídeos ou aminoácidos provenientes da proteólise da caseína pelas SLAB.

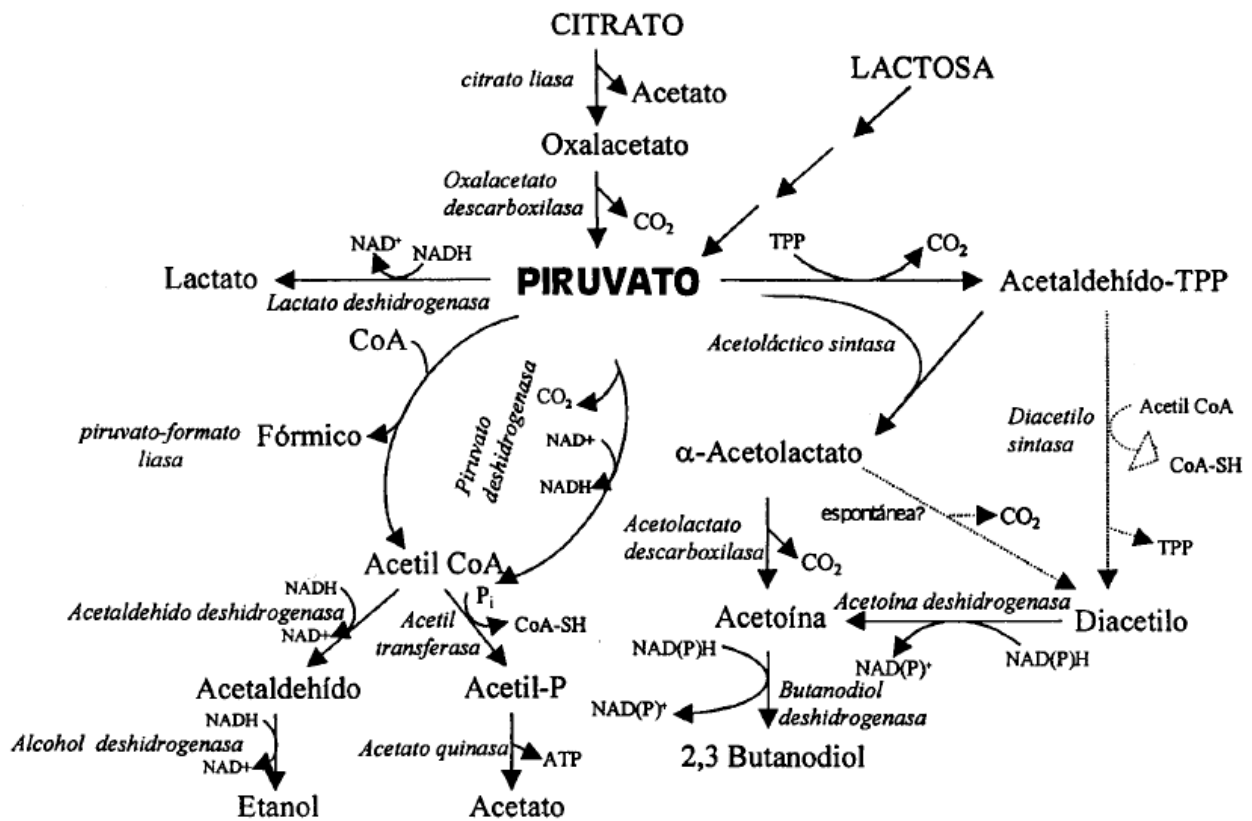
Os *Lactobacillus* apresentam propriedades fisiológicas capazes de produzir ácido com intensidade durante a fermentação, sendo responsável pela redução do pH e, conseqüentemente, a coagulação do leite.

Micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são encontrados em queijos Cheddar e em queijos tradicionais italianos, como a mussarela (MOREA et al., 1998; GIRAFFA et al., 1998; DE CANDIA et al., 2007). *Lactobacillus helveticus* estão amplamente presentes como culturas naturais *starters* utilizadas na produção de queijos italianos, tais como Grana Padano, Parmegiano-reggiano e Provolone (GATTI et al., 2004). Cepas de lactobacilos, como *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são usadas como culturas *starters* e não *starters*. Populações de NSLAB são quase sempre dominadas por *Lactobacillus* facultativos heterofermentativos, como *Lactobacillus casei* (BROADBENT; STEELE, 2005). Assim como o seu uso generalizado em queijos, as espécies do gênero *Lactobacillus* possuem atributos importantes quando estão associadas às propriedades terapêuticas. No caso de sua ação probiótica, há a sua inclusão em numerosos produtos alimentares (SAXELIN et al., 2005; SINGH et al., 2008).

Dentre as BAL, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* apresentam uma outra atividade importante para o seu uso na indústria alimentícia, sendo capazes de produzir as bacteriocinas (peptídeos ou proteínas), as quais possuem ação bactericida ou bacteriostática capazes de inibir ou reduzir a contaminação por micro-organismos deteriorantes, como fungos e leveduras e/ou patogênicos (DE DEA LINDNER, 2008)

Culturas mesófilas, como *Lactococcus*, também são usadas na elaboração de produtos lácteos em uma variedade de queijos maturados e não-maturados (SAMARZIJA et al., 2001). A qualidade de alguns produtos fermentados, como o queijo Mussarela, é característica da atuação das cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetyllactis*, entre outras BAL, capazes de produzir compostos aromatizantes e CO<sub>2</sub> pela utilização de citrato (Figura 1). Estes compostos produzidos são acetato e compostos de quatro carbonos, como acetoina e diacetil (CACHON; DIVIES, 1993; COGAN, 1995).

A habilidade de metabolizar o citrato é dependente da presença da enzima citrato permease (CitP), assim, além dos *Lactococcus*, cepas pertencentes aos gêneros *Leuconostoc* e *Oenococcus* são capazes de utilizá-lo para a produção de compostos aromáticos (RAMOS et al., 1994; BANDELL et al., 1998). O citrato pode ser utilizado como única fonte de energia ou ser co-metabolizado. Para BAL heterofermentativas, o citrato é convertido em piruvato, que é então reduzido a lactato, e para as bactérias ácido-láticas homofermentativas, o piruvato é o intermediário comum formado durante o metabolismo do açúcar e do citrato (VANINGELGEM et al., 2006).



**Figura 1** - Rotas bioquímicas de utilização do citrato pelas bactérias ácido-láticas.

### 3.2.1 - Isolamento e identificação

Um dos principais interesses dos microbiologistas é estudar a diversidade e a dinâmica dos micro-organismos durante a fabricação do queijo e seu período de estocagem, bem como correlacionar a ocorrência de determinadas espécies de bactérias ou linhagens que apresente características sensoriais específicas do produto final. Tradicionalmente, o conhecimento da diversidade bacteriana em queijos é resultado de estudos das culturas com base no crescimento de micro-organismos em meios seletivos e sua posterior identificação do gênero e espécies usando caracterização fenotípica (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009).



As investigações de populações microbianas, após o crescimento em meios e ambientes adequados, tipicamente revelam o desenvolvimento prevalente dos micro-organismos detectáveis pela formação de colônias visualmente ou espectrofotometricamente (STEELE et al., 2006), porém, Cogan e colaboradores (2007), ressaltam a dificuldade na contagem de micro-colônias e a incapacidade de identificação de linhagens selvagens e NSLAB pelos métodos fenotípicos. Os meios de cultura tradicionais empregados em análise de alimentos, que prezam a recuperação dos micro-organismos prevalentes na matriz alimentar podem ser muito genéricos e não-seletivos o suficiente para discriminar as espécies presentes em minoria (DENIS et al., 2001). Muitas BAL, entre elas NSLAB, podem estar presentes no alimento em condições vitais, porém não cultiváveis (GATTI et al., 2008). Por esta razão, em alguns casos, onde a identificação da microbiota é necessária para melhor compreender certas situações tecnológicas, um meio de cultivo nutricionalmente adequado e, se possível, de composição análoga à matriz de isolamento, seria ideal para recuperar esta microbiota de fundamental importância (NEVIANI et al., 2009).

O estudo morfológico de BAL inclui tanto características da colônia (cor, tamanho, forma, textura) quanto celular (forma da célula, ausência de endósporos) (DE DEA LINDNER, 2008). A descrição dos caracteres fisiológicos e bioquímicos implica em informações sobre suas propriedades, tais como: desenvolvimento em diferentes temperaturas, pH, concentrações de sal e capacidade de assimilar O<sub>2</sub>, desenvolvimento na presença de diversas substâncias, incluindo anti-microbianos, viabilidade na presença de diversas enzimas, utilização de compostos orgânicos e principalmente capacidade fermentativa (KRIEG; HOLT, 1984). Porém, assim como as dificuldades na caracterização das colônias, o estudo morfológico e a descrição dos caracteres fisiológicos e bioquímicos também apresentam dificuldades quando na utilização de técnicas microbiológicas tradicionais (WALTERS,

2000). A identificação de bactérias lácticas baseada em testes bioquímicos, ou o uso de kits rápidos, pode apresentar falsos resultados, ou mesmo não conseguir identificar a espécie (CHERIGUENE et al., 2007).

Bactérias lácticas, isoladas de diferentes fontes, geralmente pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (DE DEA LINDNER, 2008). Muitos autores têm observado que a identificação de diferentes gêneros de bactérias catalase-negativa e anaeróbias facultativas é problemático, sendo muito difícil a identificação das espécies pertencentes a estes gêneros por métodos tradicionais (BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006). Segundo Dikes e Von Holy (1994), o mix de culturas lácticas presentes em um sistema é complexo e, usualmente, consiste em uma associação de lactobacilos, os quais apresentam dificuldades de identificação.

Bactérias da espécie *S. thermophilus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são difíceis de distinguir utilizando métodos fenotípicos, devido aos seus fenótipos semelhantes, tornando sua identificação problemática. Porém, cocos termófilos isolados de diferentes fontes naturais de leite fermentado são constantemente atribuídos ao gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* (GALIA et al., 2009).

Bactérias ácido-lácticas, cocos termófilos, são geralmente esféricos ou ovais, podendo apresentar-se de forma levemente alongada. São encontradas aos pares e em cadeias curtas ou longas, dependendo das condições de desenvolvimento e da espécie. Essas bactérias se diferem das demais BAL pela capacidade de crescer em altas temperaturas na faixa de 45-50 °C (BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006).

A distinção entre os gêneros estreitamente relacionados como *Streptococcus* e *Enterococcus* requer uma estimativa de temperaturas mínima e máxima de crescimento, bem como a capacidade de desenvolver em meios com concentrações diferentes de NaCl e a

habilidade de fermentar açúcares presentes no leite. Segundo Botina, Tsygankov e Sukhodolets (2006), bactérias do gênero *Enterococcus* são mais resistentes aos fatores externos, podendo desenvolver em temperaturas mais elevadas, sendo capazes de fermentar mais açúcares em relação às bactérias do gênero *Streptococcus*, e são mais resistentes aos antibióticos e às concentrações elevadas de NaCl.

A identificação de lactobacilos também pode envolver dificuldades. Por exemplo, bactérias intimamente relacionadas como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. paracasei* partilham de muitas propriedades bioquímicas e fisiológicas (DELLAGLIO; FELIS; CASTIONI, 2005).

Lactobacilos são encontrados geralmente em forma de bastonetes finos, podendo apresentar-se em espirais e bacilos-cocóides sob certas condições ambientais. Assim como sua forma, esse gênero apresenta estruturas particulares entre espécies, sendo geneticamente diferentes, caracterizando-o como um gênero não muito bem definido (VANDAMME et al., 1996).

Ao contrário dos métodos fenotípicos e fisiológicos, a identificação por técnicas moleculares são muito mais consistentes, rápidas, confiáveis e reprodutíveis, podendo discriminar espécies que estão em grupos estreitamente indistinguíveis quando identificados por testes tradicionais. Deste modo, muitas espécies de *Lactobacillus*, entre outros, foram reclassificadas usando avançadas técnicas moleculares baseadas na técnica reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) (DELLAGLIO; TORRIANI; FELIS, 2004).

Técnicas de tipagem molecular, aliadas às ferramentas sensíveis para identificação de espécies, são viáveis para a verdadeira identificação desses micro-organismos. Entretanto, o

uso de técnicas de biologia molecular, como técnicas independentes de cultivo, tem facilitado o acesso às informações sobre o conhecimento da taxonomia e ecologia de bactérias ácido-láticas (GIRAFFA; ROSSETTI; NEVIANI, 2000; ERCOLINI et al., 2001a; ERCOLINI et al., 2004, JUSTÉ; THOMMA; LIEVENS, 2008).

### **3.2.1.1 - Técnicas moleculares utilizadas para identificação de BAL**

Utilizando métodos da biologia molecular, com base no genoma procariótico, a identificação de micro-organismos, incluindo BAL, tem sido simplificada (BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006; BEN AMOR; VAUGHAN; DE VOS, 2007). As modernas ferramentas desenvolvidas para a identificação de BAL quantificam ácidos nucléicos, usando a técnica de PCR *ex situ* ou a hibridização *in situ* com o DNA, RNA, sondas peptídicas de ácidos nucléicos, ou mesmo sequenciamento de genes ou de regiões ribossomais. No entanto, protocolos de tipagem baseados na PCR (Quadro 2) têm sido aplicados para obter identificação de biotipos de BAL envolvidos na fermentação de queijos (GIRAFFA; ANDRIGHETTO; ANTONELLO, 2004).

**Quadro 2 - Identificação de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos artesanais usando técnicas dependente e independente de cultivo.**

Queijo	Métodos dependentes e independentes de cultivo	Espécies de BAL	Tipo de starter	Referências
Batzos	RAPD PFGE	<i>L. lactis</i>	No starter	Psoni et al. (2007)
Blue-veined Cabrales	PCR-DGGE	<i>Lactococcus</i> spp., <i>L. plantarum</i> <i>L. brevis</i>	No starter	Flórez and Mayo (2006) Flórez et al. (2006)
iocavallo Pugliese	Rep-PCR	<i>L. paracasei</i>	Natural Whey	Morea et al. (2007)
Camembert	RAPD	<i>L. lactis</i>	Raw Milk	Corroler et al. (1998)
Canestrato Pugliese	RAPD RFLP, 16S rRNA gene sequencing and multiplex PCR	<i>L. plantarum</i>	No starter	Albenzio et al. (2001) Aquilanti et al. (2007a)
Caprino	RAPD	<i>Enterococcus</i> spp.	Un-defined mesophilic whey	Suzzi et al. (2000)
Castelmagno	PCR-DGGE, 16S rRNA gene sequencing	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. coryniformis</i>	No starter	Dolci et al. (2008b)
Comte	RAPD, REP-PCR PFGE	<i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i>	Natural whey	Bouton et al. (2002)
Grana, Provolone and Parmigiano Reggiano	Ribotyping RAPD and sequencing RAPD and TGGE	<i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	Natural thermophilic whey	Giraffa and Neviani, (2000); Cocconcelli et al., (1997); Andrighetto et al., (2004)
Manchego	RAPD	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	No starters	Sanchez et al. (2006)
Monte Veronese, Montasio and Asiago	RAPD	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. macedonicus</i> <i>L. helveticus</i>	Undefined or defined thermophilic Milk	Andrighetto et al., (2002)
Mozzarella (buffaloes' milk)	RAPD PCR-DGGE	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i>	Natural mesophilic whey	Moschetti et al. (1998) Coppola et al. (2001)
Mozzarella (cow's milk)	RAPD and 16S rRNA gene sequencing	<i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i>	Natural mesophilic whey	Morea et al. (1998) De Candia et al. (2007)
Pecorino	RAPD	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	No starter	Aquilanti et al. (2007b) De Angelis et al. (2001)
Pecorino Sardo	RAPD, PFGE PCR	<i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.	No starter or natural Milk	Mannu et al. (2002)
Pecorino Siciliano	RFLP, PCR-DGGE	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>E. durans</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	No starter	Randazzo et al., (2006); Randazzo et al., (2008)
Pecorino Toscano	RAPD	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. curvatus</i>	Natural mesophilic or/and thermophilic Milk	Bizzarro et al. (2000)
Provola dei Nebrodi	RAPD, PFGE 16S rRNA gene sequencing	<i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>P. pentosaceus</i>	No starter	Cronin et al. (2007)
Ragusano cheese	PCR-DGGE	<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>S. thermophilus</i>	No starter	Randazzo et al. (2002)
Raschera	RAPD, 16S rRNA gene sequencing	<i>L. lactis</i> , <i>L. paracasei</i>	Natural Milk	Dolci et al. (2008a)
Ricotta forte	RAPD	<i>L. kefir</i> , <i>L. plantarum</i>	Natural whey	Baruzzi et al., (2000)
Roncal, Los Ibores	RAPD	<i>L. plantarum</i>	No starter	Oneca et al., (2003)
Salers	Rep-PCR, DNA-RNA SSCP, 16S rRNA gene sequencing	<i>L. lactis</i> , <i>L. garvie</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. millieri</i> , <i>S. macedonius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>	Stored raw milk	Callon et al., (2004); Duthoit et al., (2003); Duthoit et al., (2005a)
Sao Jorge	Ribotyping	<i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	Natural whey	Kongo et al. (2007)
Scamorza Altamura	RAPD 16S/23S rRNA gene sequencing	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i>	Natural mesophilic whey	Baruzzi et al. (2002)
Toma Piemontese	PCR 16S-23S rRNA gene and sequencing	<i>L. lactis</i> , <i>L. garvie</i>	No starter	Fortina et al. (2003)
Zlatar	Rep-PCR	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	No starter	Terzic-Vidojevic et al. (2007)

Adaptado de Randazzo; Caggia; Neviani (2009).

Recentemente, técnicas com base no DNA, como PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando enzimas de restrição específicas, que resulta em fragmentos genômicos maiores (BLAIOTTA et al., 2001) e a técnica de Ribotipagem (uma variação da análise convencional RFLP), onde os fragmentos resultantes são transferidos para uma membrana e hibridizados com uma sonda de rDNA (DE DEA LINDNER, 2008; RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009) têm sido usadas para identificação de bactérias lácticas. Da mesma forma, o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) também são técnicas moleculares aplicadas extensivamente para a identificação intraespecífica de BAL isoladas de alimentos fermentados e do trato gastrintestinal (MC CARTNEY, 2002).

Protocolos de RAPD-PCR *fingerprints* têm sido desenvolvidos para a identificação de BAL e *Enterococcus* advindos de produtos lácteos, picles e microbiota gastrintestinal (COCCONCELLI et al., 1995; DOLCI et al., 2008; PLATERO et al., 2009) e para *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* ssp. isolados de amostras de queijo Mussarela (CANCILLA et al., 1992; LANGA; FERNANDEZ; MARTIN, 2003; DE CANDIA et al., 2007).

A técnica de RAPD-PCR está entre as mais utilizadas para a identificação de BAL em que não se requer o conhecimento prévio do DNA a ser analisado. Nesta técnica, utiliza-se *primers* inespecíficos de até 10 pares de base com sequência arbitrária na PCR (TAYLOR et al., 1999; DE CANDIA et al., 2007; GATTI et al., 2008), gerando uma matriz de *amplicons* de DNA anônimo (BEN AMOR; VAUGHAN; DE VOS, 2007). Os produtos de PCR são submetidos a uma separação por eletroforese, onde se obtêm padrões de DNAs. As características visuais das bandas resultantes dos fragmentos permitem presumir o grau de parentesco entre os DNAs analisados (VALÉRIO; WEIKERT-OLIVEIRA; RESENDE,

2006).

Apesar da RAPD ser uma técnica simples e rápida, a sua reprodutibilidade, otimização e padronização são necessárias. Diferenças entre termocicladores, reagentes, *Taq* polimerase e qualidade do DNA podem causar variações nos padrões de RAPD, e conseqüentemente, os padrões obtidos em diferentes laboratórios nem sempre são comparáveis (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009).

A técnica de RAPD é amplamente utilizada para a caracterização dos micro-organismos presentes na matriz dos queijos, permitindo a diferenciação entre as espécies e, em alguns casos, entre as linhagens da mesma espécie. A análise de RAPD é considerada um método confiável para discernir entre as espécies *starter* e não *starter* presentes no queijo, ou mesmo, monitorar mudanças na comunidade de BAL durante o processo de fermentação (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009). Entretanto, os métodos de detecção do perfil de fermentação baseados em sequenciamento genético permitem a diferenciação da espécie (ANDRIGHETTO; DE DEA; LOMBARDI, 1998; GIRAFFA et al., 2004; DELLAGLIO; FELIS; CASTIONI, 2005).

As metodologias baseadas em genes ribossomais também vêm ganhando espaço na identificação de BAL (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009). Genes ribossomais são mais conservados que a maioria dos genes do genoma, e dificilmente são afetados pela pressão ambiental, sendo bem conservados e comuns a várias espécies (MOHANIA et al., 2008). Assim, o sequenciamento da região 16S rRNA contém informações taxonômicas superiores quando comparadas aos dados produzidos por híbridos de DNA-DNA (BOTINA; TSYGANKOV; SUKHODOLETS, 2006). A técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA, juntamente com a tipagem do DNA usando a técnica de PCR, são utilizados para a identificação de espécies da microbiota presente em derivados lácteos. Assim, micro-

organismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* foram identificados nestes produtos (OGIER et al., 2002). Com base no sequenciamento do gene 16S rRNA foi possível diferenciar a cepa de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* que, constantemente, é confundida com o perfil fermentativo de *L. helveticus*, quando se utiliza metodologias tradicionais (HEBERT et al., 2000).

Atualmente, técnicas independentes de cultivo são amplamente usadas para a identificação de BAL, onde o DNA genômico bacteriano e/ou RNA deve ser extraído diretamente da amostra, seguido pela amplificação das regiões variáveis do gene 16S. Se o DNA total da microbiota é usado na PCR, a técnica pode fornecer um perfil da diversidade genética, enquanto que, se o RNA total é usado, o perfil indica a microbiota metabolicamente ativa (FLÓREZ; MAYO, 2006; RANTSIOU et al., 2008). Este método é amplamente utilizado para caracterizar microbiologicamente alimentos fermentados, incluindo derivados lácteos, uma vez que uma população minoritária de bactérias lácticas presentes na matriz pode não ser visualizada, ou mesmo não ser cultivável por métodos tradicionais de cultivo (ERCOLINI et al., 2001b; GATTI et al., 2008). Assim, métodos independentes de cultivo tornam-se viáveis para compreender melhor a ecologia destes micro-organismos. As técnicas independentes de cultivo mais utilizadas para a caracterização da comunidade de BAL são as: DGGE (*PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e TTGE (*PCR-Temporal Temperature Gradient Electrophoresis*) (POGACICI et al., 2010).

A população microbiana em gel de DGGE ou TTGE pode ser identificada por comparação da posição da banda da cepa de interesse com a da cepa de referência ou por sequenciamento. Para a PCR-DGGE, a desnaturação é feita com desnaturantes químicos (formamida e uréia), incorporadas em gel de acrilamida como um gradiente de desnaturação linear a uma temperatura constante, entre 55 e 65°C e, para PCR-TTGE, o gradiente de



desnaturação é obtido pela variação da temperatura ao longo do tempo sem o uso de produtos químicos (JANY; BARBIER, 2008).

As principais vantagens da DGGE e TTGE são que estas técnicas permitem o monitoramento das mudanças da comunidade microbiana e oferecem uma visão simples das espécies de BAL presentes em uma amostra (POGACIC et al., 2010).

Apesar de serem consideradas excelentes técnicas para a caracterização da população de BAL presentes na matriz de queijos, a amplificação da região variável do gene 16S rRNA e/ou ampliação da mesma região com diferentes *primers* universais usados nesta técnica, pode produzir resultados diferentes. Além disso, as diferentes condições de DGGE podem resultar em diferenças na separação dos *amplicons* na PCR (RANTSIOU; CONCOLIN, 2006).

Na técnica de identificação independente de cultivo, uma alternativa para revelar e diferenciar a microbiota metabolicamente ativa presente nos queijos é a transcrição reversa do RNA (RT- *reverse-transcribed*), usando a combinação do RT-PCR-DGGE (baseado no RNA) e PCR-DGGE (baseada no DNA) (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009; JANY; BARBIER, 2008; RANTSIOU et al., 2008). Esse método é considerado útil para estudos da dinâmica populacional durante as etapas de processamento e maturação de queijos, possibilitando saber os grupos microbianos ativos presentes nas diferentes etapas e períodos de maturação (POGACIC et al., 2010).

