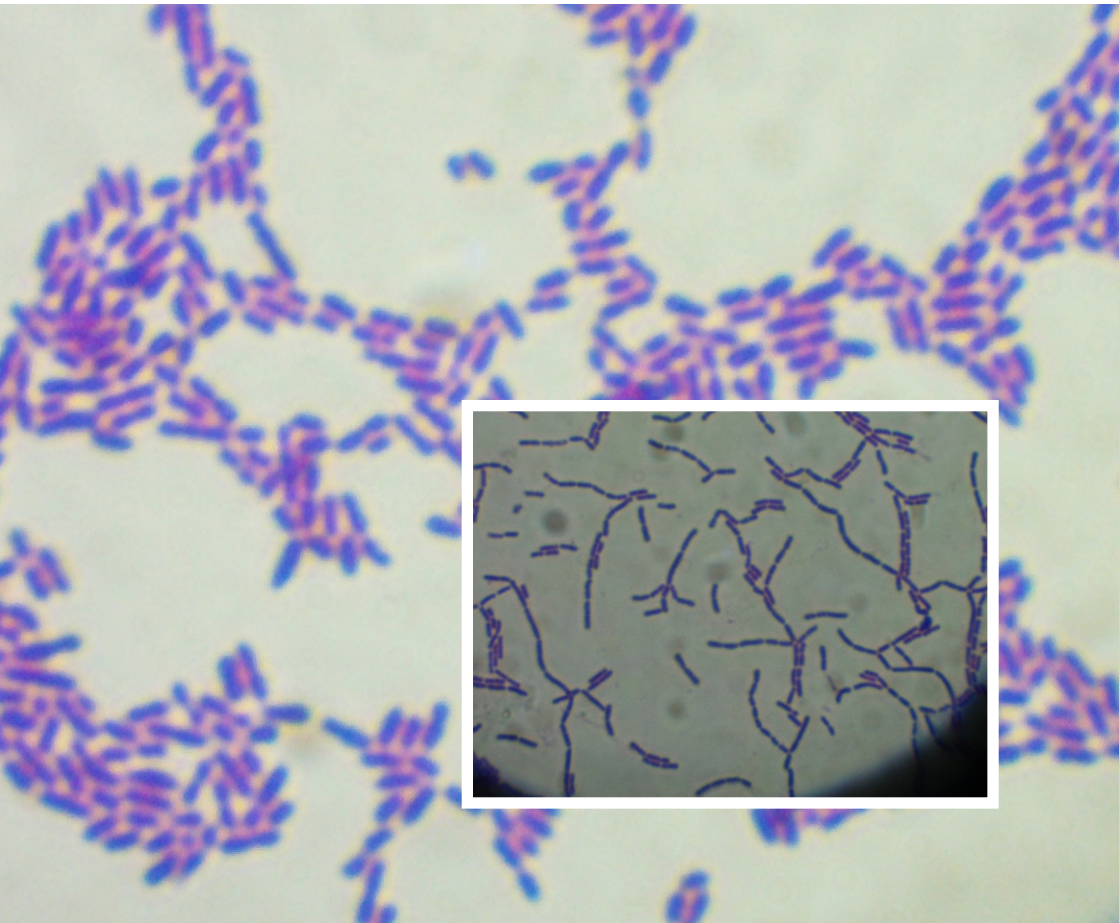


**Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo Coalho**



ISSN 1679-6543

Novembro, 2011

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

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 48***

## **Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo Coalho**

*Laura Maria Bruno*

*Ana Amélia Martins de Queiroz*

*Ana Karine Furtado de Carvalho*

*Evânia Altina Teixeira de Figueiredo*

Embrapa Agroindústria Tropical  
Fortaleza, CE  
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroindústria Tropical**

Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (85) 3391-7100

Fax: (85) 3391-7109

Home page: [www.cnpat.embrapa.br](http://www.cnpat.embrapa.br)

E-mail: [vendas@cnpat.embrapa.br](mailto:vendas@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior*

Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*

Membros: *Diva Correia, Marlon Vagner Valentim Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley Herbster Moura*

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*

Editoração eletrônica: *Ariilo Nobre de Oliveira*

Fotos da capa: *Francisca Samara Assunção de Oliveira e Francisco Wellington Pereira da Silva*

**1ª edição** (2011): on-line

**Todos os direitos reservados**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

Caracterização molecular de bactérias lácticas endógenas de queijo coalho / Laura Maria Bruno... [et al.]. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

20 p.; 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 48).