Outra técnica independente de cultivo utilizada para a identificação de BAL é a SSCP-PCR (*Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR*). Trata-se de uma técnica molecular a partir de PCR, usando gel de acrilamida ou um sequenciador automatizado com separação do gradiente por capilaridade. Utiliza-se *primers* universais ou mesmo *primers* para diferentes regiões do gene 16S rRNA (FEURER et al., 2004). É a segunda mais utilizada depois de TTGE e DGGE para a caracterização de BAL em queijos artesanais.

A técnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) também tem sido utilizada para a identificação de BAL. Nesta técnica utilizam-se sondas fluorescentes marcadas que se hibridizam às partes do cromossomo em que a seqüência apresenta alto grau de similaridade. É usada para verificar a distribuição espacial dos micro-organismos (POGACIC et al., 2010).

O *real time PCR* (qPCR) é uma técnica molecular cada vez mais aplicada como um método rápido e sensível para quantificação molecular de bactérias em produtos lácteos. Este monitora a amplificação do DNA alvo em tempo real, permitindo a quantificação da espécie-alvo (ZAGO et al., 2009). O qPCR possibilita a detecção do produto da PCR, evitando a necessidade de um pós-processamento, como PCR em gel (agarose, poliacrilamida) ou eletroforese capilar.

As técnicas de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e LH-PCR (*Length Heterogeneity PCR*), também são muito utilizadas para a indentificação de BAL, sendo métodos rápidos, sensíveis e reprodutíveis. T-RFLP é utilizado para avaliar a diversidade de comunidades microbianas complexas, como as dos queijos, baseadas nas variações das regiões do gene 16S rRNA, analisando o polimorfismo de diferentes genes, usando enzimas de restrição. Assim como a T-RFLP, a técnica LH-PCR, também usa enzima de restrição, porém neste caso, com o objetivo de distinguir diferentes organismos com base nas variações no tamanho das seqüências de 16S rRNA (RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, 2009; POGACIC et al., 2010).

Um resumo contendo as vantagens e desvantagens de cada técnica está apresentado no Anexo 1.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - Obtenção das amostras**

As amostras foram coletadas no período de março a abril do ano de 2009, em duas empresas produtoras de queijo Mussarela de búfala (Laticínio A e B), situadas no interior do estado de São Paulo. Em cada empresa, foram realizadas três coletas, originadas de três diferentes lotes de produção. No laticínio A, foram coletadas amostras do leite utilizado na elaboração do queijo Mussarela antes e depois da pasteurização, após a adição de coalho e da cultura *starter termófila Streptococcus thermophilus*, da massa do queijo após a filagem, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação) recém processado, e após 14 e 28 dias de fabricação. No laticínio B, foram coletadas amostras do leite *in-natura* utilizado na elaboração do queijo Mussarela, após a adição de coalho, da massa do queijo após a filagem, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação) recém processado, e após 14 e 28 dias de fabricação. As amostras foram coletadas em frascos e ambientes sob condições estéreis, diretamente na área de produção, e acondicionadas em caixas térmicas contendo gel reciclável, sendo direcionadas ao laboratório para análise.

#### **4.1.1 - Preparo da cultura lática**

No laticínio A, as culturas *starters* termófilas (*Streptococcus thermophilus*), liofilizadas e congeladas, eram suspensas em leite de búfala estéril (20U/2L ou 250g/L) e distribuídas em frascos estéreis, sendo estocadas a -20°C até o momento a serem utilizadas para a fabricação do queijo Mussarela de búfala.

#### 4.1.2 - Processo industrial de fabricação do queijo Mussarela de búfala e pontos de coletas de amostras

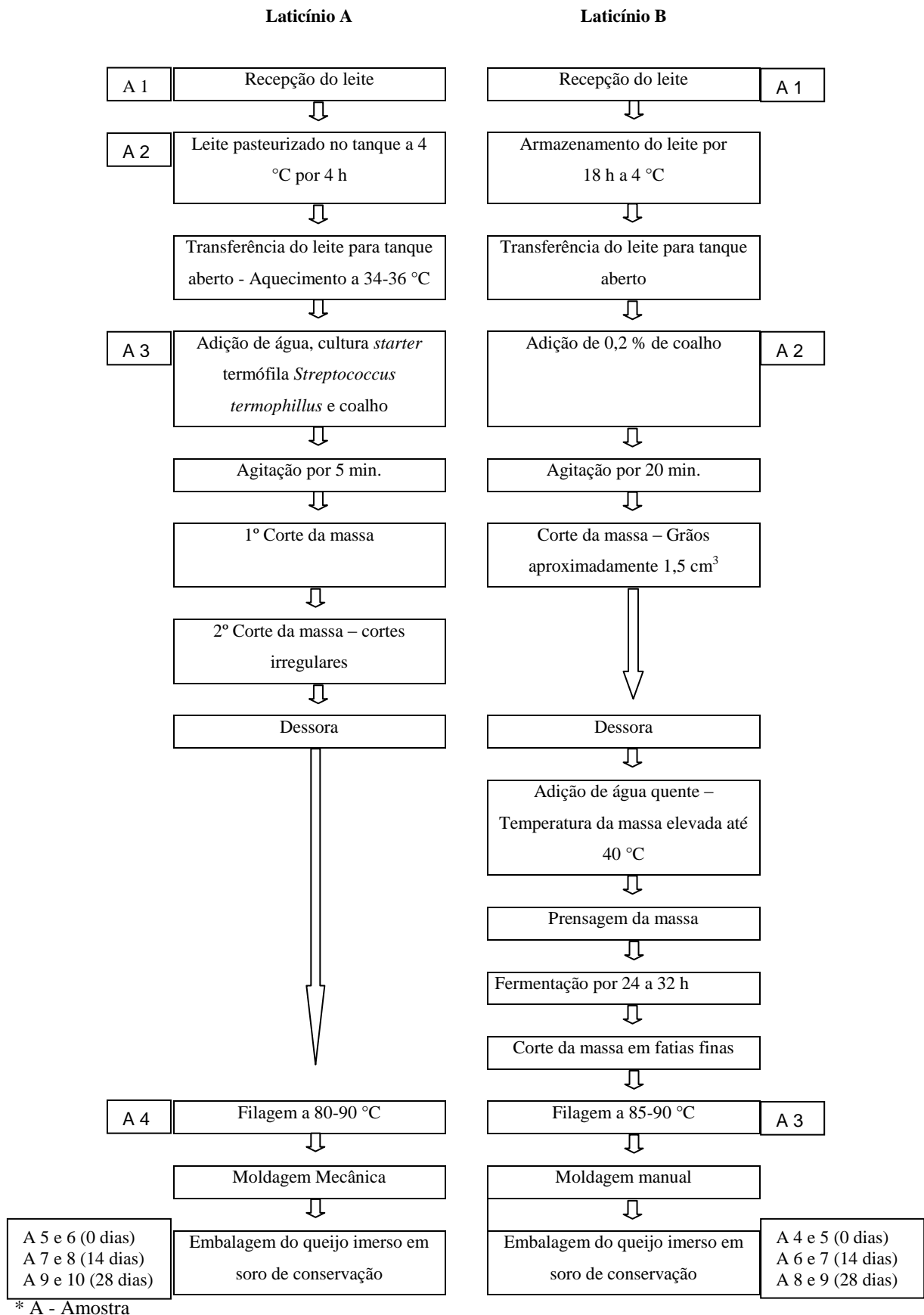
A Figura 2 mostra o processo industrial de fabricação do queijo Mussarela de búfala utilizado pelos Laticínios A e B.

No laticínio A, logo após a recepção, o leite era submetido a pasteurização a 65°C por 30 minutos em tanque de aço inoxidável fechado e posteriormente, mantido em repouso em tanque a 4°C por 4 horas após a pasteurização. Em seguida, o leite era transferido para outro tanque de aço inoxidável com aquecimento elétrico, sendo aquecido a 34-36°C, ao qual adicionava-se água, cultura *starter* termófila (*Streptococcus thermophilus*) previamente preparada e coalho diluído em água, seguindo de movimentos lentos por aproximadamente 5 min. A mistura permanecia aproximadamente 40 min. em repouso para haver a coagulação da massa. Em seguida, era feito um corte da massa com o auxílio de uma lira vertical, no sentido transversal e longitudinal, e após 10 min., finalizava-se o corte para proceder a dessora. Após a decantação da massa, o soro era eliminado por uma válvula do tanque, próprio para esse fim. A massa permanecia no tanque para fermentação por aproximadamente 4 h, quando se obtinha o pH entre 5,0 a 5,2 e acidez entre 29 a 30 °D. Seguindo o processo, iniciava-se a etapa de filagem, manualmente, com adição de água aquecida a 80-90 °C e a moldagem da massa em formato de bola, utilizando um equipamento de origem italiana, próprio para esse fim. Ao final do processo, o queijo Mussarela era colocado em sacos estéreis, com capacidade para 500 g, adicionado de soro de conservação, para a comercialização. Esta solução continha de 6 % de cloreto de cálcio e 6 % de ácido cítrico.

Para as análises, foram coletados 50 mL de amostra do leite *in-natura* e 50 mL do leite pasteurizado, assim como, 50 mL de leite pasteurizado após 15 min. da adição da cultura

*starter* e do coalho. Após a coagulação do leite, no final da dessoragem, foram coletados 200 mL de soro de fabricação, para a preparação do meio de cultivo M17 (M17<sub>S</sub> 10%). Seguindo o processamento, foram coletadas amostras da massa do queijo durante a filagem, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro), imediatamente após a finalização da produção. As amostras do produto acabado do mesmo lote de produção foram analisadas no mesmo dia de processamento e após 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C. Estas amostras estavam embaladas individualmente, sendo abertas a cada avaliação.

No laticínio B, após a recepção, o leite *in-natura* permanecia sob refrigeração a 4 °C por 18 h em tanque de aço inoxidável fechado, com agitação constante. Posteriormente, o leite era transferido a outro tanque de aço inoxidável aberto, sendo aquecido a 32 °C com aquecimento elétrico. Ao leite se adicionava 0,2 % de coalho, sob agitação por 20 min., seguido de repouso por aproximadamente 20 min.



**Figura 2** – Etapas do processo de fabricação dos queijos Mussarela de búfala dos laticínios A e B e pontos de coleta de amostras.

Após a coagulação da massa era feito o primeiro corte com a lira horizontal, obtendo cubos de aproximadamente 1,5 cm, seguida da primeira dessora. O soro era retirado e adicionava-se água quente ao coágulo formado até que a temperatura atingisse 40 °C, quando era realizada a segunda dessora. O soro era retirado, seguindo a prensagem da massa por 15 min. no próprio tanque. A massa permanecia no tanque por aproximadamente 24 a 32 h para a fermentação. O tempo necessário para a fermentação era estabelecido pelo ponto de filagem da massa. Para determinar este ponto, a massa era adicionada de água a 80 °C e submetida ao esticamento para a formação de fios. O ponto era determinado quando se obtinha ótima coesividade e maciez da massa. O pH da massa durante a filagem variou entre 4,9 e 5,1. Após a constatação do ponto de filagem, a massa era cortada em fatias finas e imersa em água com temperatura de aproximadamente 80-90 °C, iniciando o processo de filagem da massa, manualmente.

O queijo Mussarela era moldado no formato de bola, aproximadamente 10 minutos do início da etapa de filagem. Ao final do processo, o queijo Mussarela de búfala era colocado em potes estéreis com capacidade de 500 g e adicionado de soro de conservação, composto por solução a 0,01 % de sorbato de potássio, preparada com água previamente pasteurizada a 72-78 °C por 15 s, do mesmo modo como é comercializada.

Para as análises, foram coletadas 50 mL de amostras do leite *in-natura*, assim como, 50 mL do leite após 15 min da adição do coalho. Após o corte da massa, no final da última dessora, foram coletados 200 mL de soro de fabricação, para a preparação do meio de cultivo M17 (M17<sub>S</sub> 10%). Também foram coletadas amostras da massa do queijo durante a filagem, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro), imediatamente após a finalização da produção. As amostras do produto acabado do mesmo lote de produção foram analisadas no mesmo dia de processamento e após 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C. Estas amostras

estavam embaladas individualmente, sendo abertas a cada avaliação.

No laticínio B o processo de fabricação do queijo Mussarela de Búfala era realizado por um período entre 24 e 36 h, desde a primeira amostra coletada. As amostras do leite *in-natura* e do leite com adição do coalho eram imediatamente processadas e incubadas no laboratório de microbiologia da empresa. As demais amostras, assim como as amostras do laticínio A, eram processadas posteriormente à última coleta (queijo Mussarela imersa em soro), no Laboratório de Leites e Derivados do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Paulista Júlio Mesquita em São José do Rio Preto/SP.

As amostras coletadas foram identificadas e codificadas por laticínios, usando números, em ordem crescente, de acordo com a sequência das coletas.

#### **4.2 - Isolamento das bactérias ácido-láticas (BAL) e caracterização por coloração de Gram e teste de catalase**

Para o cultivo e isolamento das bactérias ácido-láticas empregadas na fabricação do queijo Mussarela, utilizou-se diluições decimais seriadas das amostras líquidas (leite *in-natura*, leite pasteurizado, leite após a adição da cultura *starter* e do coalho e soro de conservação) em água estéril peptonada a 0,1 % (SILVA, 2007). Vinte e cinco gramas das amostras sólidas (massa durante a filagem e produto acabado) foram misturadas por 3 min utilizando um Stomacker (Marconi Equipamentos para laboratório, Piracicaba) com rotação de 150 BPM (Batimentos por minuto) em 225 mL de solução estéril citrato de sódio 2 %, prosseguindo com diluições seriadas. Foram selecionadas diluições pares entre  $10^{-2}$  a  $10^{-10}$ . Um mL das diluições selecionadas foi inoculado em placas de Petri, em duplicata, pela técnica de profundidade, e em seguida, adicionados 20 mL do meio de cultivo seletivo estéril



e previamente fundido a 45 °C (SILVA, 2007).

Foi utilizado o meio seletivo para Lactobacilos *De Man, Rogosa e Sharpe* – MRS (Acumedia) com pH ajustado a 5,4 (MRS<sub>5,4</sub>) com ácido acético, como sugerido pelo *International Dairy Federation Standard* (IDF, 1997). Foi utilizado o meio seletivo M17 (Acumedia), suplementado com 10 % de lactose e com 10 % de soro de fabricação (M17<sub>S 10%</sub>) para *Lactococcus e Streptococcus*. A solução de lactose foi esterilizada por filtração e adicionada ao meio M17, seguindo as normas do IDF (1997). O soro de fabricação foi filtrado em papel de filtro e posteriormente pasteurizado em frascos estéreis a 63 °C por 30 min e foi adicionado ao meio M17 (DE DEA LINDNER, 2008). Os meios de cultivos foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante. As placas foram incubadas invertidas em ágar MRS, a temperatura de 30 °C/48 h (BAL mesófilas) usando um gerador de anaerobiose (Probac do Brasil, São Paulo) e em ágar M17 a 42 °C/48 h (BAL termófilas), em aerobiose.

Após a incubação por 48 h, foi feita a contagem de colônias viáveis seguindo um parâmetro entre 25 a 250 unidades formadoras de colônias (UFC) por placa. As colônias foram contadas e multiplicadas pela recíproca da diluição utilizada e o resultado apontado como unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC. mL<sup>-1</sup>) ou por gramas (UFC. g<sup>-1</sup>) (SILVA, 2007).

As características fenotípicas das colônias, como cor, formato, opacidade ou brilho e rugosidade, assim como posicionamento, profundidade ou superfície na placa, foram considerados para a escolha de quais colônias seriam identificadas posteriormente. Para cada amostra plaqueada, foram selecionadas de uma a dez colônias de ambos os meios de cultura (MRS e M17). Colônias de cada grupo (características distintas) foram retiradas das placas com o uso de alça de platina calibrada em 0,1 mL e repicadas em 10 mL de caldo MRS

acidificado até pH 5,4 e em caldo M17 com 10 % de lactose e incubadas a 30 e 42 °C por período entre 18 e 24 h, para mesófilos e termófilos, respectivamente. Após o desenvolvimento em caldo, 0,1 mL foi plaqueado pelo método de estrias em placas contendo ágar MRS acidificado até pH 5,4 e em ágar M17 com 10 % de lactose, e incubadas a 30 e 42 °C por período entre 24 e 48 h, em anaerobiose e aerobiose, respectivamente. As colônias viáveis purificadas em placas, após os repiques, foram submetidas à coloração de Gram e observadas em Microscópio Óptico, usando objetiva de imersão 100x, assim como ao teste de catalase. Colônias cujo crescimento em placas foi julgado como insuficiente para estoque, foram repicadas em 30 mL de caldo, nas mesmas condições provenientes e após 18 h de incubação foram centrifugadas a 2000 rpm por 8 min, sendo o *pellet* formado estocado. As células (bacilos e cocos) Gram positivo e catalase negativa, provenientes diretamente da placa ou do *pellet* centrifugado, foram estocadas em criotubos com capacidade para 2 mL, contendo 80 % de meio de cultivo e 20 % de glicerol, ambos estéreis. O glicerol foi utilizado como crioprotetor e os cultivos foram, então, congelados a – 80 °C, até o momento da identificação, resultando num banco de culturas contendo 313 isolados.

### **4.3 - Triagem dos isolados**

Para a identificação genotípica e caracterização foram utilizados apenas os micro-organismos isolados das amostras provenientes do laticínio B, que compõem o banco de cultura. O queijo Mussarela de búfala do laticínio B era elaborado artesanalmente com o uso de leite *in-natura* e coalho, sem a adição de cultura *starter* e a fermentação da massa acontecia de forma espontânea pelos micro-organismos presentes no leite e no ambiente. Portanto, a população de BAL presente durante a produção e período de estocagem é

composta por uma diversidade de micro-organismos nativos ou bactérias ácido-láticas não *starter* (NSLAB), que são responsáveis por características sensoriais particulares e importantes para o produto (BUZI et al., 2009).

Foram selecionadas 82 culturas isoladas das amostras coletadas do queijo Mussarela recém-processado, com 14 e 28 dias de estocagem para a técnica de RAPD e construção do dendrograma.

As culturas selecionadas para o sequenciamento foram as representativas da dinâmica populacional pertencentes aos diferentes clusters e/ou culturas que apresentavam similaridade menor que 90 % no dendrograma, totalizando 10 culturas.

Para a caracterização das culturas, foram selecionadas 20 culturas isoladas das amostras com 28 dias de estocagem, em diferentes coletas, pertencentes aos diferentes *clusters*. Foi considerado o final da estocagem, pois as culturas presentes neste período são aquelas que apresentam maior resistência ao microambiente do queijo.

#### **4.3.1 - Cinética de acidificação**

Para a determinação da cinética de acidificação foram utilizadas 20 culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. Foram utilizadas duas culturas comerciais, *Streptococcus thermophilus* (cepa STM5) e *Lactobacillus casei* (Lc-1, Chr. Hansen) como referência. As culturas foram reativadas em meio líquido e cultivadas em ágar, utilizando os meios de cultivo (M17 e MRS) e as mesmas condições em que foram isoladas. Para o preparo do inóculo, uma alíquota de 0,1 µL de cada cultura plaqueada em ágar, foi inoculada em 25 mL de leite de búfala previamente esterilizado e incubada por 2 h. Posteriormente, 5 % do inóculo foram adicionados ao leite de búfala estéril. A fermentação

foi realizada em banho maria sob as mesmas temperaturas utilizadas para o isolamento das culturas (30 ou 42 °C). A cinética de acidificação foi calculada por meio do monitoramento do valor do pH, com o auxílio de um registrador durante a fermentação, até atingir pH 5,0. Foram determinados os parâmetros: velocidade máxima de acidificação (pH/min), tempo para atingir a velocidade máxima (h) e tempo necessário para atingir pH 5,0 (h) (ALMEIDA; TAMIME; OLIVEIRA, 2009). As análises foram realizadas em duplicata

As culturas foram classificadas de acordo com a taxa de acidificação em rápidas, médias ou lentas. As culturas foram consideradas rápidas, médias ou lentas quando a variação do valor de pH ( $\Delta$ pH) em relação ao pH inicial atinge 0,4U de pH em menos de 3 horas, entre 3 e 5 horas, ou mais de 5 horas, respectivamente (AYAD et al., 2004).

#### **4.3.2 - Determinação da atividade proteolítica**

Para a avaliação da atividade proteolítica, as culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem (20 culturas) foram reativadas meio líquido e cultivadas em ágar M17 e MRS nas mesmas condições em que foram isoladas. Para a determinação do tamanho do halo indicativo de proteólise, uma alíquota de 0,1  $\mu$ L da colônia foi plaqueada em ágar leite no centro da placa. O ágar leite foi elaborado com 5 % de peptona de caseína, 3 % de extrato de levedura, 1,2 % de ágar bacteriológico e 50 % de leite desnatado UHT, seguindo a metodologia usada por Nornberg e colaboradores (2009). Após plaqueadas em ágar leite, as culturas foram incubadas por 48 h, sob condições de anaerobiose e aerobiose, a 30 e 42 °C, respectivamente para mesófilos isolados de MRS e termófilos isolados de M17. Após o período de incubação foi feita a medição do diâmetro do halo proteolítico. As análises foram realizadas em duplicata.

### 4.3.3 - Determinação da assimilação de citrato

A utilização de citrato pelas culturas lácticas foi avaliada usando o método de Kempler e McKay (1980), que consiste em verificar a incidência de bactérias citrato positivo (CIT +). Um meio diferencial foi elaborado contendo 1 % (peso/volume) de leite desnatado, 0,25 % de peptona de proteína-hidrolisada do leite, 0,5 % de dextrose e 1,5 % de ágar. O pH foi ajustado a 6,6 antes da esterilização. Foram elaboradas duas soluções: solução 1 contendo 10 % de ferricianida de potássio e solução 2 contendo 1 g de citrato férrico e 1 g de citrato de sódio adicionado a 40 mL de água peptonada 0,1 %. A presença de citrato no meio inibe a reação entre o íon férrico e ferricianida de potássio. Colônias capazes de utilizar o citrato iniciam a reação entre estes íons, resultando na formação de colônias azuis escuras. As soluções foram autoclavadas a 100 °C por 30 min. Dez mL de cada solução foram adicionados em 1 litro do meio diferencial. O meio diferencial adicionado das soluções foi distribuído em placas estéreis, seguido de incubação a 30 °C por 24 h.

As culturas das bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem (20 culturas), previamente reativadas e cultivadas sob as mesmas condições em que foram isoladas, foram plaqueadas pelo método de estrias no meio diferencial e incubadas em anaerobiose a 30 °C ou 42 °C por 48 h. As análises foram realizadas em duplicata. Bactérias citrato positivo (CIT +) apresentaram coloração colônias azul escuro e bactérias citrato negativo (CIT -), colônias brancas. Cepa de *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (ATCC 11007) (CIT+) foi utilizado como controle.

#### 4.3.4 - Caracterização dos compostos voláteis

Para a determinação dos compostos voláteis, foram utilizadas as amostras de leite fermentado pelas culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem até atingir pH 5,0 (20 amostras). Após a fermentação, os leites fermentados foram colocados em frascos estéreis com capacidade para 50 mL e congelados a -20 °C até o momento da análise. Para as análises, alíquotas de 3 mL das amostras de leite fermentado foram transferidas para um frasco com capacidade para 10 mL, as quais eram mantidas a 40 °C. Os compostos voláteis foram capturados da fase vapor (*head-space*) por micro-extração em fase sólida (HS-SPME) com fibra Carbowax<sup>TM</sup>- divinilbenzeno. Vinte e nove padrões analíticos comumente presentes em produtos lácteos fermentados foram utilizados para a identificação dos compostos voláteis: acetaldeído, heptano, dimetil sulfeto, acetona, butilaldeído, 2-butanona, 3-metil-butanal, isopropanol, etanol, pentanal, diacetil, butanoato de etila, tolueno, acetato de butila, hexanal, 2 metil propanol, etil benzeno, butanol, xileno, limoneno, 3 metil butanol, hexanoato de etila, pentanol, estireno, 3-hidoxi 2-butanona, hexano, ácido acético, ácido butírico, ácido hexanóico. As análises foram realizadas em triplicata utilizando cromatógrafo gasoso HP 6859 acoplado a coluna capilar FFAP (30m x 0,2 mm x 0,22 µm) com detector de ionização de chama (FID). A injeção da amostra no cromatógrafo foi realizada no modo *splitless*, empregando nitrogênio como gás de arraste (1 mL/min.). A programação térmica da coluna cromatográfica foi de 50 °C por 1 min, com taxa de aquecimento de 10 °C por min até a temperatura final de 220 °C e mantida por 10 min. Temperatura do injetor e detector: 250 °C. A caracterização do perfil de compostos voláteis foi realizada no Laboratório de Química Analítica, do IBILCE – UNESP, por colaboração do Prof. Dr. Maurício Boscolo.

## 4.4 - Identificação genotípica dos isolados

### 4.4.1 - Extração do DNA com Kit “Easy DNA” TM

Oitenta e duas culturas ácido-láticas isoladas das amostras de queijo Mussarela de búfala recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem provenientes do laticínio B, estocadas a -80°C, foram revitalizados em 10 mL de caldo MRS<sub>5,4</sub> e M17, incubados a 30 °C e 42 °C por 24 h, respectivamente para mesófilos e termófilos, e repicados em placas contendo ágar MRS<sub>5,4</sub> e M17, sob as mesmas condições.

Depois de purificada, a colônia foi incubada *overnight* em caldo MRS<sub>5,4</sub> e M17 a 30 °C e 42 °C, respectivamente. Em seguida, 1,5 mL do caldo foi adicionado em um tubo de *Eppendorf* e centrifugado a 1089 g por 10 min. O *pellet* obtido foi utilizado para a extração do DNA genômico bacteriano, utilizando o Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad, California), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a centrifugação, ao *pellet* obtido foram adicionados 350 µL da solução de lise e incubado a 65 °C por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 150 µL da solução precipitante e a mistura foi agitada vigorosamente até ficar homogênea. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio no tubo contendo a mistura, a qual foi agitada até a obtenção de uma solução homogênea. O tubo foi centrifugado a 1.089 g a 4 °C por 15 min para a separação das fases. A fase superior, o sobrenadante, foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado 1 mL de etanol absoluto (Merck Chemicals) a -20 °C. Depois de homogeneizado, o tubo foi incubado em gelo por 30 min.

Em seguida, o tubo contendo o sobrenadante foi centrifugado a 18.900 g a 4 °C por 15 min. O etanol foi removido e o DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70 % a -

20 °C. As etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas por mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e, após completa evaporação do etanol em temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de solução tamponante TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0) adicionado de 2 µL de RNase (2 mg/mL) (Fermentas). O tubo foi incubado a 37 °C por 30 min. Os cálculos de concentração do DNA foram feitos a partir de 1,0 µL de amostra usando o equipamento Thermo NanoDrop (Uniscience) em comprimento de onda de 260 nm. O DNA obtido foi armazenado em freezer a -20 °C para posterior utilização.

#### **4.4.2 - Análise por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)**

As amostras de DNA, previamente extraídas usando o usando Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad California) e quantificadas, foram amplificadas pela técnica de RAPD usando o *primer* universal M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'), seguindo a metodologia usada por De Dea Lindner (2008), com adaptações.

A PCR foi realizada com volume final de 25 µL, seguindo o protocolo: 2,5 µL de tampão (10x), 1,6 µL de dioxinucleosideo trifosfato (2,5 mM), 1,25 µL de *primer* (2 µM) (Sigma), 3,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5U/µL) (Fermentas) e 1,0 µL de DNA (2,5 ng/µL), e completando o volume com água ultra - pura Milli Q (INVITROGEN). A PCR foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). O DNA foi submetido a 40 ciclos de amplificação com as etapas de desnaturação a 94 °C por 60 s, anelamento a 45 °C por 20 s, extensão a 72 °C por 2 min e extensão final de 10 min a 72 °C. Os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0 %, previamente adicionado de brometo de



etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada em 3 h (30' a 100 V e 2 horas e 30' a 50 V). Foram aplicados 3 µL de marcador de massa molecular de 1000 pb (Invitrogen).

O resultado foi observado sob luz ultravioleta e fotografado utilizando o aparelho Kodak Gel Logic 2200 Imaging System (Molecular Imaging Software). Foram calculadas as porcentagens de desacordo e os genótipos foram agrupados pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) para posterior construção de um dendrograma com o auxílio do software BioNumerics™ (Applied Maths BVBA, Belgium). O cálculo de similaridade dos perfis do PCR *fingerprinting* foi baseado no Coeficiente de Correlação de Pearson. Perfis com similaridade de coeficiente maior que 90 % no dendrograma foram consideradas seguindo o mesmo biotipo.

#### **4.4.3 - Reação de PCR para o sequenciamento do gene 16S rRNA**

Para a amplificação da seqüência conservada do gene 16s rRNA dos biotipos representantes das linhagens obtidas por RAPD foram sequenciados (DE DEA LINDNER, 2008) usando os *primers* 16 46 “forward” (5'-GCY TAA CAC ATG CAA GTC GA-3') e 16 536 “reverse” (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G -3') (SIGMA).

A reação de PCR foi realizada com o volume final de 50 µL contendo: 5,0 µL de solução tampão (10x), 4,0 µL de DNTPs (0,25mM), 1 µL de cada *primer* (20 µM), 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 5,0 µL de *Taq* DNA polimerase (2,5 U/100µL) e 2 µL de DNA (50 ng/ µL) completando o volume final com água ultra - pura Milli Q (INVITROGEN). Esta reação foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a amplificação do gene, o DNA foi submetido a 30 ciclos com as etapas de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 59 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 45 s e extensão final de 10

min a 72 °C. Os fragmentos de DNA gerados pela PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, previamente adicionado de brometo de etídio (0,8 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada a 70 volts de gel por 2,5 h. Foi utilizado marcador de peso molecular de 1000 pb ( $\gamma$  DNA – BstEII Digest, BioLabs) para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

#### **4.4.3.1 - Purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento**

Os produtos obtidos pelas reações de PCR foram purificados com etanol, de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russel (2001). Os *amplicons* foram transferidos para tubos de 1,5 mL onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 3 µL de acetato de sódio (3 M) seguido de 150 µL de etanol 100 %. Os tubos foram então levados a freezer -80 °C por 20 min para a precipitação do DNA. Posteriormente, os tubos foram submetidos a centrifugação a 20.442 g (rotor Eppendorf F45-24-11) por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µL de etanol 70 % (Merck). Em seguida, foi realizada centrifugação a 20.442 g por 10 min a 4 °C, para obtenção de um precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi homogeneizado em 20 µL de água ultra - pura Milli Q (INVITROGEN).

#### **4.4.3.2 - Sequenciamento da região 16S rRNA.**

As seqüências da região 16S rRNA foram determinadas utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA), segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados ambos os *primers* 16 46 “forward” (5’-GCY TAA CAC ATG CAA GTC GA-3’) e

16 536 “reverse” (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G -3') (SIGMA). A PCR para seqüenciamento foi realizada com volume final de 20 µL, onde foram utilizados 2,0 µL de Big Dye Terminator, 4,0 µL de solução tamponante (5x), 1,0 µL de *primer* (3,2 µM), 5,0 µL do DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/mL e 8 µL de água ultra - pura Milli Q (INVITROGEN) suficiente para completar a reação. A amplificação foi submetida a 25 ciclos com as etapas de desnaturação a 96 °C por 30 s, a hibridização a 50 °C por 15 s, a extensão a 60 °C por 4 min e a extensão final a 4 °C. O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa Blastn (*Basic Local Alignment Search Tool*) que gerou arquivos com eletroferograma de cada seqüência comparadas com seqüências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 - Isolamento das bactérias ácido-láticas (BAL)**

As bactérias ácido-láticas (BAL) foram isoladas de diferentes etapas do processamento do queijo Mussarela de búfala imersa ao soro, assim como durante o período de estocagem, a fim de observar a sucessão da microbiota lática presente.

A população de micro-organismos viáveis apresentou-se de forma bastante heterogênea, não seguindo um padrão nas diferentes etapas do processo e tempo de estocagem do queijo Mussarela e soro de conservação (Anexos de 2 a 9). Esta heterogeneidade,

possivelmente foi influenciada pelas distintas condições ambientais e higiênicas encontradas a cada coleta realizada, assim como a temperatura, manipuladores, a origem e a qualidade do leite. Os resultados para micro-organismos isolados dos laticínios A e B estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

No laticínio A, para o processo tecnológico da fabricação do queijo Mussarela de Búfala, o leite era pasteurizado e culturas *starters* comerciais eram adicionadas, acelerando o processo de fermentação.

Culturas *starters* são principalmente as espécies de bactérias lácticas que são adicionadas ao leite tendo como papel principal o de iniciar a produção de ácido láctico para o processo de fabricação do queijo (DE DEA LINDNER, 2008). No entanto, estas culturas cumprem outras funções importantes, tais como a inibição do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e padronização da qualidade dos queijos (DE ANGILES et al., 2008).

A adição de culturas *starters* em derivados lácteos proporciona uma rápida acidificação e uma certa estabilidade do produto final, em contrapartida, seu uso tem causado um decréscimo na biodiversidade da microbiota natural presentes nestes produtos (MOREA, 1999; WOUTERS et al., 2002). A composição da microbiota láctica presente no queijo Mussarela de búfala tem sido estudada e definida como um conjunto de biótipos essenciais para o processo tecnológico, influenciando diretamente na qualidade deste queijo (COPPOLA et al., 1990; ERCOLINI et al., 2004).

**Tabela 1** - População de bactérias lácticas mesófilas e termófilas, isoladas das amostras coletadas no laticínio A, durante as etapas do processamento, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação), recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C.

Amostras		Coletas			
		1	2	3	
M17	42 °C	Leite <i>in-natura</i> UFC. mL <sup>-1</sup>	1,5 x 10 <sup>9</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>	4,3 x 10 <sup>5</sup>
		Leite pasteurizado UFC. mL <sup>-1</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup>	9,9 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>5</sup>
		Leite com adição de cultura <i>starter</i> e coalho UFC. mL <sup>-1</sup>	4,0 x 10 <sup>8</sup>	1,9 x 10 <sup>9</sup>	3,2 x 10 <sup>7</sup>
		Massa durante a filagem UFC. g <sup>-1</sup>	2,0 x 10 <sup>8</sup>	4,8 x 10 <sup>7</sup>	2,4 x 10 <sup>3</sup>
		Queijo mussarela recém processado UFC. g <sup>-1</sup>	1,3 x 10 <sup>5</sup>	2,0 x 10 <sup>9</sup>	2,1 x 10 <sup>3</sup>
		Queijo mussarela 14 dias UFC. g <sup>-1</sup>	2,8 x 10 <sup>5</sup>	5,4 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>
		Queijo mussarela 28 dias UFC. g <sup>-1</sup>	4,0 x 10 <sup>2</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>
		Soro de conservação recém processado UFC. mL <sup>-1</sup>	<10	9,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>
		Soro de conservação 14 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	3,3 x 10 <sup>9</sup>	9,6 x 10 <sup>5</sup>	3,0 x 10 <sup>6</sup>
Soro de conservação 28 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	5,0 x 10 <sup>4</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	<10		
MRS	30 °C	Leite <i>in-natura</i> UFC. mL <sup>-1</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	5,4 x 10 <sup>5</sup>
		Leite pasteurizado UFC. mL <sup>-1</sup>	<10	5,0 x 10 <sup>4</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup>
		Leite com adição de cultura <i>starter</i> e coalho UFC. mL <sup>-1</sup>	<10	2,8 x 10 <sup>5</sup>	<10
		Massa durante a filagem UFC. g <sup>-1</sup>	<10	<10	<10
		Queijo mussarela recém processado UFC. g <sup>-1</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	<10	4,0 x 10 <sup>2</sup>
		Queijo mussarela 14 dias UFC. g <sup>-1</sup>	<10	<10	1,0 x 10 <sup>3</sup>
		Queijo mussarela 28 dias UFC. g <sup>-1</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>	<10	1,0 x 10 <sup>3</sup>
		Soro de conservação recém processado UFC. mL <sup>-1</sup>	<10	<10	1,0 x 10 <sup>4</sup>
		Soro de conservação 14 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	<10	<10	8,3 x 10 <sup>11</sup>
Soro de conservação 28 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup>	<10	3,0 x 10 <sup>4</sup>		

\*UFC: Unidade Formadora de Colônias por mL para amostras líquidas e por g para amostras sólidas. Culturas cultivadas em ágar MRS acidificado a 5,4 e ágar M17 com 10 % de lactose e 10 % de soro de fabricação e incubadas a 30 e 42 °C por 48 h, em anaerobiose e aerobiose, respectivamente.

Nas amostras coletadas no laticínio A, as contagens de BAL em leite *in-natura* variou entre  $2,6 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^9$  UFC. mL<sup>-1</sup>, ambas para termófilos cultivados em M17. Nas três coletas, houve uma redução na população para os meios M17 e MRS no leite após a pasteurização, com exceção da coleta 2 (Figura 3). As BAL cultivadas em meio MRS perderam a viabilidade desde a pasteurização do leite (<10 UFC. g<sup>-1</sup>). As amostras coletadas após a adição de coalho e da cultura *starter* termófila, apresentaram um aumento para as contagens de colônias em meio M17, relacionado à adição do *Streptococcus termophilus*, enquanto a filagem contribuiu para a redução da densidade populacional das BAL em UFC. g<sup>-1</sup> para ambos os meios de cultivo, indicando a sensibilidade ao tratamento térmico usada durante esta etapa. Estes resultados são semelhantes aos observados por Ercolini et al, (2004), que afirma que, a contagem de micro-organismos termófilos em placas de M17 diminuiu significativamente após a etapa de filagem.

De acordo com a Normativa Nº 51 de 18/09/2002, a contagem padrão em placas do leite refrigerado tipo A *in-natura* deve apresentar no máximo  $1 \times 10^9$  UFC/mL e do leite pasteurizado  $1 \times 10^5$  UFC/mL, entretanto, estes valores não foram observados nas amostras de leite *in-natura* e pasteurizado coletadas no laticínio A.

No produto acabado (queijo Mussarela de búfala) recém processado, houve aumento dos micro-organismos mesófilos cultivados em MRS ( $5,0 \times 10^2$  UFC. g<sup>-1</sup>) e um declínio de termófilos ( $1,3 \times 10^5$  UFC. g<sup>-1</sup>) cultivados em M17, quando comparado com a etapa de filagem, provavelmente, pelo desenvolvimento de BAL autóctones. Com vinte e oito dias de estocagem do queijo Mussarela, houve uma redução de micro-organismos termófilos nas coletas 1 e 2. Estes resultados são semelhantes aos observados por De Angelis e colaboradores (2008), na avaliação de queijo Mussarela durante a estocagem. Na coleta 3 houve aumento das BAL no final da estocagem. Para as BAL mesófilas não houve um

comportamento padrão para as três coletas. Estas variações nas contagens podem ser indícios de uma competição entre BAL presentes. Também podem ser variações entre as amostras de um mesmo lote de fabricação, uma vez que a cada análise, uma nova amostra era aberta para a avaliação.

Assim como no período de estocagem do queijo Mussarela de búfala, houve também uma alternância nas contagens de colônias dos micro-organismos presentes no soro de conservação. Em geral, foram baixas as contagens de para BAL mesófilas no soro de conservação, com exceção da amostra da terceira coleta aos quatorze dias ( $8,3 \times 10^{11}$  UFC. mL<sup>-1</sup>). Para as BAL termófilas, em geral, houve aumento da população durante todo o período de estocagem.

No laticínio B, a tecnologia de fabricação do queijo Mussarela de búfala usava leite *in-natura* sem a adição de cultura *starter* e a fermentação da massa acontecia de forma espontânea pelos micro-organismos presentes no leite e no ambiente.

Apesar da importância da pasteurização para a qualidade do produto acabado, assim como na Itália, muitos laticínios no Brasil trabalham com leite *in-natura* na elaboração do queijo Mussarela de búfala, com o propósito de não alterar o processo tecnológico, além de garantir as características sensoriais particulares e inerentes ao produto (BUZI et al., 2009).

No tradicional queijo Mussarela fabricado com o leite *in-natura*, as BAL presentes no leite constituem a população de micro-organismos, os quais influenciam diretamente a qualidade do produto acabado (ERCOLINI et al., 2001b, 2004), proporcionando sabores característicos e desejados quando comparados aos queijos fabricados com leite pasteurizado (ALBENZIO et al., 2001).

No laticínio B, por utilizar leite não pasteurizado, as populações de BAL, assim como no leite *in-natura*, no leite com adição de coalho e na massa durante a filagem, foram

elevadas ( $2,2 \times 10^6$  a  $6,5 \times 10^{15}$ ) em todas as coletas. Porém houve uma redução de contagens de UFC.  $g^{-1}$  durante a filagem em MRS, indicando uma maior sensibilidade para mesófilos ao tratamento térmico.

No queijo Mussarela durante a estocagem não houve um comportamento uniforme nas três coletas; nas coletas 1 e 2 houve aumento na população de mesófilos e termófilos durante a estocagem, enquanto na terceira coleta, houve uma redução.



**Tabela 2** - População de bactérias lácticas mesófilas e termófilas, isoladas das amostras coletadas no laticínio B, durante as etapas do processamento, assim como do produto acabado (queijo Mussarela e soro de conservação), recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem a 4 °C.

Amostras		Coletas			
		1	2	3	
M17	42 °C	Leite <i>in-natura</i> UFC. mL <sup>-1</sup>	1,3 x 10 <sup>9</sup>	3,1 x 10 <sup>11</sup>	6,5 x 10 <sup>15</sup>
		Leite com adição de coalho UFC. mL <sup>-1</sup>	7,1 x 10 <sup>7</sup>	2,4 x 10 <sup>11</sup>	2,4 x 10 <sup>10</sup>
		Massa durante a filagem UFC. g <sup>-1</sup>	1,3 x 10 <sup>8</sup>	6,5 x 10 <sup>11</sup>	2,2 x 10 <sup>6</sup>
		Queijo mussarela recém processado UFC. g <sup>-1</sup>	5,8 x 10 <sup>9</sup>	7,5 x 10 <sup>7</sup>	2,6 x 10 <sup>9</sup>
		Queijo mussarela 14 dias UFC. g <sup>-1</sup>	6,5 x 10 <sup>11</sup>	3,1 x 10 <sup>3</sup>	1,5 x 10 <sup>7</sup>
		Queijo mussarela 28 dias UFC. g <sup>-1</sup>	1,8 x 10 <sup>10</sup>	2,2 x 10 <sup>10</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>
		Soro de conservação recém processado UFC. mL <sup>-1</sup>	1,2 x 10 <sup>7</sup>	6,1 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>
		Soro de conservação 14 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	9,7 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>4</sup>
		Soro de conservação 28 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>
MRS	30 °C	Leite <i>in-natura</i> UFC. mL <sup>-1</sup>	3,3 x 10 <sup>5</sup>	3,4 x 10 <sup>11</sup>	6,5 x 10 <sup>15</sup>
		Leite com adição de coalho UFC. mL <sup>-1</sup>	5,7 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>9</sup>	1,5 x 10 <sup>12</sup>
		Massa durante a filagem UFC. g <sup>-1</sup>	4,6 x 10 <sup>7</sup>	4,7 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>
		Queijo mussarela recém processado UFC. g <sup>-1</sup>	4,4 x 10 <sup>7</sup>	5,8 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>
		Queijo mussarela 14 dias UFC. g <sup>-1</sup>	1,1 x 10 <sup>10</sup>	3,6 x 10 <sup>9</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>
		Queijo mussarela 28 dias UFC. g <sup>-1</sup>	6,5 x 10 <sup>7</sup>	4,8 x 10 <sup>7</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>
		Soro de conservação recém processado UFC. mL <sup>-1</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	4,0 x 10 <sup>4</sup>	<10
		Soro de conservação 14 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	1,3x 10 <sup>5</sup>	6,2 x 10 <sup>7</sup>	<10
		Soro de conservação 28 dias UFC. mL <sup>-1</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup>

\*(UFC): Unidade Formadora de Colônias por mL para amostras líquidas e por g para amostras sólidas. Culturas cultivadas em ágar MRS acidificado a 5,4 e ágar M17 com 10 % de lactose e 10 % de soro de fabricação e, encubadas a 30 e 42 °C por 48 h em anaerobiose e aerobiose respectivamente.

De maneira geral a população de BAL mesófilas não apresentou grandes variações durante a estocagem refrigerada, provavelmente pelo uso de sorbato de potássio.

Para as três coletas de soro de conservação, a população de termófilos cultivados em M17 foi semelhante, enquanto em MRS aumentou com 28 dias, com exceção da coleta 2.

Segundo Ercolini e colaboradores (2004), as contagens de micro-organismos mesófilos cultivados em MRS foram mais altas em todas as amostras de queijo Mussarela de búfala em relação a micro-organismos termófilos cultivados em M17. Em contrapartida, no presente estudo, os micro-organismos termófilos foram prevalentes em queijo Mussarela recém processados e com 28 dias para todas as coletas, sendo condizente com a pesquisa realizada por Ottogalli (2000), onde geralmente as espécies termofílicas foram as principais envolvidas na elaboração desse queijo.

## **5.2 - Identificação por coloração de Gram e teste de catalase**

Para a identificação por coloração de gram, foram selecionadas colônias bactérias ácido-láticas que se desenvolveram em meio seletivo M17 a 42 °C e MRS a 30 °C, provenientes das amostras dos laticínios A e B. As colônias selecionadas apresentavam características distintas de cor, formato, opacidade ou brilho e rugosidade, assim como posicionamento, profundidade ou superfície na placa. Seguindo um padrão de uma a dez colônias selecionadas com características distintas de cada amostra plaqueada, se obteve entre cocos e bacilos, 131 isolados das amostras advindas do laticínio A (Tabela 3) e 182 isolados do laticínio B (Tabela 4).

Os micro-organismos isolados das colônias selecionadas que apresentaram o resultado positivo no teste de coloração de gram foram submetidos ao teste de catalase. Todas as amostras apresentaram o resultado negativo no teste.

Dentre os micro-organismos isolados de todas as coletas do laticínio A, 57,25 % foram provenientes do cultivo em meio M17 incubados a 42 °C, sendo representados por culturas termófilas e 42,75 % cultivados em meio MRS, incubados a 30 °C, representados por mesófilos. Os cocos termófilos foram predominantes (38,17 %), seguindo de cocos mesófilos (24,43 %), bacilos termófilos (19,08 %) e bacilos mesófilos (18,32 %).

Em geral, os cocos foram prevalentes nas amostras durante todo o processo de produção do queijo Mussarela de búfala e no período de estocagem sob refrigeração a 4 °C, com exceção da amostra do leite *in-natura*, onde os bacilos mesófilos apresentaram maior diversidade. Este resultado está relacionado ao processo de fabricação do queijo, que utilizou leite *in-natura*, passou pela etapa da pasteurização e posterior adição de cultura láctica comercial composta por *Streptococcus thermophilus*. Entretanto, foi possível observar que o número de bacilos mesófilos reduziu drasticamente durante a produção e o período de estocagem.

**Tabela 3** - Total de bactérias ácido-láticas isoladas aleatoriamente das amostras provenientes das três coletas do Laticínio A.

Amostras	Bacilos		Cocos		Bacilos cocoides		Total	
	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS
Leite <i>in-natura</i>	3	11	9	8	1	0	13	19
Leite pré-pasteurizado	5	6	4	1	3	2	12	9
Leite com adição de cultura <i>starter</i> e coalho	4	0	12	3	0	0	16	3
Massa durante a filagem	0	0	1	0	0	0	1	0
Queijo mussarela recém processado	0	1	2	1	0	1	2	3
Queijo mussarela 14 dias	0	0	6	3	1	0	7	3
Queijo mussarela 28 dias	2	2	4	7	1	0	7	9
Soro de conservação recém processado	2	0	1	1	0	0	3	1
Soro de conservação 14 dias	0	0	9	3	1	1	10	4
Soro de conservação 28 dias	1	0	2	5	1	0	4	5
<b>Total</b>	17	20	50	32	8	4	75	56

As culturas foram cultivadas em ágar M17 com 10 % de lactose e 10% de soro de fabricação e em ágar MRS acidificado até pH 5,3 e incubadas à 42 e 30 °C por 48 h, em aerobiose e anaerobiose, respectivamente.