1. Bactérias ácido-láticas. 2. Produtos lácteos. 3. *Lactobacillus*. I. Bruno, Laura Maria. II. Queiroz, Ana Amélia Martins de. III. Carvalho, Ana Karine Furtado de. IV. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira de. V. Série.

CDD 579.355

---

© Embrapa 2011

# Sumário

|                              |    |
|------------------------------|----|
| Resumo .....                 | 5  |
| Abstract .....               | 7  |
| Introdução .....             | 9  |
| Material e Métodos .....     | 10 |
| Resultados e Discussão ..... | 13 |
| Conclusão .....              | 18 |
| Agradecimentos .....         | 19 |
| Referências .....            | 19 |

# Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo Coalho

---

*Laura Maria Bruno*<sup>1</sup>

*Ana Amélia Martins de Queiroz*<sup>2</sup>

*Ana Karine Furtado de Carvalho*<sup>3</sup>

*Evânia Altina Teixeira de Figueiredo*<sup>4</sup>

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar por PCR espécie-específica bactérias ácido-lácticas (BAL) isoladas de leite, coalhada e queijos coalho artesanais produzidos no Estado do Ceará. Quarenta e quatro cepas de BAL foram utilizadas neste estudo. Elas tinham sido previamente identificadas bioquimicamente como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (19), *Lactobacillus paracasei* (20) e *Lactobacillus plantarum* (5), e foram selecionadas com base nas suas propriedades tecnológicas. Após a PCR, nove bactérias foram confirmadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e 12 como *Lactobacillus paracasei*. Nenhum microrganismo inicialmente identificado como *Lactobacillus plantarum* teve sua identificação confirmada pela técnica molecular empregada. Como as espécies identificadas estão entre as mais importantes BAL alimentares da categoria

---

<sup>1</sup>Engenheira de Alimentos, D. Sc. em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Imbruno@cnpat.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenheira de Alimentos, M. Sc. em Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, CE, ana\_amelia\_mq@hotmail.com

<sup>3</sup>Engenheira de Alimentos, M. Sc. em Engenharia Química, Lorena, SP, engfurtado@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Bióloga, D. Sc. em Microbiologia, professora do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, evania@ufc.br

GRAS (geralmente reconhecidas como seguras), os resultados sugerem que elas podem ser utilizadas em uma cultura lática para elaboração de queijo coalho. Além disso, os resultados também contribuem para melhorar o conhecimento sobre BAL naturalmente presentes em queijo coalho.

Termos para indexação: bactérias ácido-láticas, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, produtos lácteos.

# Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Coalho Cheese

---

## Abstract

The aim of this work was to identify, by species-specific PCR, lactic acid bacteria (LAB) isolated from milk, curd and handcrafted coalho cheeses produced in Ceará state. Forty four LAB strains were used in this study. They had been previously identified biochemically as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (19), *Lactobacillus paracasei* (20) and *Lactobacillus plantarum* (5) and were selected based on their technological properties. After PCR, nine bacteria were confirmed as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and 12 as *Lactobacillus paracasei*. None of the microorganisms first identified as *Lactobacillus plantarum* had their identification confirmed by the molecular technique employed. As the species identified are among the most important GRAS food LAB, the results suggest that they can be employed in a lactic culture for coalho cheese manufacture. Moreover, the results also contributed to improve the knowledge about the LAB naturally present in coalho cheese.

Index terms: lactic acid bacteria, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, dairy products.

## Introdução

O queijo coalho é um produto típico e muito apreciado na região Nordeste. Sua produção é considerada tradicional no Ceará e está concentrada em pequenos municípios. As tecnologias de fabricação do queijo coalho provêm de tradições arraigadas, que persistem até hoje. Em consequência, os produtos não possuem qualquer padrão em relação às técnicas de produção e qualidade, representando um perigo à saúde do consumidor.

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). Em relação ao queijo coalho, Nassu et al. (2001) realizaram um diagnóstico sobre as condições de processamento no Ceará e verificaram que cerca de 85% da produção do queijo era com leite cru.