Mesmo com a pasteurização do leite e a adição de cultura *starter* termófila, a presença de bacilos mesófilos e termófilos foi observada durante o processamento e período de estocagem, indicando a importância das NSLAB (*Non Starter Lactic Acid Bacteria*) no queijo Mussarela de búfala. Segundo Francioisi e colaboradores (2009), os ambientes naturais são ricos em biodiversidade e pode ser considerado como fonte de linhagens e espécies de BAL que influenciam diretamente na qualidade do queijo Mussarela.

No laticínio B, foram selecionados 182 micro-organismos, seguindo os mesmos padrões de seleção do laticínio A. Entre os micro-organismos isolados de amostras de queijo Mussarela de búfala do laticínio B, 54,95 % foram provenientes do cultivo em meio MRS incubados 30 °C, sendo representados por culturas mesófilas e, 45,05 % cultivados em meio

M17, incubado a 42 °C, representado por termófilos. Cocos termófilos foram predominantes (40,66 %), seguindo de bacilos mesófilos (34,07 %), cocos mesófilos (20,88 %) e bacilos termófilos (4,39 %).

**Tabela 4** - Total de bactérias ácido-láticas isoladas aleatoriamente das amostras provenientes das três coletas do Laticínio B.

Amostras	Bacilos		Cocos		Bacilos cocoides		Total	
	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	MRS
Leite in-natura	2	3	4	4	0	3	6	10
Leite com adição do coalho	2	5	1	7	0	3	3	15
Massa durante a filagem	0	8	6	0	0	0	6	8
Queijo mussarela recém processado	1	12	12	0	2	1	15	13
Queijo mussarela 14 dias	0	9	12	7	0	1	12	17
Queijo mussarela 28 dias	0	8	13	7	0	0	13	15
Soro de conservação recém processado	0	4	7	0	0	0	7	4
Soro de conservação 14 dias	0	3	12	7	0	1	12	11
Soro de conservação 28 dias	1	1	7	6	0	0	8	7
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>53</b>	<b>74</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>82</b>	<b>100</b>

As culturas foram cultivadas em ágar M17 com 10 % de lactose e 10 % de soro de fabricação e em ágar MRS acidificado até pH 5,3 e incubadas à 42 e 30 °C por 48 h, em aerobiose e anaerobiose, respectivamente.

Os cocos termófilos isolados foram prevalentes nas amostras durante o período de estocagem sob refrigeração a 4 °C e bacilos mesófilos durante a produção. Segundo Morea e colaboradores (1998) e Morea, Baruzzi e Coconcelli (1999), a microbiota representada por cocos é maior em relação a bacilos nas amostras coletadas durante o processamento do queijo mussarela tradicional, diferindo das amostras das coletas do laticínio B durante a produção.

Embora lactobacilos não sejam a microbiota dominante em pesquisas realizada com queijo Mussarela, vários autores apontam sua importância para a produção desse derivado

lácteo (COPPOLA et al., 1990; MOREA et al., 1998, 1999), sendo encontrados durante a fermentação e no produto acabado. Pesquisa desenvolvida por Morea e colaboradores (1998) mostra que cepas de *Lactobacillus* estão presentes durante todos os estágios do processamento do queijo Mussarela, sendo encontradas diferentes espécies homofermentativas e heterofermentativas.

Pesquisa realizada por Ercolini e colaboradores (2001b) mostra que a microbiota láctica presente na elaboração do queijo Mussarela de búfala tradicional é representada pelo gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus*, obtendo uma média de  $10^8$  UFC/mL para ambos os gêneros termófilos e mesófilos.

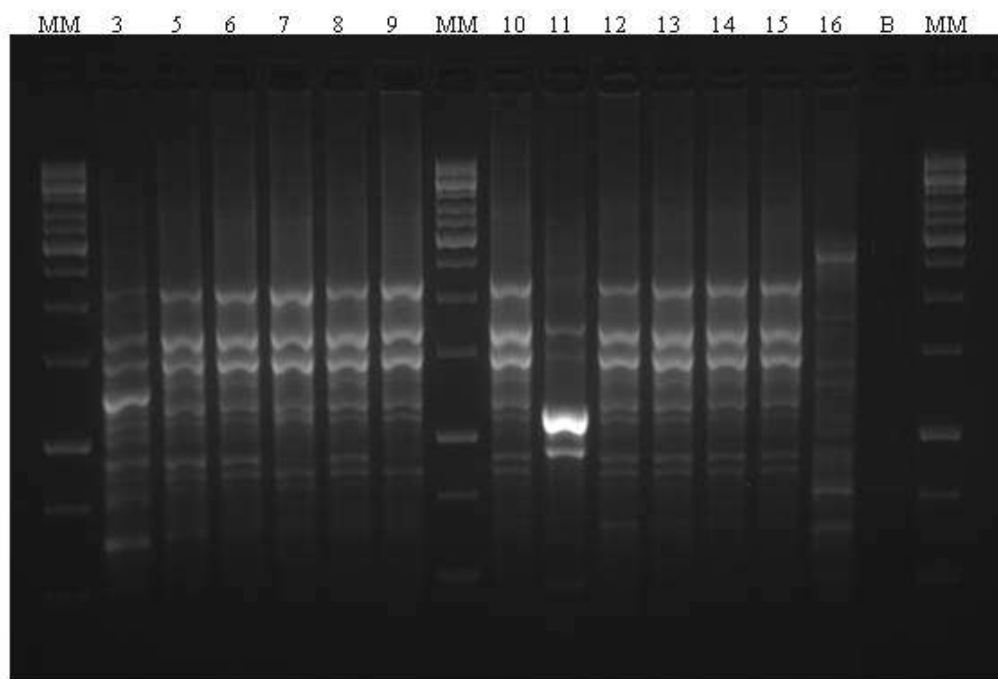
### **5.3 - Identificação genotípica**

#### **5.3.1 - Análise por RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)**

Para a extração do DNA e para a técnica de RAPD, foram selecionadas 82 culturas provenientes do queijo Mussarela de búfala recém processado, com 14 e 28 dias de estocagem, provenientes amostras coletadas no laticínio B.

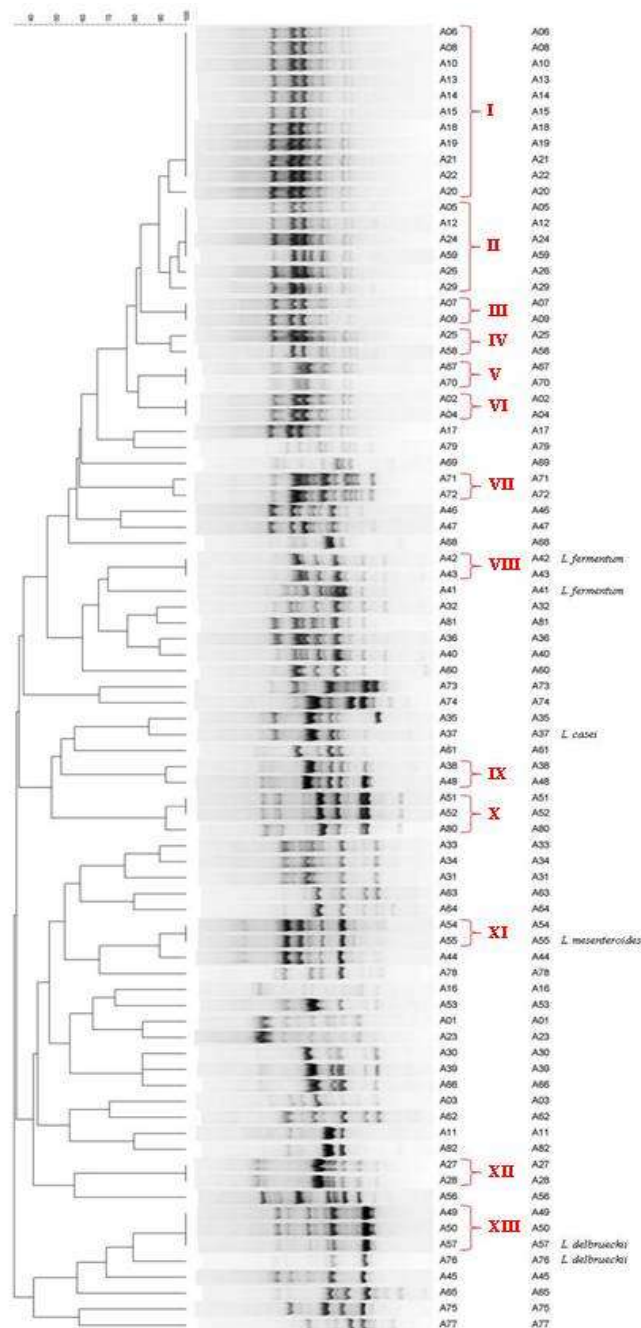
A imagem de eletroforese em gel de agarose (Figura 3) ilustra a amplificação dos fragmentos de DNA destas culturas.

Para a construção do dendrograma (Figura 4), as 82 culturas foram submetidas à reação de RAPD e os fragmentos de DNA revelados em gel de agarose a 2 % e agrupados conforme a similaridade das bandas.



\*A - Amostra; B - Branco; MM - Marcador de Massa Molecular.

**Figura 3** - Fragmentos de DNA separados por eletroforese em gel de agarose 2,0 % em TAE 1X, seguindo o protocolo utilizado por De Dea Lindner (2008), com algumas modificações. A reação de PCR foi submetida a 45 ciclos de amplificação, com a etapa de desnaturação inicial a 95 °C/min, desnaturação a 94 °C/60 s, anelamento a 40 °C/1 min, extensão a 72 °C/2 min e extensão final a 72 °C/10 s. A eletroforese foi realizada em 3 h (30 min a 100 V e 2,5 h a 50 V). Os DNAs utilizados foram extraídos usando Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad California). Foi aplicado 3 µL de marcador de massa molecular de 1000 pb.



**Figura 4** - Análises de clusters dos padrões de RAPD usando o primer M13 seguindo a metodologia de De Dea Lindner (2008), com algumas modificações. Foram analisadas 82 culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala.  $\geq 90\%$  de similaridade, os clusters foram considerados sendo o mesmo biotipo. As chaves representam os clusters com  $\geq 90\%$  de similaridade. Os clusters I, II, VI, IX, X e XIII são compostos pelas culturas isoladas de diferentes dias de coleta.



De acordo com POGACIC e colaboradores (2010), a microbiota presente em queijos é complexa e responsável pelas características sensoriais de aroma, sabor e textura. A técnica de RAPD tem sido extensivamente utilizada na identificação da microbiota presente em ambientes complexos como os dos queijos (RANDAZZO; CAGGIA e NEVIANI, 2009). Esta técnica de RAPD envolve a amplificação aleatória do genoma bacteriano usando um único *primer* para casos menos específicos (SINGH et al., 2008). Assim, considera-se que somente clusters com coeficientes de correlação acima de 80 % pertencem ao mesmo biotipo (GIRAFFA, 2000; PLATERO et al., 2009).

Neste trabalho, considerando a complexa microbiota presente no queijo Mussarela de bufala, visando um maior poder discriminatório, apenas as culturas que apresentaram coeficiente correlação superiores a 90 % no dendrograma foram classificadas como sendo do mesmo biotipo.

Das culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala foram observados 54 clusters que apresentam o mesmo padrão de RAPD. As chaves representam as cepas agrupadas com mais de 90 % de similaridade (Figura 4). Dentre o padrão observado, baseados nos polimorfismos das bandas, seis clusters são representados por cepas isoladas de diferentes dias de estocagem e de diferentes coletas. O Anexo 10 mostra o agrupamento das amostras nos clusters e a origem das amostras.

Segundo Ben Amor e colaboradores (2007), a técnica de RAPD é amplamente utilizada para estimar a ecologia microbiana presente em queijos, permitindo a diferenciação entre as espécies, ou mesmo, entre as linhagens da mesma espécie. Este é considerado um método confiável para discernir entre as espécies *starter* e não *starter* de queijo ou monitorar mudanças na comunidade de BAL durante a fermentação e estocagem do queijo.

Apesar de ser uma técnica simples e eficiente, a reprodutibilidade da técnica de RAPD é importante, e sua padronização deve ser considerada, uma vez que se trata de uma técnica sensível a variações, como temperatura e qualidade do DNA (BEN AMOR; VAUGHAN; DEVOS, 2007).

A reprodutibilidade do método utilizado foi observada pela repetição do polimorfismo das bandas nos géis da reação de PCR das amostras (Figura 3). Importante observar também que as espécies de *L. fermentum* e *L. delbrueckii* identificadas (Figura 4), se encontram próximas filogeneticamente no dendrograma, evidenciando o mesmo perfil de fragmentos de DNA para as espécies intimamente relacionadas.

Usando a técnica de RAPD, cepas de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. termofílicos foram identificados em queijo Mussarela fabricado com leite bubalino e bovino (MOREA et al., 1998). Assim como cepas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram detectadas durante o processo de fabricação de queijo Mussarela e outros queijos de massa filada (BARUZZI et al., 2000).

Vários estudos usaram a técnica de RAPD para identificação de BAL em queijos. Uma diversidade de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* foi detectada em queijos duros e semi-duros (GIRAFFA et al., 2003). Da mesma forma, uma heterogeneidade de espécies de *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus paracasei* foi detectada em ricotta (BARUZZI et al., 2000) e uma variedade de *Lactococcus ssp.* presente em queijo Mussarela foi identificada por Morea e colaboradores (1999). Esta técnica também foi utilizada para identificar a diversidade de *Leuconostoc* presentes em queijos frescos (PEREZ et al., 2003) e demais produtos lácteos (MOSCHETTI et al., 2000) e no estudo da biodiversidade de *S. thermophilus* de diferentes fontes (LAZZI et al., 2009).

Em um estudo comparativo realizado por Roy e colaboradores (2000), a técnica de RAPD foi a mais adequada para a discriminação entre linhagens de *L. gallinarum* e *L. helveticus*.

Coppola e colaboradores (2006) analisaram padrões de RAPD-PCR de espécies de *L. lactis* isolados do leite *in-natura*, da coalhada e do queijo “Fior di latte”. Cinco biotipos foram isolados do leite *in-natura* e persistiram até o produto acabado.

Uma grande diversidade de espécie de BAL foi identificada. Dentre elas *Lactobacillus* mesófilos (*L. plantarum* e *Lactobacillus casei* subsp. *casei*) e termófilos (*L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus fermentum*), assim como *Streptococcus* (*S. thermophilus*) e *Enterococcus* (*Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus sp.*) (DE ANGILES et al., 2008).

### 5.3.2 - Sequenciamento da região 16S rRNA.

Dez culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem foram submetidas ao sequenciamento da região 16S rRNA, aquelas representativas da dinâmica populacional pertencentes aos diferentes *clusters* e/ou culturas que apresentavam similaridade menor que 90 % no dendograma.

As sequências do gene 16s rRNA das culturas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) ([HTTP:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Foi possível a identificação de 6 culturas: *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbrueckii* e *Lactobacillus casei* (Tabela 5). Quatro culturas não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados.

**Tabela 5** - Similaridade (%) e código de acesso das sequências depositadas no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) das culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem e identificadas a partir do sequenciamento de 500 pb do gene 16S rRNA.

<b>Codificação</b>	<b>Culturas</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Código de acesso</b>
37	<i>Lactobacillus casei</i>	97%	HQ293094.1
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99%	HQ008219.1
42	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98%	HQ293047.2
55	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97%	AB593362.1
57	<i>Lactobacillus delb. subsp. bulgaricus</i>	97%	HQ293055.1
76	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	98%	AB289094.1

As culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem apresentaram elevada similaridade com as sequências depositadas no banco de dados, mostrando que as técnicas genotípicas utilizadas permitiram a identificação com sucesso.

Segundo Botina e colaboradores (2006), o gene 16S rRNA traz informações de diferenças relativamente pequenas entre as espécies. As estimativas de similaridade do gene ribossomal podem ser obtidas para subespécies correspondendo a homologies do gene 16S rRNA de sequências não inferior a 97 %.

Segundo Ogier e colaboradores (2002), BAL pertencentes aos gêneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* foram isolados de diversos produtos lácteos e identificados a partir do sequenciamento da região

ribossomal conservada do gene 16S rRNA.

A associação natural de BAL no queijo Mussarela de búfala imerso ao soro foi investigada por Coppola e colaboradores (1988, 1990), porém com poucas informações sobre a microbiota lática envolvida. Sobretudo, cepas de *Lactobacillus* ssp. pertencentes a espécies *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* e cocos como *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus* ssp., *Leuconostoc mesenteroides*, assim como *Enterococcus faecalis* têm sido encontrados nesse queijo (ERCOLINI et al., 2001b; ERCOLINI, 2004).

Os Lactobacilos constituem o grupo de BAL mais representativo entre os grupos presentes em leite e seus derivados. O *L. fermentum* está presente em vários produtos (CHERIGUENE et al., 2007), como os queijos, fazendo parte do processo tecnológico, ou mesmo em outros derivados lácteos fermentados, associados às propriedades terapêuticas (KLAYRAUNG, OKONOJI, 2009).

Cepas de *Lactobacillus* ssp. homofermentativos e heterofermentativos foram isoladas de amostras coletadas durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e identificadas usando a técnica de RAPD e sequenciamento do gene 16S rRNA. No entanto, *L. fermentum* 7S42 representou 96,5 % no total de lactobacilos encontrados (MOREA et al., 1998). Em uma pesquisa realizada por Ercolini e colaboradores (2001b), essa espécie foi isolada de amostras de queijo Mussarela de búfala, cultivada em meio M17, mas não em meio MRS, que é próprio para o gênero. Neste trabalho, as culturas 41 e 42 ambas identificadas como *Lactobacillus fermentum*, foram isoladas do meio MRS.

De forma semelhante ao observado no laticínio B, cepas de *Lactobacillus casei* foram identificadas usando o seqüenciamento do gene 16S rRNA em amostras da coalhada, do soro

durante o processo de fabricação (Morea et al., 1998) e do queijo Mussarela de búfala (COPPOLA, 2001

Cepas *Lactobacillus delbrueckii* identificadas pelo sequenciamento da região 16S rRNA foram isoladas de queijos de massa filada tipo provolone e de iogurtes (GIRAFFA et al., 2003). Segundo Singh e colaboradores (2008), *Lactobacillus delbrueckii* é o terceiro grupo mais importante entre os *Lactobacillus* ssp. e tem sido identificados com alto grau de homologia pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (VANDAMME et al., 1996). Este grupo é representado por subspecies muito semelhantes entre si: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, sendo as duas últimas comumente utilizadas como iniciadoras para a fermentação dos produtos lácteos.

O gênero *Leuconostoc* também é importante para produção de derivados lácteos. Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, é usado nos produtos lácteos como coadjuvantes para a produção de aromas (HASSAN; FRANK, 2001). As espécies deste gênero capazes de utilizar o citrato são amplamente encontradas em derivados lácteos, como os queijos (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006). Cepas de *Leuconostoc mesenteroides* foram isoladas de queijo Mussarela de búfala, e identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA em pesquisa realizada por Morea e colaboradores (1999). Esta cultura representou mais de 70 % dos micro-organismos isolados de soro fermento usado na elaboração desse produto (VILLANI et al., 2008).

#### 5.4 - Cinética de acidificação

Na determinação da atividade acidificante, vinte culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala com vinte e oito dias de estocagem foram avaliadas. As culturas isoladas atingiram a velocidade máxima de acidificação entre 20 min e 18 h 50 min do início da fermentação, com valores de velocidade máxima entre 0,005 a 0,0305 unidades de pH/min. O tempo necessário para atingir o pH 5,0 variou de 4 h 50 min a 60 h de fermentação, sendo que, em geral, as espécies termofílicas acidificaram o leite mais rapidamente que as mesofílicas (Tabela 6). As culturas ácido-láticas comerciais (controles) apresentaram valores de velocidade máxima de acidificação entre 2 h 50 min e 20 h 50 min, e tempo de fermentação entre 3 h e 32 h 30 min para *Streptococcus thermophilus* (STM5) e *Lactobacillus casei* (LC-1 Chr. Hansen), respectivamente. As curvas de acidificação das culturas isoladas e dos controles estão ilustradas nas Figuras 5 e 6. Estas culturas ácido-láticas foram classificadas como lentas (70 %), entre mesófilas e termófilas, como rápidas (20 %) e médias (10 %), para ambas as culturas termofílicas.

As curvas de acidificação das BAL isoladas e dos controles. Foi possível observar maior variação no valor de pH durante o período de fermentação até atingir pH 5,0 para as culturas 5, 34, 55, 14 e 56. Estas variações são relacionadas à sensibilidade do eletrodo e do registrador de dados.

Dois aspectos importantes a serem considerados para a fermentação de produtos lácteos é a velocidade de acidificação e a intensidade de produção de ácidos (MAURÍCIO, 2003). A quantidade de ácidos produzidos por algumas espécies de *Lactobacillus* é maior em relação a outras comercialmente usadas, como as espécies de *Streptococcus*. Entretanto, na temperatura ótima de cultivo, as espécies termofílicas acidificam o leite mais rapidamente que

as espécies mesofílicas, e na forma de culturas puras, os *Streptococcus ssp.* normalmente são mais rápidos que os *Lactobacillus ssp.*

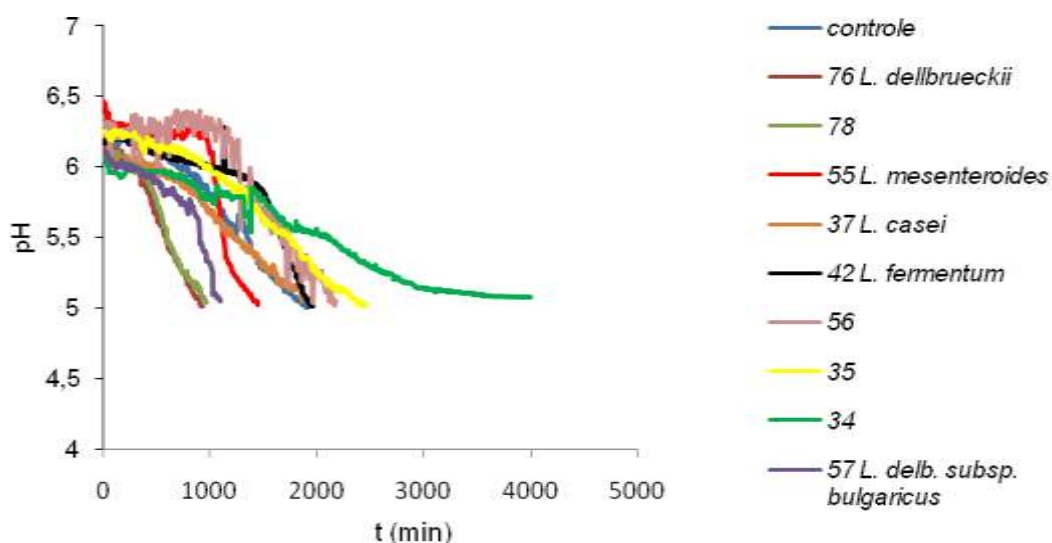
O controle *Streptococcus thermophilus* (STM5) é comumente usado como cultura *starter* na elaboração do queijo Mussarela. A cepa 20 tem bom potencial para esta finalidade, uma vez que apresentou perfil de acidificação próximo ao controle, nas mesmas condições de cultivo. As cepas 5, 26 e 29 também podem ser consideradas boas para a elaboração do queijo Mussarela de búfala, uma vez que foram classificadas como rápidas, sendo interessantes para a fabricação deste queijo.



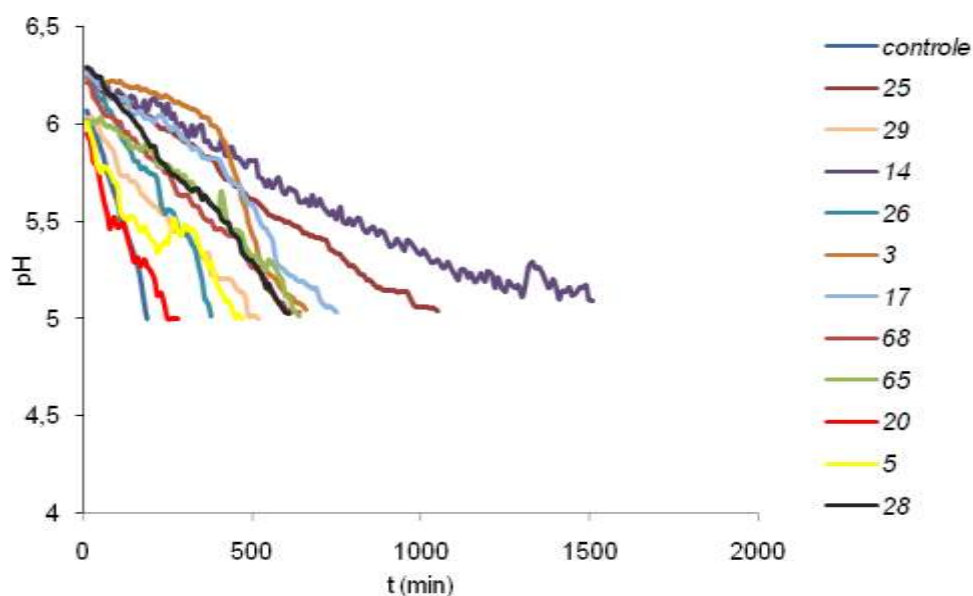
**Tabela 6 - Cinética de acidificação das culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela e comerciais.**

Amostras	Culturas	Meio de cultivo	UFC. mL <sup>-1</sup>	pH inicial	T <sub>pH5</sub>	V <sub>máx</sub> (pH/min)	T <sub>Vmax</sub>	T <sub>ΔpH=0,4</sub>	Classificação
3	Cocos	M17	7,6 x 10 <sup>17</sup>	6,24	11h	0,007	7h40min	7h150min	Lento
5	Cocos	M17	7,6 x 10 <sup>18</sup>	6,10	8h40min	0,008	4h20min	3h	Rápido
14	Cocos	M17	1,2 x 10 <sup>17</sup>	6,28	25h30min	0,008	5h50min	6h20min	Lento
17	Cocos	M17	1,6 x 10 <sup>14</sup>	6,26	12h30min	0,0055	2h10min	5h20min	Lento
20	Cocos	M17	1,2 x 10 <sup>16</sup>	5,95	4h50min	0,0126	20min	1h	Rápido
25	Cocos	M17	1,9 x 10 <sup>14</sup>	6,24	17h40min	0,0045	12h	6h	Lento
26	Cocos	M17	1,5 x 10 <sup>16</sup>	6,28	6h20min	0,249	1h50min	2h10min	Rápido
28	Cocos	M17	1,0 x 10 <sup>17</sup>	6,29	10h40min	0,0055	5h30min	3h20min	Médio
29	Cocos	M17	1,4 x 10 <sup>10</sup>	6,03	8h40min	0,011	6h10min	3h	Rápido
65	Bacilos	M17	4,0 x 10 <sup>16</sup>	6,02	10h50min	0,007	9h50min	6h	Lento
68	Cocos	M17	6,0 x 10 <sup>9</sup>	6,21	10h50min	0,006	20min	3h30min	Médio
Controle	<i>S. thermophilus</i>	M17	1,9 x 10 <sup>15</sup>	6,07	3h10min	0,013	2h50min	1h30min	Rápido
34	Bacilos	MRS	4,0 x 10 <sup>8</sup>	6,08	60h	0,0266	15h10min	22h	Lento
35	Bacilos	MRS	4,0 x 10 <sup>8</sup>	6,25	41h10min	0,005	2h10min	20h10min	Lento
37	<i>L. casei</i>	MRS	1,5 x 10 <sup>10</sup>	6,22	31h	0,007	13h50min	13h30min	Lento
42	<i>L. fermentum</i>	MRS	6,0 x 10 <sup>8</sup>	6,17	33h50min	0,0305	18h50min	25h10min	Lento
55	<i>L. mesenteroides</i>	MRS	2,5 x 10 <sup>17</sup>	6,46	24h20min	0,009	18h30min	17h	Lento
56	Bacilos	MRS	4,2 x 10 <sup>8</sup>	6,30	36h30min	0,014	11h40min	21h20min	Lento
57	<i>L. delb. subsp. bulgaricus</i>	MRS	4,3 x 10 <sup>11</sup>	6,09	18h20min	0,0115	14h50min	13h	Lento
76	<i>L. delbrueckii</i>	MRS	8,0 x 10 <sup>12</sup>	6,15	15h30min	0,007	7h50min	7h50min	Lento
78	Cocos	MRS	2,8 x 10 <sup>15</sup>	6,36	16h	0,0065	30min	5h20min	Lento
Controle	<i>L. casei</i>	MRS	4,0 x 10 <sup>9</sup>	6,15	32h30min	0,08	20h50min	17h20min	Lento

Médida da duplicata. T<sub>pH5</sub> - tempo necessário para atingir pH5,0; V<sub>máx</sub> (pH/min) - velocidade máxima atingida; T<sub>Vmax</sub> - tempo necessário para atingir a velocidade máxima; T<sub>ΔpH=0,4</sub> - tempo necessário para atingir a diferença de 0,4 unidades de pH com relação ao pH inicial.



**Figura 5** – Curvas de acidificação das culturas mesófilas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem, cultivadas em ágar MRS. As culturas fermentaram o leite de búfala até atingir o pH 5,0. A cepa comercial *Lactobacillus casei* (LC-1 Chr. Hansen) foi usada como controle.



**Figura 6** – Curvas de acidificação das culturas termófilas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem, cultivadas em ágar M17. As culturas fermentaram o leite de búfala até atingir o pH 5,0. A cepa comercial *Streptococcus thermophilus* (STM5, Fundação André Tosello) foi usada como controle.

A escolha de uma cultura rápida para a fabricação do queijo Mussarela é fundamentada na necessidade da rápida obtenção do pH ideal para a filagem (4,9 a 5,2), visando diminuir ao máximo a sinérese durante a fermentação e garantir a consistência adequada do produto (MAURÍCIO, 2003).

As cepas 37 (*Lactobacillus casei*) e 42 (*Lactobacillus fermentum*) obtiveram tempo necessário para atingir pH 5,0 próximo ao do controle *Lactobacillus casei* (LC-1 Chr. Hansen), assim, estas culturas mesofílicas apresentam potencial para aplicação industrial na elaboração de leites fermentados, ou como culturas adjuntas para a elaboração de queijos.

*Lactobacillus casei* geralmente está presente na elaboração de iogurtes pela sua função probiótica. Frequentemente está associado à fermentação secundária durante a maturação de alguns queijos, como o queijo Cheddar (BERESFORD E WILLIAMS, 2004), ou presentes como NSLAB compondo as culturas lácticas artesanais (CROW et al., 2001).

Em diferentes variedades de queijos, elaborados com leite *in-natura* ou pasteurizado, a classe dominante de NSLB são lactobacilos facultativos homofermentativos, especialmente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus curvatus*, e estritos heterofermentativos, particularmente *Lactobacillus brevis*, sendo encontrado em menor quantidade (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Cepas de *Lactobacillus fermentum* são encontradas com menor frequência no processo de fermentação de queijos, pois podem produzir sabores indesejáveis e gases durante o período de maturação (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

Cepas de *Lactobacillus* ssp. isoladas de queijos foram classificadas como rápidas no trabalho realizado por Ayad e colaboradores (2004), diferindo dos perfis de fermentação encontrados para *Lactobacillus* ssp. isolados do queijo Mussarela de búfala. Por outro lado, cepas de *Leuconostoc mesenteroides* foram isoladas e classificadas como lentas (Ayad et al.,

2004), semelhantes ao perfil de acidificação do *Leuconostoc mesenteroides* (cultura 55), isolado experimentalmente.

Linhagens de *Lactobacillus delbrueckii* cultivadas a 42 °C foram classificadas como rápidas por Ayad e colaboradores (2004), sendo esta a temperatura ótima de crescimento para a espécie, enquanto a cultura 76, isolada do queijo Mussarela de búfala e identificada como *Lactobacillus delbrueckii* foi classificada como lenta, sendo cultivada a 30 °C.

O potencial das cepas para utilização na produção de queijos se dá tanto em função da temperatura ótima de crescimento do micro-organismo, quanto às diferenças entre as cepas de mesma espécie (MAURICIO, 2003).

A cultura 57, identificada como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é classificada como lenta, mas acidificou o leite rapidamente no final da fermentação. Segundo Saccaro e colaboradores (2009), essa espécie é responsável pela pós-acidificação em leites fermentados. Em geral, em leites fermentados, como os iogurtes, utilizando co-culturas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, a fermentação é rápida até atingir pH 4,5. Neste caso, há uma protocoperação entre as espécies (SACCARO, 2008), onde *L. bulgaricus* hidrolisa as proteínas do leite liberando aminoácidos para o desenvolvimento de *S. thermophilus*.

A redução do pH no início da fermentação tem importância crucial para a fabricação de queijos, uma vez que é essencial para a coagulação e redução da microbiota contaminante (AYAD et al., 2004; ARAÚJO, 2008). Assim, cepas classificadas como rápidas são utilizadas como *starters* (BRIGGILER-MARCO; CAPRA; QUIBERONI, 2007), enquanto as lentas e médias podem ser utilizadas como parte de culturas secundárias, uma vez que a atividade acidificante excessiva pode causar acidificação exagerada do coágulo e alterar o teor de umidade do queijo (CROW et al., 2001). Além disso, por causa da baixa atividade acidificante, as cepas mais lentas podem ser combinadas com cepas comerciais para o preparo

de culturas *starters* definidas (AYAD et al., 2000). Assim, no caso de utilizar culturas mistas para a fabricação de queijo Mussarela, o ideal é utilizar o mínimo necessário para a obtenção do pH desejado no tempo requerido (MAURÍCIO, 2003).

#### 5.4.1 Determinação da atividade proteolítica

As culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem apresentaram halo de hidrólise em ágar leite, com exceção da cultura mesofílica 78 (Tabela 7).

**Tabela 7** - Atividade proteolítica das culturas ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala.

Codificação da cultura	Cultura	Meio de Cultivo	Diâmetro do halo Mm
3	Cocos	M17	10,66
5	Cocos	M17	14,50
14	Cocos	M17	13,83
17	Cocos	M17	10,50
20	Cocos	M17	12,66
25	Cocos	M17	12,50
26	Cocos	M17	13,66
28	Cocos	M17	11,33
29	Cocos	M17	12,00
65	Bacilos	M17	17,83
68	Cocos	M17	15,50
34	Bacilos	MRS	14,16
35	Bacilos	MRS	17,50
37	<i>L. casei</i>	MRS	16,16
42	<i>L. fermentum</i>	MRS	19,66
55	<i>L. mesenteroides</i>	MRS	11,16
56	Bacilos	MRS	12,00
57	<i>L. delb. subsp. bulgaricus</i>	MRS	11,66
76	<i>L. delbrueckii</i>	MRS	12,66
78	Cocos	MRS	Não formou halo

Média de duplicata.

A Figura 7 ilustra a formação de halo de hidrólise das culturas ácido-láticas proteolíticas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.



**Figura 7** - Formação de halo de hidrólise por culturas ácido-láticas proteolíticas.

O diâmetro do halo de hidrólise em ágar leite representando a atividade proteolítica das culturas variou entre 10,55 e 19,66 mm. Para cocos termófilos e bacilo mesófilo identificado como *Lactobacillus fermentum*, respectivamente.

De acordo com El-Gaish e colaboradores (2010), o ágar leite é um meio eficaz e rápido para detectar a atividade das proteases extracelulares produzidas por BAL. Assim, a atividade destas enzimas resulta na formação de halo de hidrólise ao redor da cepa inoculada.

A cultura 42, identificada como *Lactobacillus fermentum*, apresentou o maior halo de hidrólise entre as culturas isoladas neste trabalho, indicando uma maior atividade proteolítica.

Segundo El-Gaish e colaboradores (2010), a cepa de *Lactobacillus fermentum* IFO 3656 isolada de queijo, apresentou alta atividade proteolítica, mostrando um potencial de

hidrólise de 73 % da caseína total, sendo a  $\beta$ -caseína a mais hidrolisada revelada por SDS-PAGE.

A capacidade de produzir proteases extracelulares é uma característica muito importante de BAL (EL-GAISH et al., 2010). Estas proteases catalisam a hidrólise das proteínas do leite, fornecendo os aminoácidos essenciais para o seu crescimento (FIRA et al., 2001) e, conseqüentemente, altera a textura, sabor e aromas dos produtos fermentados (McSWEENEY; SOUSA, 2000; SHIHATA; SHAH, 2000).

No trabalho realizado por Franciosi e colaboradores (2008), o objetivo foi de formar culturas secundárias adjuntas (SAC) vinculada às características do produto final. As culturas NSLAB foram isoladas e caracterizadas pela capacidade acidificante e proteolítica. Desta forma, NSLAB com baixo potencial para acidificação e alta atividade proteolítica foram indicadas para compor estas culturas secundárias. Assim, as culturas que não apresentam alta atividade acidificante durante a fermentação, como as culturas 42 (*L. fermentum*) e 65, ambas isoladas do queijo Mussarela de búfala, podem ser indicadas para a fabricação de produtos lácteos por sua elevada atividade proteolítica.

Cepas distintas de lactobacilos presentes em queijos influenciam na produção de compostos voláteis resultante da atividade proteolítica (KLAYRAUNG et al., 2009).

Segundo Beresford e colaboradores (2004), em queijos, a proteólise primária é efetuada pela adição da quimosina e enzimas endógenas presentes no leite enquanto pequenos peptídeos e aminoácidos livres são liberados a partir da ação de BAL proteolíticas como proteólise secundária. Entretanto, a proteólise secundária contribui diretamente para o desenvolvimento de *flavours* nos queijos, principalmente pela liberação de aminoácidos precursores de aromas (YVON, 2006). Durante o período de maturação, a reação bioquímica

de proteólise é responsável pelas alterações de textura e sabor do requeijão e de queijos maturados (SHIHATA e SHAH 2000).

De acordo com Gerningon e colaboradores (2009), lactobacilos termófilos têm atividade proteolítica mais intensa que cocos termófilos, conforme observado neste trabalho. A cultura 65 (bacilo termófilo) isolada do queijo Mussarela de búfala apresentou halo de hidrólise maior que os cocos termófilos.

Entre os lactobacilos termófilos, *L. helveticus* é o mais proteolítico, seguido do *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (GERNINGON; SCHUCK; JEANTET, 2009). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* codifica uma variedade de enzimas capazes de hidrolisar as proteínas do leite (LIU et al., 2010). O conjunto destas enzimas o classifica como BAL proteolítica, podendo ser indicado para a produção de iogurtes, em co-cultura com *S. thermophilus* (SIEUWERTS et al., 2008). Também pode ser utilizado como cultura *starter* na produção de diversos produtos lácteos apresentando alta importância econômica (DE DEA LINDNER, 2008).

A cultura 55, identificada como *L. mesenteroides* apresenta baixa atividade proteolítica, indicada pela formação do halo de hidrólise em ágar leite, conforme relatado por Gonçalves (2009). O genoma deste micro-organismo codifica poucas enzimas proteolíticas, sendo que, linhagens desta espécie podem ou não expressar proteases extracelulares, dependendo da cepa (LIU et al., 2010). Em um trabalho realizado por GONZALEZ e colaboradores (2010), cepas de *Leuconostoc* GE 2002 apresentaram alta atividade proteolítica enquanto *Leuconostoc* GE 2068 apresentaram baixas.

A cultura 37, identificada como *L. casei* apresentou atividade proteolítica intermediária. Espécies de Lactobacilos, como *L. casei*, utilizadas como bactérias probióticas, possuem diversas enzimas proteolíticas e peptidolíticas com potencial para a hidrólise das



proteínas presentes no leite. *L. casei* subsp. *paracasei* são capazes de produzir aminopeptidases as quais possuem importante papel na hidrólise de peptídeos precursores de gosto amargo. Além disso, cepas com alta atividade de aminopeptidase podem aumentar a proteólise e melhorar o aroma dos queijos (GONZALEZ et al, 2010).

De acordo com Morea et al (1998), cepas de *L. casei* subsp. *casei* apresentam potencial proteolítico para a produção de queijo Mussarela de búfala. Assim, a cultura 37 (*L. casei*) isolada neste trabalho, que apresentou potencial proteolítico em ágar leite, pode ser indicada como cultura adjunta para a produção deste queijo.

Cepas distintas de *Lactobacillus casei* apresentam atividade proteolítica com variações significativas. Em um trabalho realizado por Guo et al. (2009), *L. casei* Shirota apresentou alta atividade proteolítica em um processo de fermentação de 24 h, enquanto *L. casei rhamnosus* apresentou baixa atividade, resultando na formação de 13,89 mmol/L e 2,247 mmol/L de aminoácidos livres, respectivamente.

A proteólise promovida pelas enzimas produzidas por BAL em derivados lácteos, como queijos e iogurtes, é um processo desejável (EL-GAISH et al., 2010). Adicionalmente, além da produção de características sensoriais, alguns peptídios formados podem ser considerados bioativos com função analgésica, anticarcinogênica e anti-hipertensivos (SMACCHI; GOBBETTI, 2000).

#### 5.4.2 - Utilização de citrato

Foi analisada a capacidade de metabolizar citrato pelas culturas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem. Todas as culturas testadas apresentaram a capacidade de utilizarem o citrato. Um exemplo do cultivo das BAL está ilustrado na Figura 8.



**Figura 8** - Imagem representando o cultivo de bactérias ácido-láticas capazes de utilizar o citrato.

As BAL capazes de utilizar o citrato apresentam interesse industrial para a fabricação de produtos que requeiram aromas e sabores particulares (MARTINEZ, 2005). Desta forma, as cepas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem, capazes de utilizar citrato, podem ser empregadas para a produção de aromas na fabricação de produtos fermentados.

Apesar de o citrato estar presente em baixos níveis no leite, este é o precursor de

vários compostos aromáticos importantes de algumas variedades de queijo (MARTINEZ, 2005). A metabolização do citrato pelas BAL (Figura 1, pág 40) pode resultar na produção de compostos como o acetato, formato, etanol, acetaldeído, acetoína, 2,3-butanediol, diacetil e dióxido de carbono.

Estes compostos contribuem para o desenvolvimento do *flavour* em alimentos fermentados e são produzidos em diferentes quantidades de acordo com a espécie e/ou a cepa, permitindo que a comunidade de BAL influencie significativamente na qualidade do produto (MAURIELLO et al., 2001).

O citrato pode ser metabolizado pelas bactérias homo e heterofermentativas. Entretanto, algumas BAL homofermentativas são capazes de produzir CO<sub>2</sub> a partir do uso de citrato. O CO<sub>2</sub> produzido pode ser responsável pela formação de olhaduras desejáveis em alguns queijos holandeses. Entretanto, pode afetar negativamente a textura de outras variedades de queijos (MARTINEZ, 2005).

A capacidade de metabolizar o citrato é amplamente disseminada entre as bactérias ácido-láticas, tais como *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *Oenococcus oeni* e espécies do gênero estreptococos, como *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (VANINGELGEM et al., 2006).

De acordo com Hemme e Foucaud-Scheunemann (2004), as culturas mistas de BAL mesófilas utilizadas como *starters* no processo de fermentação de vários queijos são compostas por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* e subsp. *cremoris*, responsáveis pela acidificação, e por cepas fermentadoras de citrato como *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e/ou espécies do gênero *Leuconostoc*, responsáveis pela produção de aromas. Segundo Martinez (2005), um dos principais papéis dos *Leuconostoc* spp. em produtos

fermentados é a produção de aromas como diacetil e acetato.

Algumas espécies do gênero *Enterococos* também são capazes de metabolizar citrato (CENTENO et al., 1996; ARAÚJO, 2003) produzindo os compostos acetaldeído e acetoína (COPPOLA et al., 1988; PARENTE et al., 1998). Segundo Williams e colaboradores (2000), é provável que o citrato seja catabolizado por culturas de *Lactobacillus* ssp. não *starters* embora não seja utilizado como fonte de energia por estes microrganismos.

#### **5.4.3- Produção de compostos voláteis**

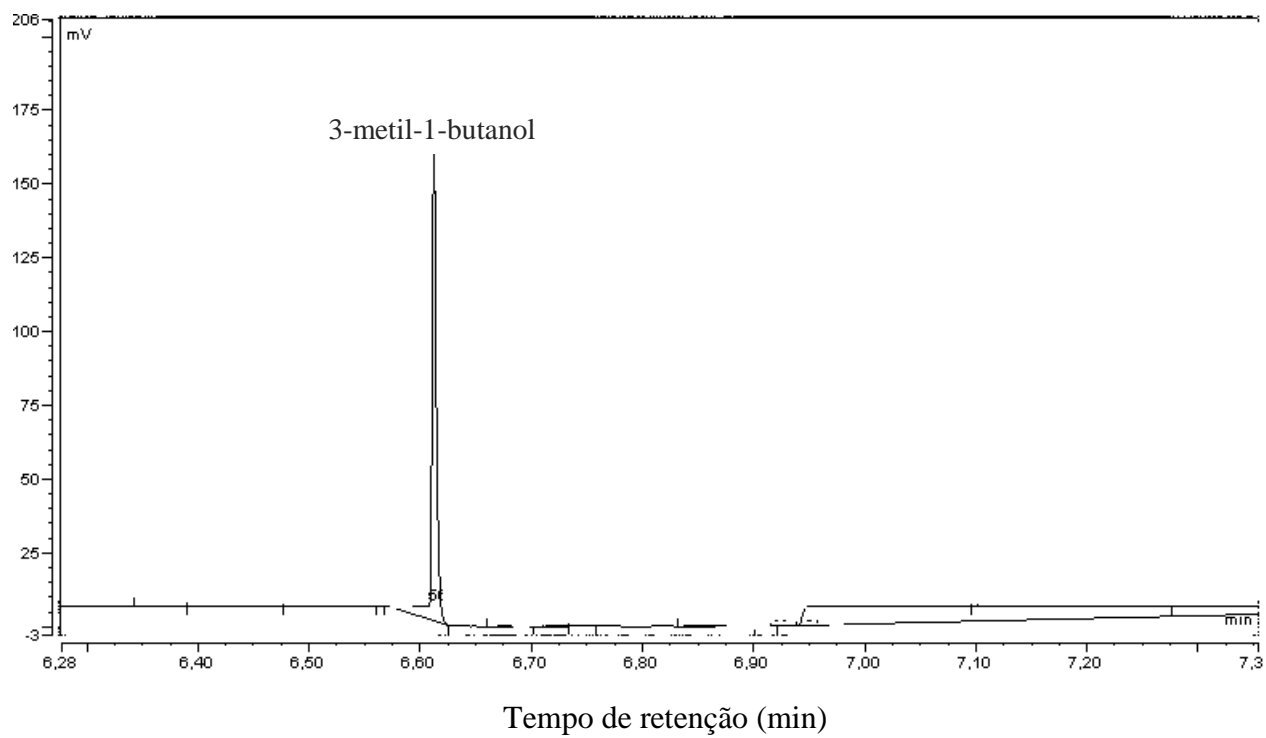
As culturas de BAL isoladas do queijo Mussarela de búfala, utilizadas na fermentação do leite de búfala foram capazes de produzir os compostos voláteis: acetona, acetaldeído, etanol, 3-metil-1-butanol, 3-hiroxi-2-butanona, ácido acético, além de vários outros compostos não identificados pelos padrões utilizados (Tabela 8).

**Tabela 8** - Compostos voláteis produzidos pelas bactérias ácido-láticas isoladas do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.