A pasteurização, além da eliminação de microrganismos patogênicos, também promove uma redução na microbiota natural do leite, a qual é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (GRAPPIN; BEUVIER, 1997). Além disso, o uso de fermento láctico comercial em queijos fabricados a partir de leite pasteurizado resulta na perda das características típicas dos diversos tipos de queijos, quando comparados aos produtos fabricados a partir de leite cru (MACEDO et al., 2004). Para minimizar o problema, tem-se buscado selecionar cepas que sejam parte da microbiota presente no leite cru e nos queijos artesanais, de modo a obter fermentos lácticos especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijo (MARINO et al., 2003; MACEDO et al., 2004).

Nesse contexto, bactérias ácido-lácticas (BAL) foram isoladas de leite, coalhada e queijos coalho artesanais fabricados no Ceará (CARVALHO, 2007). Carvalho (2007) também detectou bactérias com potencial tecnológico para serem empregadas no desenvolvimento de uma cultura láctica adequada para a produção de queijo coalho utilizando leite pasteurizado. Contudo, esses microrganismos tiveram sua



identificação baseada apenas em testes bioquímicos e fisiológicos, os quais frequentemente não são suficientes para determinar a classificação taxonômica exata das espécies de BAL.

O objetivo deste trabalho foi utilizar a ferramenta de PCR espécie-específica para identificar molecularmente BAL endógenas de queijo coalho, visando a uma identificação mais acurada dessas culturas, para que elas possam ser empregadas na fabricação de alimentos.

## Material e Métodos

Os micro-organismos usados neste trabalho foram isolados de leite cru, coalhada e queijo coalho artesanal fabricados no Ceará (Tabela 1). Eles foram previamente identificados pelo sistema API 50-CHL, bioMérieux (CARVALHO, 2007). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ATCC 14579, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8914 e *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 foram usados como cepas de referência. As bactérias mantidas em leite desnatado a -18 °C foram ativadas em meio LDR – leite desnatado reconstituído a 10%, a 35 °C por 24 horas. Em seguida, foram cultivadas em ágar MRS – Man, Rogosa e Sharp (Difco) –, suplementado com glicose 0,5% a 35 °C. Uma única colônia foi escolhida e diretamente utilizada na PCR para a amplificação do DNA de *Lactobacillus* ou para extração de DNA, no caso de *Lactococcus*.

**Tabela 1.** Bactérias ácido-láticas (BAL) e origem.

| Nº da BAL | Código da BAL | Identificação bioquímica                             | Origem        |
|-----------|---------------|--|---------------|
| 01        | 134           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 02        | 378           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 03        | 414           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 04        | 453           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 05        | 456           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 06        | 457           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 07        | 466           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Queijo coalho |
| 08        | 613           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 09        | 626           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 10        | 639           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 11        | 688           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 12        | 698           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Coalhada      |
| 13        | 718           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 14        | 960           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 15        | 963           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 16        | 969           | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 17        | 1033          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 18        | 1083          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 19        | 1113          | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>       | Leite cru     |
| 20        | 275           | <i>Lactobacillus plantarum</i>                       | Queijo coalho |
| 21        | 682           | <i>Lactobacillus plantarum</i>                       | Leite cru     |
| 22        | 700           | <i>Lactobacillus plantarum</i>                       | Leite cru     |
| 23        | 787           | <i>Lactobacillus plantarum</i>                       | Leite cru     |
| 24        | 1119          | <i>Lactobacillus plantarum</i>                       | Queijo coalho |
| 25        | 270           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 26        | 373           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 27        | 455           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 28        | 460           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 29        | 483           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 30        | 485           | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 31        | 1018          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 32        | 1020          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 33        | 1024          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 34        | 1042          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 35        | 1120          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 36        | 1122          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 37        | 1123          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 38        | 1126          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 39        | 1131          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 40        | 1133          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 41        | 1134          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 42        | 1135          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 43        | 1179          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |
| 44        | 1191          | <i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | Queijo coalho |

Fonte: Dados das autoras.