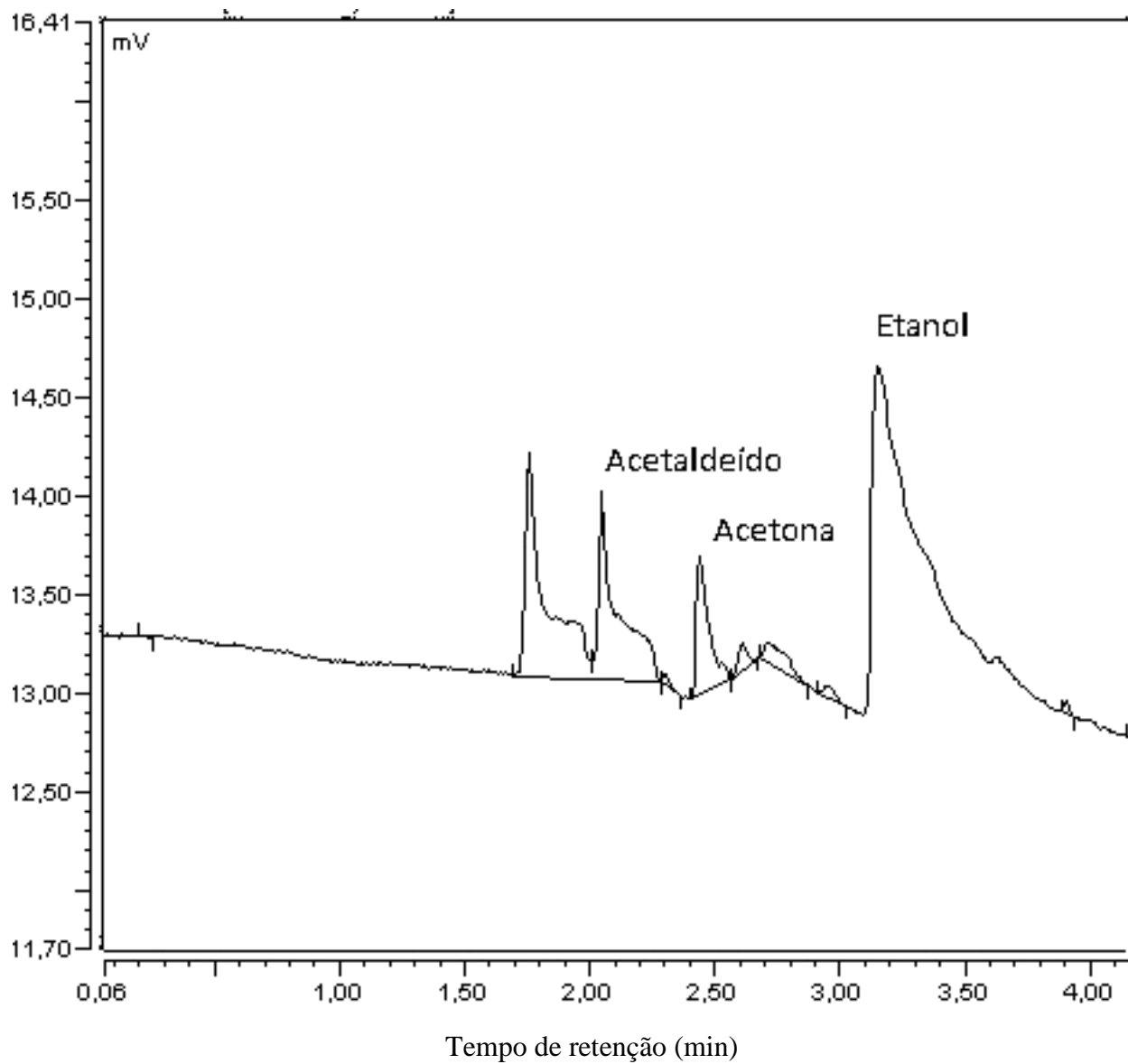
Codificação da cultura	Cultura	Meio de Cultivo	Compostos produzidos
3	Cocos	M17	3-metil-1-butanol
5	Cocos	M17	NI
14	Cocos	M17	NI
17	Cocos	M17	Acetona
20	Cocos	M17	NI
25	Cocos	M17	acetaldeído, acetona, etanol + NI
26	Cocos	M17	NI
28	Cocos	M17	3-hidroxi-2-butanona
29	Cocos	M17	acetona, etanol
65	Bacilos	M17	NI
68	Cocos	M17	NI
34	Bacilos	MRS	acetaldeído, acetona + NI
35	Bacilos	MRS	acetaldeído, acetona + NI
37	<i>L. casei</i>	MRS	NI
42	<i>L. fermentum</i>	MRS	NI
55	<i>L. mesenteroides</i>	MRS	ácido – acético + NI
56	Bacilos	MRS	acetaldeído, acetona, etanol
57	<i>L. delb.subsp. bulgaricus</i>	MRS	NI
76	<i>L. delbrueckii</i>	MRS	acetaldeído, acetona
78	cocos	MRS	NI

(NI) Compostos não identificados pelos padrões utilizados.

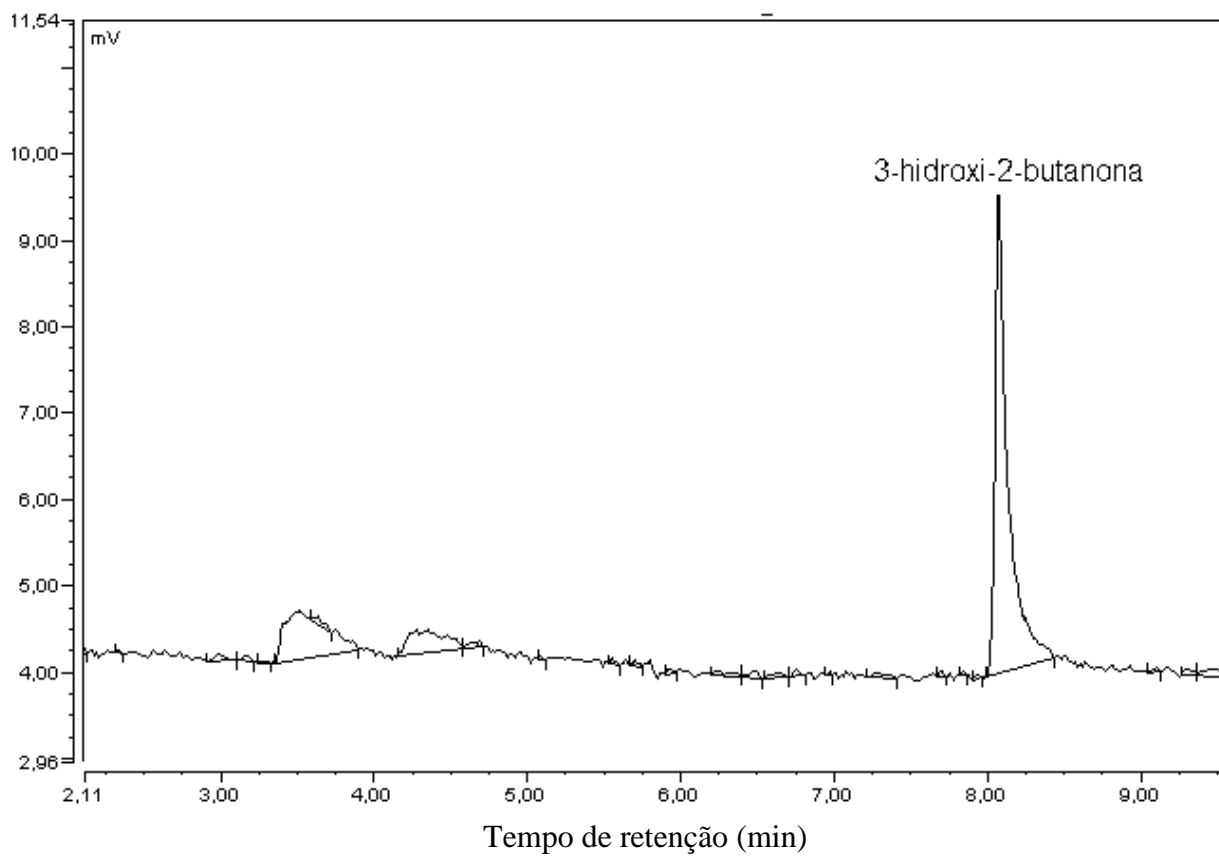
As Figuras de 9-12 ilustram o perfil de compostos voláteis produzidos pelas culturas isoladas. Houve muita variação entre os cromatogramas obtidos, demonstrando variação na conversão de compostos presentes no leite em compostos de aroma.



**Figura 9** - Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 3 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.

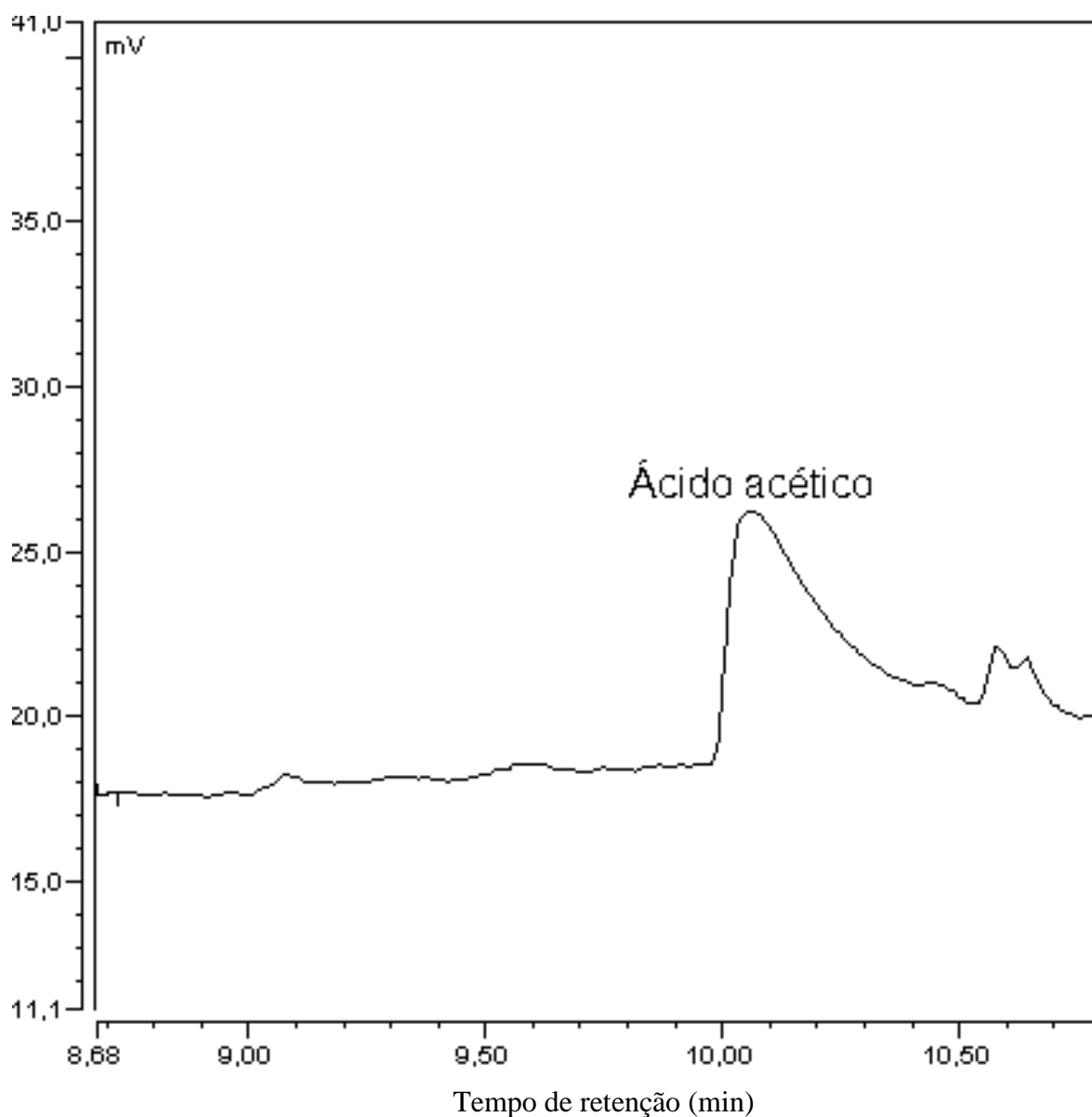


**Figura 10** - Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 25 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.

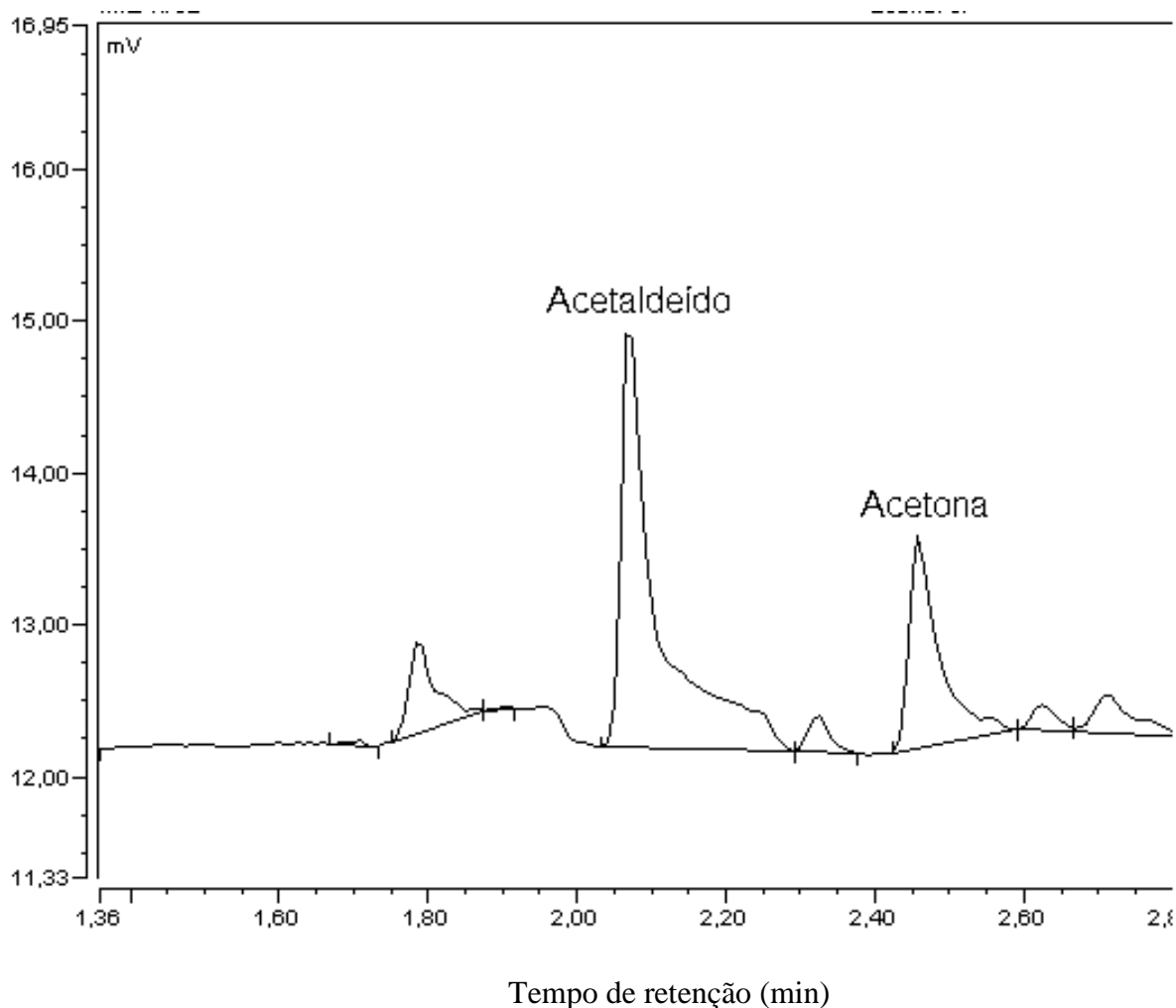


**Figura 11** - Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 28 isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.





**Figura 12** - Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 55 (*Leuconostoc mesenteroides*) isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.



**Figura 13** - Cromatograma representando os compostos produzidos pela cultura 76 (*Lactobacillus delbrueckii*) isolada do queijo Mussarela de búfala com 28 dias de estocagem.

Segundo Mauricio (2003), os principais compostos voláteis produzidos por BAL são: ácido fórmico, etanol, ácido acético, diacetil, acetoína e acetaldeído. Entretanto, dentre as BAL importantes para a produção de compostos aromáticos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* e o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* se destacam. Estas podem produzir grandes quantidades de diacetil e acetaldeído.

A formação dos compostos voláteis precursores de aromas pode ocorrer a partir do metabolismo da lactose, citrato, gorduras e da caseína presente no leite. Entretanto, BAL utilizada durante a fermentação de produtos lácteos é a principal fonte de enzimas envolvidas na formação destes compostos. Portanto, BAL *starters*, tais como *Lactococcus lactis*, espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus*, *Leuconostoc mesenteroides* e alguns lactobacilos mesófilos não *starters* são fontes de enzimas responsáveis pela formação de compostos *flavourizantes* (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

No caso da utilização dos carboidratos (citrato e lactose) por BAL para a formação de compostos voláteis, um conjunto de enzimas está envolvido, com a formação do piruvato, o qual é posteriormente metabolizado por diferentes vias, podendo resultar em aromas diferentes, tais como o diacetil, acetoína, acetaldeído, ácido acético, alguns dos quais contribuem para os típicos sabores de iogurte e queijos (MAURÍCIO, 2003; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

As BAL lipolíticas hidrolisam as gorduras presentes no leite resultando na formação de ácidos graxos livres, que podem produzir compostos precursores de sabor, como metilcetonas, álcoois secundários, ésteres e lactonas (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005). Entretanto, para um sabor específico, as BAL proteolíticas convertem estes compostos e a caseína em aminoácidos, resultando na formação de vários álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e enxofre (CURTIN et al., 2005).

O ácido acético e o etanol produzidos por BAL podem ser obtidos a partir da fermentação da lactose (ENGELS et al., 1997; SILVA, MORENO; VAN DENDER 2006).

O etanol, composto produzido por cepas termófilas e mesófilas isoladas nesse trabalho, pode fornecer o *flavour* de frutas e nozes, característico de alguns queijos. Entretanto, a presença de etanol não contribui diretamente para o desenvolvimento de aromas,

mas na formação de etil ésteres, responsáveis pelo aroma de queijos (RODRIGUEZ-ALONSO; CENTENO et al., 2009).

Em queijos Parmesão e Gruyère Suíço, o ácido acético produz sabor de vinagre, contribuindo para a obtenção do *flavour* característico (ENGELS et al., 1997). Desta forma, a cultura de *Leuconostoc mesenteroides* isolada do queijo Mussarela de búfala, produtora de ácido acético, apresenta potencial para a fabricação destes queijos. Entretanto, os relatos da literatura não citam esse micro-organismo como produtor de ácido acético.

A presença de alcoóis, como 3-metil-1-butanol, produzido pela cultura 3 isolada neste trabalho, resulta na produção de odores alcoólicos e de frutas, podendo ser responsável pelo aroma de queijos frescos (THIERRY, MAILLARD, 2002). Este composto pode ser produzido por espécies de *Lactococcus* e *Streptococcus thermophilus*, isoladas de diversos produtos lácteos e formado pela redução do seu aldeído correspondente, derivado da leucina (MOIO et al., 1993; ENGELS et al., 1997; MAURIELLO et al., 2001; MAURIELLO et al., 2003).

O acetaldeído está presente em vários produtos lácteos e é responsável pelo aroma característico do iogurte. Este aldeído é formado pela metabolização primária do etanol, na rota de conversão a ácido acético (MAURÍCIO, 2003). O *S. thermophilus* apresenta capacidade de produzir até 4 mg/mL de acetaldeído.

De acordo como Maurício (2003), cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* também produzem quantidades significativas de acetaldeído. Na forma de cultura pura, pode produzir excesso de acetaldeído, originando em aroma de iogurte nos queijos. Assim, uma opção para equilibrar a quantidade de acetaldeído em queijos é a associação de cepas de *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* capazes de consumir o acetaldeído.

Em queijos com aromas mais acentuados, como o parmesão, o *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* deve ser usado como co-cultura, pois, além de melhorar as características sensoriais é possível amenizar o escurecimento dos queijos por sua capacidade de metabolizar açúcares residuais (MAURÍCIO, 2003).

Segundo Rodriguez-Alonso, Centeno e Garabal, (2009), o composto 3-hidróxi 2-butanona (acetoína) é formado principalmente pelo metabolismo do citrato. Este composto, assim como as demais cetonas, geralmente são requeridas pelas indústrias lácteas, proporcionando aroma agradável em uma vasta gama de produtos lácteos, desempenhando importante papel no aroma de queijos não maturados (BRUNO, CARVALHO, 2009). Assim, a cepa termofílica isolada (cultura 28) produtora de acetoína e as outras cepas produtoras de acetona (culturas 17, 25, 29, 34, 35, 56 e 76) podem ser utilizadas com este propósito na indústria de alimentos fermentados.

Em queijos semi-duros produzidos com leite de cabra, culturas mistas contendo *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *L. paramesenteroides* apresentaram melhores atributos de sabor e aroma (Rodriguez et al.; 1997). O sabor do queijo Cheddar também foi mais acentuado com a adição de Lactobacilos não *starters* devido ao aumento da formação de alguns aminoácidos precursores de aromas (LYNCH et al., 1996).

Drake e colaboradores (1999) mostraram que diferentes cepas de *Lactobacillus* ssp. presentes em queijos influenciaram na produção de diferentes compostos voláteis, provavelmente em função da atividade proteolítica de cada cultura.

Seefeldt e Weimer (2000) analisaram os níveis e tipos de compostos voláteis sulfurados produzidos por Lactococcus e de Lactobacilos a partir da metionina e observaram diferenças entre as espécies e subespécies. Segundo Mauriello e colaboradores (2001),

compostos voláteis como 3-metil-1-butanol e 2-feniletanol foram produzidos por espécies puras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus*.

## 6 - CONCLUSÃO

Para os dois laticínios as BAL termofílicas prevaleceram sobre as mesofílicas, indicando que as culturas termofílicas são as principais envolvidas no processo de fabricação do queijo Mussarela de búfala, assim como no período de estocagem. De maneira geral os cocos termofílicos foram prevalentes.

As técnicas utilizadas para a identificação genotípica de BAL foram eficazes. A técnica de RAPD demonstrou ser reprodutiva permitindo visualizar a complexa ecologia das BAL presentes na matriz do queijo Mussarela de búfala por meio dos perfis dos *amplicons* e dos *clusters* obtidos. O seqüenciamento do gene 16S rRNA permitiu a identificação das culturas com boa similaridade daquelas depositadas no banco de dados.

As culturas lácticas 20, 37, 42 e 55 apresentaram potencial para aplicações tecnológicas, em função de a atividade acidificante ser semelhante a de culturas comerciais. As culturas lácticas mesofílicas 5, 20, 26 e 29 acidificaram rapidamente o leite de búfala durante o processo de fermentação. Portanto, apresentam potencial tecnológico como culturas *starters* na fabricação de queijos e leites fermentados.

Todas as culturas apresentaram capacidade de utilizarem o citrato e produção de aromas. Com exceção da cultura 78, todas as culturas apresentaram atividade proteolítica. De maneira geral, as culturas isoladas podem ser utilizadas para a produção *flavours* em derivados lácteos.

A cultura 42, identificada como *Lactobacillus fermentum* e a cultura 65 apresentaram alta atividade proteolítica, sendo indicadas para a fabricação de queijos maturados. De modo geral, os bacilos apresentaram maior atividade proteolítica em relação aos cocos.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDEO, F.; MERCIER, J.C.; RIBADEAU-DUMAS, B. The casein of buffalo milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 3, p. 455-468, 1980.

ADDEO, F.; EMALDI, G.; MASI, P. Tradition and innovation in the “Mozzarella di Bufala Campana, cheese” production. **Proceedings of the International Symposium on Buffalo Products**, Wageningen Press, The Netherlands, 23-40, 1996.

ALBENZIO, M.; CORBO, M. R.; REHMAN, S. U.; FOX, P. F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 35-48, 2001.

ALMEIDA, K. E.; TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. M. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 2, p. 672-678, 2009.

ANDRIGHETTO, C.; DE DEA, P.; LOMBARDI, A. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. **Research in Microbiology**, Paris, v. 149, n. 9, p. 631-643, 1998.

AQUILANTI, L.; SILVESTRI, G.; ZANNINI, E.; OSIMANI, A.; SANTARELLI, S.;



CLEMENTI, F. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 948-960, 2007.

ARAÚJO, T. F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. Viçosa, 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Viçosa.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS – ABCB. Estatísticas de produção de leite de búfala e mercado. 2009. [comunicação pessoal].

AYAD, E. H. E.; VERHEUL, A.; WOUTERS, J. T. M. SMIT, G. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 3, p. 169-179, 2000.

\_\_\_\_\_, E.H.E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 3, p. 715-725. 2004.

BANDELL, M.; LHOTTE, M.E.; MARTY-TEYSSET, C.; VEYRAT, A.; PRÉVOST, H.; DARTOIS, V.; DIVIÈS, C.; KONINGS, W.N.; LOLKEMA, J.S. Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc*

species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p.1594-1600, 1998.

BARUZZI, F.; MOREA, M.; MATARANTE, A.; COCCONCELLI, P. S. Changes in the Lactobacillus community during Ricotta Forte cheese natural fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford v. 89, n. 5, p. 807-814, 2000.

BASTIANETTO, E.; ESCRIVÃO, S. C.; OLIVEIRA, D. A. A. de. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 1, p. 49-52, 2005.

BEN AMOR, K.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 3, p. 741-747, 2007.

BENFELDT, C; SORENSEN, J. Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 3, p. 567-574, 2001.

BERESFORD, T,; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In Fox, P. F. McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M, Guinee, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3 ed. Amsterdam. Elsevier, p. 287-318, 2004.

BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; SIMEOLI, E.; ANDOLFI, R.; FRANCESCO VILLANI, COPPOLA, S. Monitoring lactic acid bacteria strains during ‘Cacioricotta’ cheese production

by restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 139-144, 2001.

BOTINA S. G.; TSYGANKOV, Y. D.; SUKHODOLETS, V. V. Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetics typing. **Russian Journal of Organic Chemistry**, New York, v. 42, n. 12, p. 1367-1379, 2006.

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.

BRIGGILER-MARCO, M; CAPRA, M. L; QUIBERONI, A, et al. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: In vitro characterization and performance in two model cheeses. **Journal of Dairy Science**, London, v. 90, n. 3, p. 4532-4542, 2007.

BROADBENT, J. R.; STEELE, J. L. Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. **American Society for Microbiology News**, Ann Arbor, v. 71, n. 3, p. 121-128, 2005.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota Láctica de Queijos Artesanais**, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE ISSN 1677-1915, 124 n 1. 2009. (EMBRAPA).

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDIA, G, F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 7-11, 2009.

CACHON, R.; DIVIES, C. A descriptive model for citrate utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.15, n. 8, p. 837 -842, 1993.

CAI, Y.; BENNO, Y.; TAKEDA, A.; YOSHIDA, T.; ITAYA, T.; NAKASA, T.  
Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1998.

CANCILLA, M. R.; POWELL, I.B.; HILLIER, A. J.; DAVIDSON, B. E. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with <sup>32</sup>P and fluorescent labels. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1772-1775, 1992.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CENTENO, J. A.; CEPADA, A. A.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L. Lactic acid bacteria isolated from Arzua cow's milk. **International Dairy Journal**, Barking, v.6, n. 1, p. 65-78, 1996.

\_\_\_\_\_, J.A.; TOMILLO, F.J.; FERNÁNDEZ-GARCÍA E.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of

ewes' raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3164-3172, 2002.

CHERIGUENE, A.; CHOUGRANI, F.; BEKADA, A. M. A.; EL SODA, M.; BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 15, p. 1854-1861, 2007.

COCCONCELLI, P. S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SENINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 376-379, 1995.

\_\_\_\_\_. PARIS, M. G.; SENINI, L.; BOTTAZZI, V. Use of RAPD and 16s rRNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 8-12, 1997.

COGAN, T.M. Flavor production by dairy starter cultures. **Journal of Applied Bacteriology**. Oxford, V.79, n. 24, p. 49-64, 1995.

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

\_\_\_\_\_, T. M.; BERESFORD, T. P.; STEEL, J.; BROADBENT, J.; SHAH, N. P.;

USTUNOL, Z. Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4005-4021, 2007.

COLLIN, S.; OSMAN, M.; DELCAMBRE, S.; EL-ZAYAT, A. I.; DUFOURT, J. P.

Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened domiati cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 10, p.1659-1663, 1993.

COPPOLA, S.; PARENTE, E.; DUMONTET, S.; LA PECCERELLA, A. The microflora of natural whey cultures utilized as starter in the manufacture of mozzarella cheese from water-buffalo milk. **Le Lait**, Les Ulis, v. 68, n. 8, p. 295-310, 1988.

\_\_\_\_\_, S.; VILLANI, F.; COPPOLA, R.; PARENTE, E. Comparison of different starter systems for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. **Le Lait**, Les Ulis, v. 70, n. 5-6, p. 411-423, 1990.

\_\_\_\_\_, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 414-420, 2001.

\_\_\_\_\_, S.; FUSCO, V.; ANDOLFI, R.; APONTE, M.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 73, n. 3, p. 264-272, 2006.

COPPOLA, R.; SUCCI, M.; SORRENTINO, E.; IORIZZO, M.; GRAZIA, L. Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise. **Le Lait**, Les Ulis, v. 83, n. 3, p. 211-222, 2003.

CORTEZ, M. A. S.; FURTADO, M. M.; GIGANTE, M. L.; KINDSTEDT, P. S. Effect of pH on characteristics of low-moisture Mozzarella cheese during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 443-448, 2008.

CROW, V. C.; COOLBEAR, T.; HOLLAND, R.; PRITCHARD G. G.; MARTLEY, F. G. Starters as finishers: starter properties relevant to cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 3, n. 4-6, p. 423-460, 1993.

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

CURTIN, A. C.; DE, A. M.; CIPRIANI, M.; CORBO, M. R.; MCSWEENEY, P. L. H.; GOBBETTI, M. Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: Selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 312-321, 2001.

DE ANGELIS, M.; DE CANDIA, S.; CALASSO, M. P.; FACCIA, M.; GUINEE, T. P.; SIMONETTI, M. C.; GOBBETTI, M. Selection and use of autochthonous multiple strain

cultures for the manufacture of high-moisture traditional Mozzarella cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 123-132, 2008.

DE CANDIA, S.; DE ANGELIS, M.; DUNLEA, E.; MINERVINI, F.; MCSWEENEY, P. L. H., FACCIA, M., GOBBETTI, M. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological properties of related traditional Mozzarella cheeses.

**International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 182-191, 2007.

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods: the case of Parmigiano Reggiano cheese.** 2008. 128p. Dissertation (Ph. D. in Food Science and Technology) - Università degli Studi di Parma, 2008.

DE SIMONE, C.; PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; STIUSO, P.; DICITORE, A.; VANACORE, D.; CHIANESE, L.; ADDEOA, F.; FERRANTI, P. Characterisation and cytomodulatory properties of peptides from Mozzarella di Bufala Campana cheese whey. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v. 15, n.3, p. 251-258, 2009.

DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 3. p. 809-812, 2004.

\_\_\_\_\_, F.; FELIS, G. E.; CASTIONI, A. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* isolated from Indian dairy products. **International Journal of Systematic and Evolutionary**



**Microbiology**, Reading, v. 55, n. 1, p. 401-404, 2005.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*.

**International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 3 p. 274-277, 2008.

DEMARIGNY, Y.; BEUVIER, E.; BUCHIN, S.; POCHET, S.; GRAPPIN, R. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. II. Biochemical and sensory characteristics. **Le Lait**, Les Ulis, v. 77, n. 1, p. 151-167, 1997.

DENIS, C.; GUEGUEN, M.; HENRY, E.; LEVERT, D. New media for the numeration of cheese surface bacteria. **Le Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 3 p. 365-379, 2001.

DEVRIESE, L. A.; POT, B.; VAN DAMME, L.; KERSTERS, K.; HAESEBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 187-197, 1995.

DIKES, G. A.; VON HOLY, A. Strain typing in the genus *Lactobacillus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 63-66, 1994.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 392-399, 2008.

DONKOR, O. N.; NILMINI, S. L. I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage.

**International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 6, p. 657-65, 2007.

DRAKE, M. A.; KARAGUL-YUCEER, Y.; CHEN, X. Q.; CADWALLADER, K. R.

Characterization of desirable and undesirable lactobacilli from cheese in fermented milk.

**Food Science and Technology**, London, v. 32, n. 7, p. 433- 439, 1999.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus virulens* determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and**

**Environmetal Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

EL-GHAISH, S.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, I.; SITOHY, M.; IVANOVA, I.;

HAERTLE, T.; CHOBERT, J. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum*

IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and**

**Technology**, Berlin, v. 230, n. 4, p. 635-643, 2010.

ENGELS, W. J.; DEKKER, R.; DE JONG, C.; NEETER, R.; VISSER, S. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese.

**International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 4, p. 255-263,1997.

ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis.

**Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 3, p. 199-202, 2001a.

\_\_\_\_\_. MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture dependent and culture independent approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 24, n. 4, p. 610-617, 2001b.

\_\_\_\_\_. MAURIELLO, G.; BLAIOTTA, G.; MOSCHETTI, G.; COPPOLA, S. PCR–DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 263-270, 2004.

FERNÁNDEZ, E.; ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic, genetic and technological characterization of *Lactococcus garvieae* strains isolated from a raw milk cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 3, 142-148, 2010.

FERRANTI, P.; SCALONI, A.; CAIRA, S.; CHIANESE, L.; MALORNI, A.; ADDEO, F. The primary structure of water buffalo  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -casein: Identification of phosphorylation sites and characterization of a novel  $\beta$ -casein variant. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 17, n. 8, p. 835-844, 1998.

FERREIRA, T. A.; GUINART, T. C.; LAICINI, Z. M.; MURTA, P. H. G. Características do leite de búfala e seus derivados, **Leite & Derivados**, v. 4, n. 22, p. 16-20, 1995.

FEURER, C.; IRLINGER, F.; SPINLER, H. E.; GLASER, P.; VALLAEYES, T. Assessment of the rind microbial diversity in a farm house-produced vs a pasteurized

industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods, **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 3, p. 179-189, 2004.

FIRA, D.; KOJIC, M.; BANINA, A.; SPASOJEVIC, I.; STRAHINIC, I.; TOPISIROVIC, L. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 123-130, 2001.

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 165-171, 2006.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CARLIN, S.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. A factory-scale application of secondary adjunct cultures selected from lactic acid bacteria during Puzzone di Moena cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 3, p. 2981-2991, 2008.

\_\_\_\_\_. SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FRANÇOISE, L. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 698-709, 2010.

FURTADO, M. M. Leite de búfala: Características e Fabricação de Queijos. EPAMIG

(Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), **Inst. de Laticínios, Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, 1990.

\_\_\_\_\_. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991.

\_\_\_\_\_. Efeito do teor de sal na maturação de um queijo por *Penicilium camembert*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 7, n. 224, p. 15-18, 1992.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 2, p. 89-95, 2009.

GATTI, M.; TRIVISANO, C.; FABRIZI, E.; NEVIANI, E.; GARDINI, F. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 182-190, 2004.

\_\_\_\_\_. DE DEA LINDNER, J; DE LORENTIIS, A.; BOTTARI, B.; SANTARELLI, M.; BERNINI, V.; NEVIANI, E. Dynamics of entire and lysed bacterial cells during parmigiano reggiano cheese production and ripening. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 19, p. 661-7, 2008.

GERNIGON, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Processing of Mozzarella cheese wheys and stretchwaters: A preliminary review. **Dairy Science and Technology**, Les Ulis, v. 92, n 11, p. 5371-5377, 2009.

GIRAFFA, G.; DE VECCHI, P.; ROSSI, P.; NICASTRO, G.; FORTINA, M. G. Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 411-416, 1998.

\_\_\_\_\_. ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 175-184, 2000.

\_\_\_\_\_. LAZZI, C.; GATTI, M.; ROSSETTI, L.; MORA, D.; NEVIANI, E. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein coding genes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 163-172, 2003.

\_\_\_\_\_. ANDRIGHETTOB, C.; ANTONELLOA, C.; GATTI, M.; LAZZI, C.; MARCAZZANB, G.; LOMBARDI, A.; NEVIANI, E. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 129- 139, 2004.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 175-187, 1997.

GONÇALVEZ, M.; FREITAS, R.; NERO, L. A.; CARVALHO, A. F. **Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril** (2009). 94p. Dissertação (Mestrado em segurança alimentar) – Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 5, p. 592-597, 2010.

GUO, Z.; WANG, J.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, X.; ZHANG, H. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1640-1646, 2009.

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.

HÉBERT, E. M.; RAYA, R. R.; TAILLIEZ, P.; GIORI, G. S. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 19-27, 2000.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 6, p. 467-494, 2004.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 343-362, 1995.

IMHOF, R.; BOSSET, J. O. Relationships between micro-organisms and formations of aroma compounds in fermented dairy products. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, Berlin, v, 198, n. 4, p. 267-276, 1994.

JANY, J. L.; BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 7, p. 839-848, 2008.

JUSTÉ, A.; THOMMA, B. P. H. J.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 6, p. 745-761, 2008.

KEMPLER, G. M.; MCKAY, L. L. Improved medium for detection of citrate-fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 926-927, 1980.

KLAYRAUNG, S.; OKONOZI, S. Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 757-766, 2009.



KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, vol. 2, 1984.

LANGA, S.; FERNANDEZ, A.; MARTIN, R. Differentiation of *Enterococcus faecium* from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains by pcr and dot-blot hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, vol. 88, n. 2, p. 197-200, 2003.

LAURIENZO, P.; MALINCONICO, M.; PIZZANO, R.; MANZO, C.; PICIOCCHI, N.; SORRENTINO, A.; VOLPE, M. G. Natural polysaccharide- based gels for dairy food preservation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 8, p. 2856-2864, 2006.

\_\_\_\_\_. MALINCONICO, M.; MAZZARELLA, G.; PETITTO, F.; PICIOCCHI, N.; STEFANILE, R.; VOLPE, M. G. Water buffalo mozzarella cheese stored in polysaccharide-based gels: correlation between prolongation of the shelf-life and physicochemical parameters. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 1317-1324, 2008.

LAZZI, C.; BOVE, C. G.; SGARBI, E.; GATTI, M.; LA GIOIA, F.; SANDRA, T.; NEVIANI, E. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 48-54, 2009.

LIU, S. Q. Review article: Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International journal of Food**

**Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 115-131, 2003.

LIU, M.; BAYJANOV, J. R.; RENCKENS, B.; NAUTA, A.; SIEZEN, R. J. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **BMC genomics**.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/36>. Acesso: 11:36 p 1-15, 2010.

LYNCH, C. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; COGAN, T. M.; DRINAN, F. D.

Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 8-9, p. 851-867, 1996.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.;

RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico - química e produção do leite de búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 1084-1088, 2001.

MANNU, L.; PABA, A. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 55-62, 2002.

MARILLEY, L.; CASEY, M. G. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 139-159, 2004.

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

MARTÍNEZ, J. I. S. **Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos**. 2005. 125p.Dissertation - Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC).

MAURICIO, A. Personalidade laticinista Saco Brasil. **Boletim de Tecnologia de Laticínios**, Campinas, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2003.

MAURIELLO, G.; MOIO, L.; MOSCHETTI, G.; PIOMBINO, P.; ADDEO, F.; COPPOLA, S. Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 928-942, 2001.

\_\_\_\_\_. MOIO, L.; GENOVESE, A.; ERCOLINI, D. Relationships between flavouring capabilities, bacterial composition and geographical origin of natural whey cultures (NWCs) used for traditional water-buffalo mozzarella cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. p. 486-497, 2003.

MCCARTNEY A. L. Application of molecular biological methods for studying probiotic santhe gut flora. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 29-37, 2002.

MCSWEENEY, P.L.H.; SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening a review. **Le Lait**, Les Ulis, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000.

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

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of digest diseases**, Fort Wayne, v. 8, n. 4, p. 190-198, 2008.

MOREA, M.; BARUZZ, F.; CAPP, F.; COCCONCELLI, P. S. Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 53-60, 1998.

\_\_\_\_\_. BARUZZI, F.; COCCONCELLI, P. S. Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 574-582, 1999.

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

MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F.; COPPOLA, S. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 422-424, 2000.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 3, p. 13-126, 1999.

NEVIANI, E.; DE DEA LINDNER.; BERNINI, V.; GATTI, M. Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 3, p. 240-245, 2009.

NORNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C. BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2009.

O`SULLIVAN, L.; ROSS, R.; PHILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacterial for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

OGIER, J. C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p.

3691-3701, 2002.

OTTOGALLI, G. A global comparative method for the classification of world cheeses (with special reference to microbiological criteria). Revised Edition. **Annals of Microbiology**, Milao, v. 50, n. 2, p. 151-155, 2000.

PARAMITHIOTIS, S.; TSIASIOTOU, S.; DROSINO, E.H. Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 231, n. 6, p. 883-890, 2010.

PARENTE, E.; ROTA M.A.; RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 12, p. 775-783, 1997.

\_\_\_\_\_. MOSCHETTI, G.; COPPOLA, S. Colture starter per la produzione di Mozzarella Review. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 48 n. 1, p. 89-109, 1998.

PEREZ, G.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Technological characterization of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 537-546, 2003.

PIRAINO, P.; ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; McSWEENEY, P. L. H.; PARENTE, E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from

pasta filata cheeses: A multivariate screening study. **International Dairy Journal**. Barking, v. 18, n. 1, p. 81-92, 2008.

PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.;  
Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats'milk  
cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v. 132, n. 3, p. 24-32,  
2009.

POGACICI, T.; KELAVA, N.; ZAMBERLIN, S.; DOLENCIC- SPHEAR.; SAMARIJA, D.  
Methods for culture-independent identification of lactic acid bacteria in dairy products. **Food  
Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 3-10, 2010.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPPÀ, F.; CONCCONCELLI, P.S. Indigenous raw milk  
microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural  
park. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 92, n. 2, p. 141-151,  
2004.

PRIETO, B; FRANCO, I; PRIETO, J. G; BERNARDO, A; CARBALLO, J. Proteolytic and  
lipolytic changes during the ripening of León raw cow's milk cheese, a Spanish traditional  
variety. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 661-  
671, 2002.

RAMOS, A.; POOLMAN, B.; SANTOS, H.; LOLKEMA, J.S.; KONINGS, W.N. Uniport of  
anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generate a proton motive force

in *Leuconostoc oenos*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 16, p. 4899-4905, 1994.

RANDAZZO, C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 1-9, 2009.

\_\_\_\_\_. COCOLIN, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 255-267, 2006.

\_\_\_\_\_. URSO, R.; DOLCI, P.; COMI, G.; COCOLIN, L. . Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 36-42, 2008.

RODRÍGUEZ, J.; REQUENA, T.; VALERO, E.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; LOPEZ-FANDINO, R.; JUA´REZ, M. Proteolysis and volatile components of reduced fat cheeses made from ultrafiltered milk and different starters supplemented with lactobacilli and *Lac<sup>-</sup> Prt<sup>-</sup>* lactococci. **Le Lait**, Les Ulis, v. 77, n. 6, p. 717-728, 1997.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; CENTENO, J. A.; GARABAL, J. I. Comparison of the volatile profiles of Arzúa-Ulloa and Tetilla cheeses manufactured from raw and pasteurized milk. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1722-1728, 2009.



ROY, D.; WARD, P.; VINCENT, D.; MONDOU, F. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. **Current Microbiology**, New York, v. 40, n. 1, p. 40-46, 2000.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008. 119p. Dissertação. (Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, 2008.

\_\_\_\_\_. TAMIME, A. Y.; PILLEGGI, A. L. O.; OLIVEIRA, M. N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 °C. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon; v. 62, n. 3, p. 397-404, 2009.

SAMARŽIJA, D.; LUKAČ HAVRANEK, J.; ANTUNAC, N.; SIKORA, S. Characteristics and Role of Mesophilic Lactic Cultures. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2001.

SANBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 8<sup>a</sup> ed. New York, USA. CSHL Press. p. 8.25 a 8.27. 2001.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 394-406, 2006.

SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; DE VOS, W.M. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p. 204-211, 2005.

SEEFELDT, K. E.; WEIMER, B. C. Diversity of sulfur compound production in lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p. 2740- 2746, 2000.

SHIHATA, A.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 5-6, p. 401-408, 2000.

SIEUWERTS, S.; DE BOK, F. A.; HUGENHOLTZ, J.; VAN HYLCKAMA VLIEG J. E. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics. approaches. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 16, p. 4997-5007, 2008.

SILVA, T.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F. Principais transformações químicas que influenciam o “flavour” e a textura dos queijos maturados. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, ano 10, n. 61, p. 58-63, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 3<sup>a</sup>. ed. P. 552, 2007.

SMACCHI, E; GOBBETTI, M. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 2, p. 129-141, 2000.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

STEELE, J. L.; BUDINICH, M. F.; CAI, H.; CURTIS, S. C.; BROADBENT, J. R. Diversity and metabolic activity of *Lactobacillus casei* in ripening Cheddar cheese. **Australina Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 61, n. 2, p. 53-60, 2006.

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

TAYLOR, J. W.; GLEISER, D. M.; BURT, A.; KOFOPANOU, V. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 126-146, 1999.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n. 2, p.96-100, 2005. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br).

THIERRY, A.; MAILLARD, M. B. Production of cheese flavor compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. **Le Lait**, Les Ulis, v. 82, n. 1, p. 17- 32, 2002.

TONHATI, H.; MUÑOZ, F. C.; OLIVEIRA, J. A. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2051-2056, 2000.

VALERIO, H. M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 174-178, 2006.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VANINGELGEM, F.; GHIJSELS, V.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Cometabolism of citrate and glucose by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in the absence of cellular growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 1, p. 319-326, 2006.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 37-44, 2001.

VILLANI, F.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPP, S. Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n. 5, p. 578-588, 2008.

WALTERS, J.; TANNOCK, G. W.; TILSAL-TIMISIARVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D. M.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 297-303, 2000.

WILLIAMS, A. G.; S. E. WITHERS, S. E.; BANKS, J. M. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 1-2, p. 17-23, 2000.

WOOLFSHOON-POMBO, A. F. Composição físico-química do leite de vaca e de cabra na microrregião do Vale do Paraíba. **Boletim do Leite**, Viçosa, v. 59, n. 53, p. 1-30, 1978.

WOUTERS, J. T.; AYAD, E. H.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 2-3, p. 91-109, 2002.

ZAGO, M.; BONVINI, B.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 32, n. 7, p. 514-521, 2009.

YVON, M. Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 61, n. 2, p. 16-24, 2006.

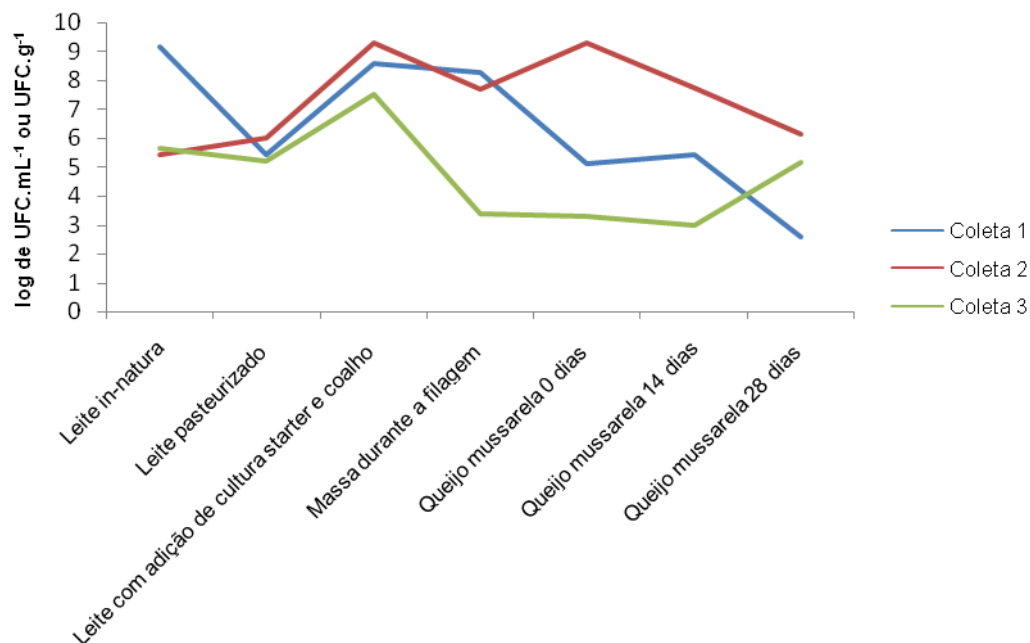
ZICARELLI, L. Buffalo Milk: Its properties, dairy yield and Mozzarella production.

**Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 127-135, 2004.

## ANEXOS

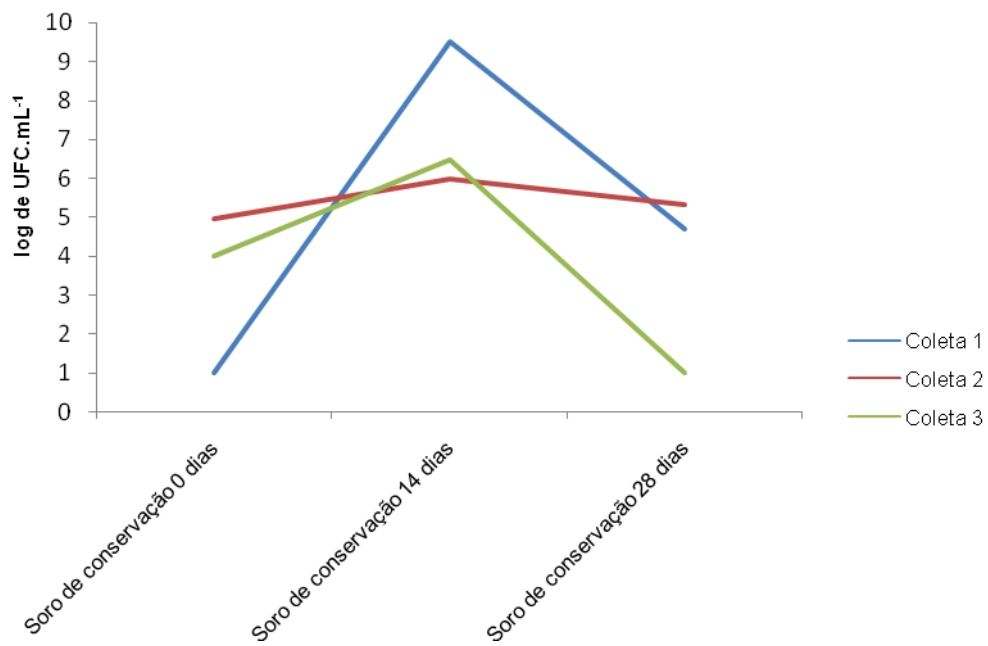
Métodos	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Amostras	Referências
DGGE (PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e TTGE (PCR-Temporal Temperature Gradient Electrophoresis)	DGGE - desnaturantes químicos em gel de acrilamida como gradiente de desnaturação linear a uma temperatura constante, entre 55 e 65°C; TTGE – a desnaturação é obtida pela variação da temperatura ao longo do tempo sem o uso de produtos químicos.	Estas técnicas permitem o monitoramento das mudanças da comunidade microbiana.	Diferenças nos resultados para a amplificação da região variável do gene 16S rRNA e/ou para ampliação da mesma região com diferentes <i>primers</i> universais; Problemas com a reprodutibilidade para os <i>amplicons</i> na PCR; Dificil a padronização do marcador.	Queijos	JANY; BARBIER, (2008); POGACIC et al. (2010); RANTSIOU; CONCOLIN, (2006)
RT (reverse-transcribed)	RT-PCR-DGGE (baseado no RNA) e PCR-DGGE (baseada no DNA).	Métodos utilizados para estudos da dinâmica populacional possibilitando saber os grupos microbianos ativos presentes nas diferentes etapas e períodos de maturação.	Sensibilidade do RNA e problemas para a detecção da microbiota minoritária.	Queijos	POGACIC et al. (2010)
SSCP-PCR (Single-Strand Conformation Polymorphism-PCR)	PCR usando gel de acrilamida ou um sequenciador automatizado com separação do gradiente por capilaridade. Utiliza-se <i>primers</i> universais ou mesmo <i>primers</i> para diferentes regiões do gene 16S rRNA.	Permite o monitoramento da complexa comunidade microbiana em queijos artesanais.	Problemas para a detecção da microbiota minoritária.	Queijos artesanais.	FEURER et al. (2004)
FISH (Fluorescence in situ hybridization)	Uso de sondas fluorescentes marcadas que se hibridizam às partes do cromossomo em que a seqüência apresenta alto grau de similaridade.	Permite verificar a distribuição espacial dos micro-organismos. É uma técnica capaz de identificar e quantificar os micro-organismos.	Auto - custo.	Queijos.	POGACIC et al. (2010)
qPCR (real time PCR)	Monitoramento da amplificação do DNA alvo em tempo real. O qPCR	Rápido, sensível e quantitativo. Possibilita a detecção do produto da PCR sem a necessidade de um pós-processamento, como PCR em gel ou eletroforese capilar.	Sensibilidade do RNA.	Queijos e iogurtes.	ZAGO et al. (2009)
T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e LH-PCR (Length Heterogeneity PCR)	T-RFLP - Técnica baseada nas variáveis do gene 16S rRNA, analisando o polimorfismo de diferentes genes, usando enzimas de restrição. LH-PCR - Usa enzima de restrição, com o objetivo de distinguir diferentes organismos com base nas variações no tamanho das seqüências de 16S rRNA.	Métodos rápidos, sensíveis e reprodutivos, capazes de detectar a dinâmica e as variações da comunidade microbiana	Dificuldade para estimar o número de espécies presentes na amostra.	Iogurtes e queijos recém processados e período de maturação.	RANDAZZO; CAGGIA; NEVIANI, (2009); POGACIC et al. (2010)

**Anexo 1-** Metodos independentes de cultivo utilizados para a identidicacao de bacterias acido-laticas.

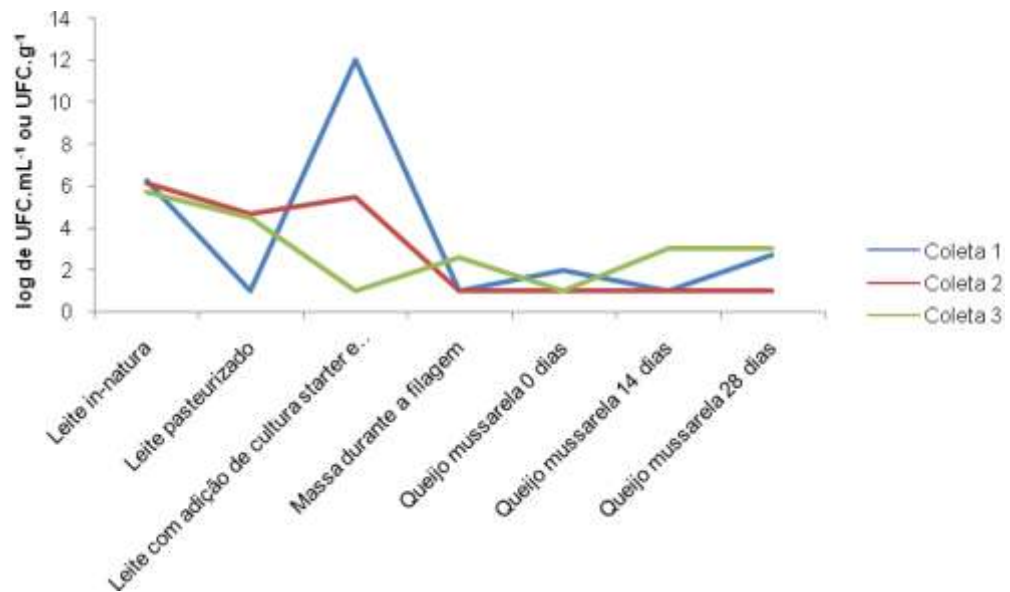


**Anexo 2** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do Laticínio A durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem. As amostras foram cultivadas em agar M17 acrescido de 10% de lactose e 10% de soro de fabricação (M17<sub>s10%</sub>) em aerobiose, a 42°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup> para amostras líquidas e por log de UFC. g<sup>-1</sup> para as amostras sólidas.

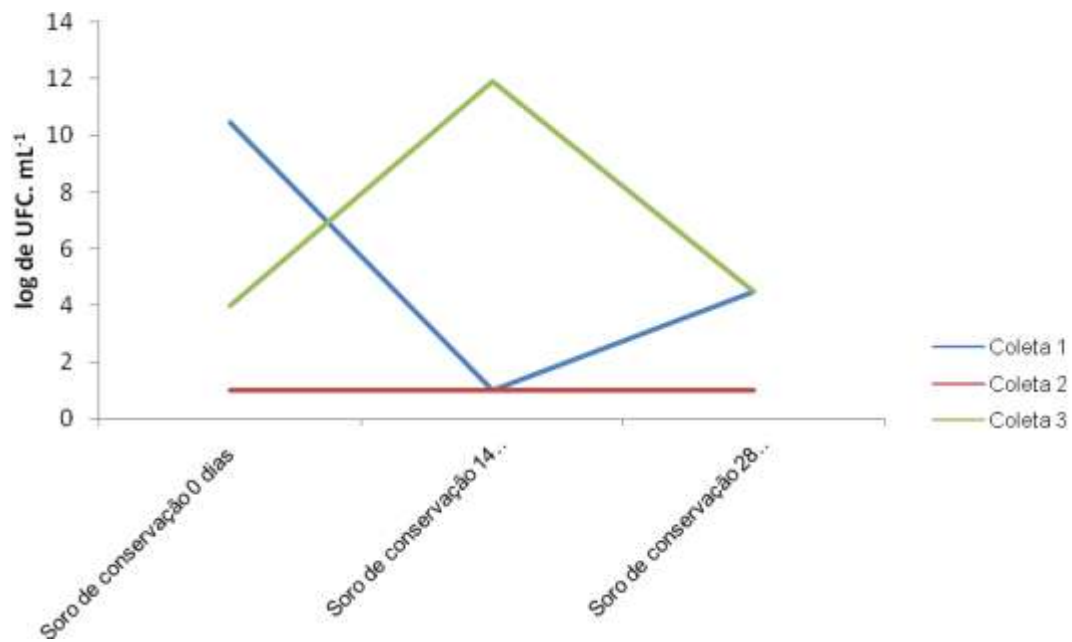




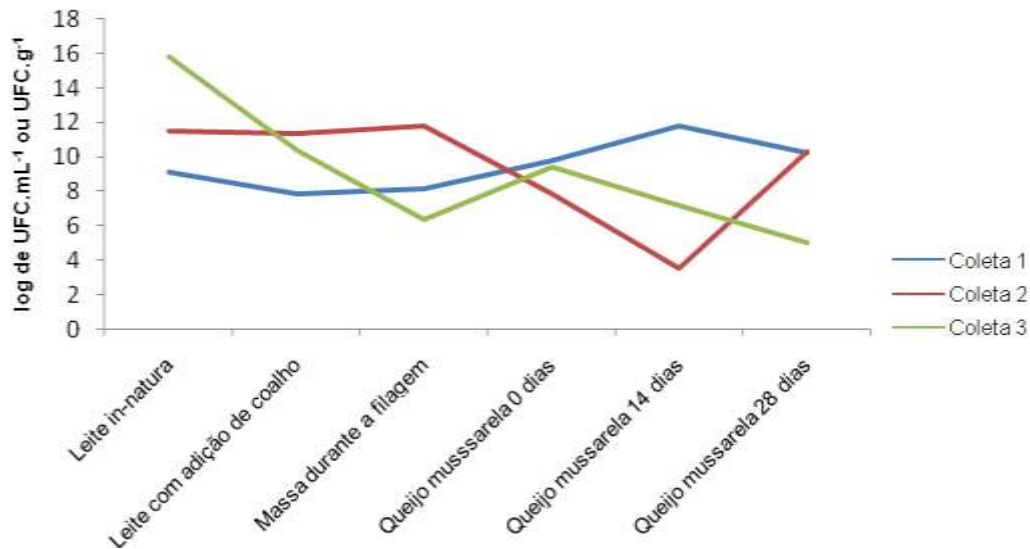
**Anexo 3** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do soro de conservação no tempo zero e período de estocagem (Laticínio A). As amostras foram cultivadas em agar M17 acrescido de 10% de lactose e 10% de soro de fabricação (M17<sub>s10%</sub>) em aerobiose, a 42°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup>



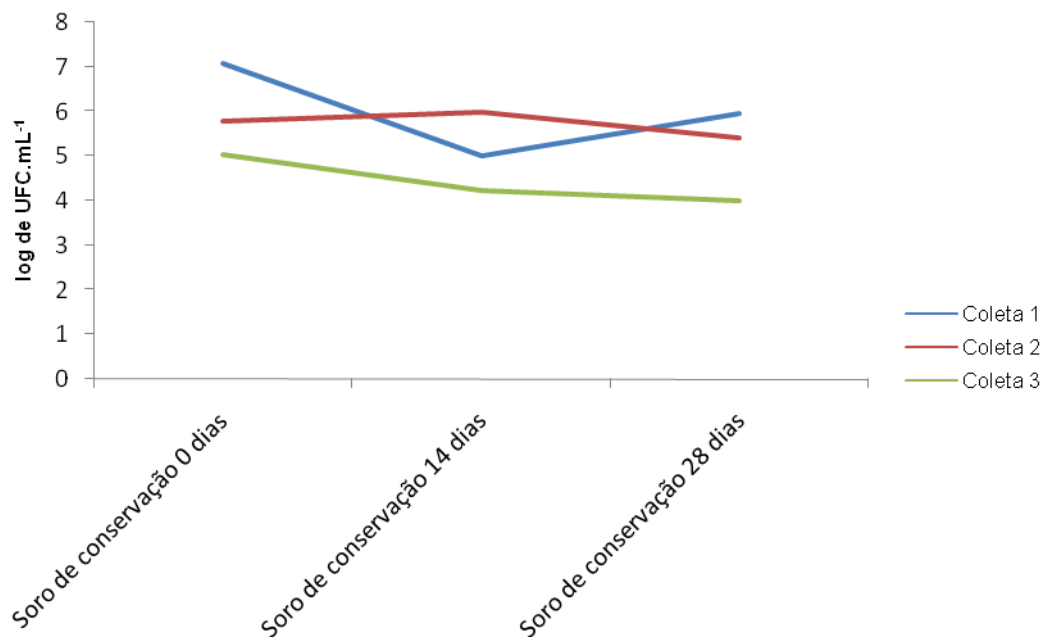
**Anexo 4** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do Laticínio A durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem. As amostras foram cultivadas em agar MRS acidificado até pH 5,4, em anaerobiose, a 30°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup> para amostras líquidas e por log de UFC. g<sup>-1</sup> para as amostras sólidas.



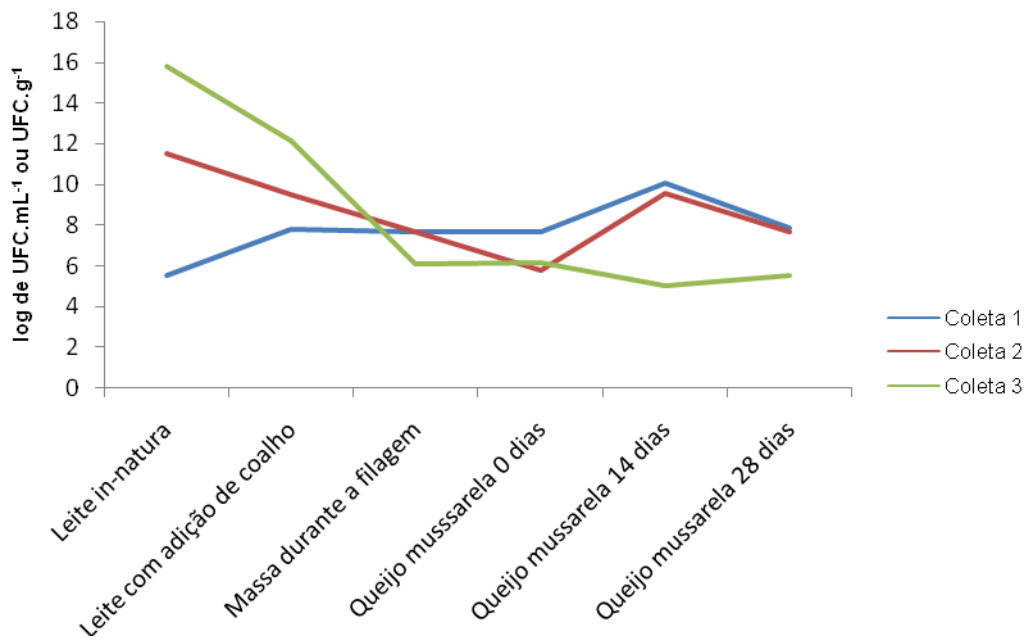
**Anexo 5** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem (Laticínio A). As amostras foram cultivadas em agar MRS acidificado até pH 5,4, em anaerobiose, a 30°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup>.



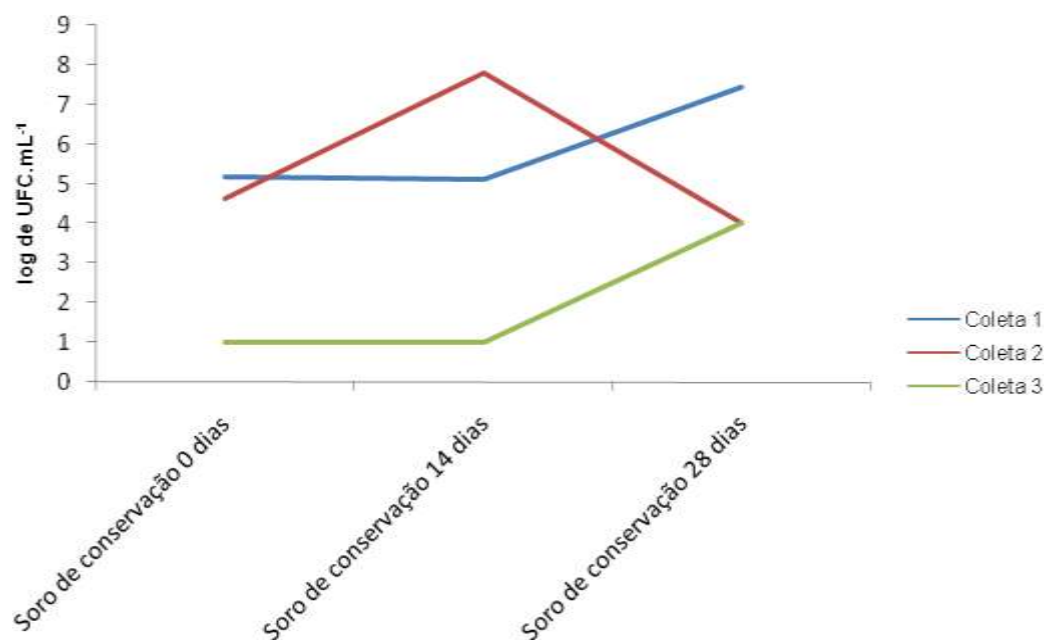
**Anexo 6** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do Laticínio B durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem. As amostras foram cultivadas em agar M17 acrescido de 10% de lactose e 10% de soro de fabricação (M17<sub>s10%</sub>) em aerobiose, a 42°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup> para amostras líquidas e por log de UFC. g<sup>-1</sup> para as amostras sólidas.



**Anexo 7** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do soro de conservação no tempo zero e período de estocagem (Laticínio B). As amostras foram cultivadas em agar M17 acrescido de 10% de lactose e 10% de soro de fabricação (M17<sub>s10%</sub>) em aerobiose, a 42°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup>.



**Anexo 8** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas do Laticínio B durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem. As amostras foram cultivadas em agar MRS acidificado até pH 5,4, em anaerobiose, a 30°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup> para amostras líquidas e por log de UFC. g<sup>-1</sup> para as amostras sólidas.



**Anexo 9** - Avaliação dos micro-organismos viáveis, provenientes das amostras coletadas durante o processamento do queijo Mussarela de búfala e período de estocagem (Laticínio B). As amostras foram cultivadas em agar MRS acidificado até pH 5,4, em anaerobiose, a 30°C por 48 horas. Os resultados estão expressos por log de UFC. mL<sup>-1</sup>.

Cluster	Codificação da Amostra	Meio de Cultivo	Identificação das Amostras	
			Coleta	Dia de Processamento
I	A 06	M17	1	RP
	A 08	M17	1	RP
	A 10	M17	3	RP
	A 13	M17	1	14 d
	A 14	M17	1	28 d
	A 15	M17	3	RP
	A 18	M17	2	RP
	A 19	M17	1	RP
	A 21	M17	1	28 d
	A 22	M17	3	14 d
	A 20	M17	1	28 d
II	A 05	M17	3	28
	A 12	M17	1	RP
	A 24	M17	3	RP
	A 59	MRS	2	28 d
	A 26	M17	1	28 d
III	A 29	M17	2	28 d
	A 07	M17	2	RP
IV	A 09	M17	2	RP
	A 25	M17	2	28 d
V	A 58	MRS	2	28 d
	A 67	M17	2	14 d
VI	A 70	M17	2	RP
	A 02	M17	3	14 d
VII	A 04	M17	1	14 d
	A 17	M17	3	28 d
	A 79	M17	2	14 d
	A 69	M17	1	14 d
	A 71	M17	3	RP
	A 72	M17	3	RP
VIII	A 46	MRS	1	14 d
	A 47	MRS	1	14 d
	A 68	M17	3	28 d
	A 42 <i>L. fermentum</i>	MRS	3	28 d
	A 43	MRS	3	14 d
	A 41	MRS	1	28 d
	A 32	MRS	3	14 d
	A 81	MRS	1	14 d
	A 36	MRS	2	14 d
	A 40	MRS	3	14 d
	A 60	MRS	3	14 d
	A 73	M17	3	RP
	A 74	M17	3	14 d
	A 35	MRS	2	28 d



Cluster	Codificação da Amostra	Meio de Cultivo	Identificação das Amostras	
			Coleta	Dia de Processamento
IX	A 37 <i>L. casei</i>	MRS	1	28 d
	A 61	MRS	1	14 d
	A 38	MRS	3	RP
	A 48	MRS	2	RP
X	A 51	MRS	1	RP
	A 52	MRS	2	RP
	A 80	MRS	1	RP
XI	A 33	MRS	2	14 d
	A 34	MRS	1	28 d
	A 31	MRS	2	14 d
	A 63	MRS	2	14 d
	A 64	MRS	2	14 d
	A 54	MRS	1	28 d
	A 55 <i>L. mesenteroides</i>	MRS	1	28 d
	A 44	MRS	2	14 d
	A 78	MRS	1	28 d
	A 16	M17	1	RP
	A 53	MRS	2	14 d
	A 01	M17	1	14 d
A 23	M17	1	14 d	
A 30	MRS	1	14 d	
A 39	MRS	1	RP	
A 66	MRS	1	14 d	
A 03	M17	3	28 d	
A 62	MRS	2	14 d	
A 11	M17	3	RP	
A 82	M17	3	RP	
XII	A 27	M17	2	28 d
	A 28	M17	2	28 d
XIII	A 56	MRS	3	28 d
	A 49	MRS	3	RP
	A 50	MRS	1	RP
	A 57 <i>L. delb. subsp. bulgaricus</i>	MRS	3	28 d
	A 76 <i>L. delbrueckii</i>	MRS	3	28 d
	A 45	MRS	3	14 d
	A 65	M17	3	28 d
75	M17	2	14 d	
77	M17	2	14 d	

\*A – Amostra; RP – Queijo Mussarela recém processado; 14 d – Queijo Mussarela com 14 dias de processamento; 28 d – Queijo Mussarela com 28 dias de processamento

**Anexo 10** - Coletas e culturas representadas pelos clusters no dendrograma.