O DNA total de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foi extraído como descrito por Pospiech e Neumann (1995), com modificações. Células de uma única colônia foram ativadas em caldo MRS (Difco), suplementado com glicose 0,5% a 35 °C por 24 horas. Então, uma alíquota (1,7 mL) foi centrifugada (10.800 x g, 4 °C, 10 minutos) (Microcentrifuga refrigerada VS-15000 CFN II, Vision), as células foram colhidas, lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão TES (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, Tris 20 mM, pH 7,5). Foi adicionada lisozima (Amresco), 2 mg/mL, e a suspensão resultante foi incubada a 37 °C por 90 minutos. Após esse período, foi adicionado SDS (Promega) a 10% na proporção de 1:10 (v/v) e proteinase K (Promega), 5 mg/mL, com incubação a 55 °C por 2 horas. A essa preparação foi acrescentado NaCl 5M na proporção de 1:3 (v/v), seguido de clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v), com incubação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após centrifugação (11.700 x g, 4 °C, 10 minutos), a fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado pela adição de isopropanol 1:1 (v/v) seguido de nova centrifugação (11.700 x g, 4 °C, 30 minutos). O sobrenadante foi descartado, ressuspendido em etanol 70% e centrifugado (10800 x g, 4 °C, 5 minutos). O DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8,0). Após tratamento com RNase 1µL/mL a 37 °C por 15 minutos, a suspensão de DNA foi estocada a -20 °C até o momento do uso.

A sequência dos *primers* utilizados para a confirmação da identificação dos prováveis *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lb. paracasei* e *Lb. plantarum* e suas respectivas referências encontram-se listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Protocolos e *primers* usados na amplificação do DNA de bactérias lácticas.

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

Fonte: Dados das autoras.

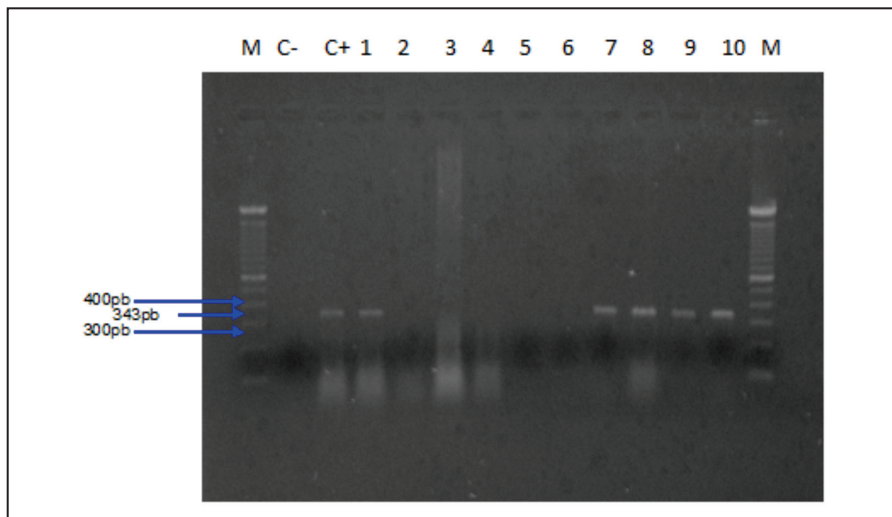
As reações de amplificação para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foram conduzidas, como descrito por Beimfohr et al. (1997), num volume total de 30  $\mu\text{L}$  contendo 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,0 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (Alpha DNA), 1,5 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 1X Tampão PCR (Invitrogen) e 4  $\mu\text{L}$  do DNA (0,35  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). As amplificações da PCR foram realizadas em termociclador (TC-512 – Techne) e consistiram de uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 120 segundos e 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos; 44 °C por 90 segundos e 72 °C por 120 segundos.

As reações de PCR para *Lactobacillus* foram realizadas de acordo com Song et al. (2000): em um volume total de 30  $\mu\text{L}$  contendo 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), 0,4  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (Alpha DNA), 1,0 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 1X Tampão PCR (Invitrogen) e uma colônia da bactéria cultivada em ágar. As amplificações da PCR foram realizadas em termociclador (TC-512 – Techne) de acordo com a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial a 94 °C por 120 segundos e 35 ciclos de 95 °C por 20 segundos e 55 °C por 120 segundos. Um ciclo de 74 °C por 2 minutos foi adicionado ao final da amplificação de *Lb. plantarum*, enquanto um ciclo de 74 °C por 5 minutos foi realizado no caso de *Lb. paracasei*.

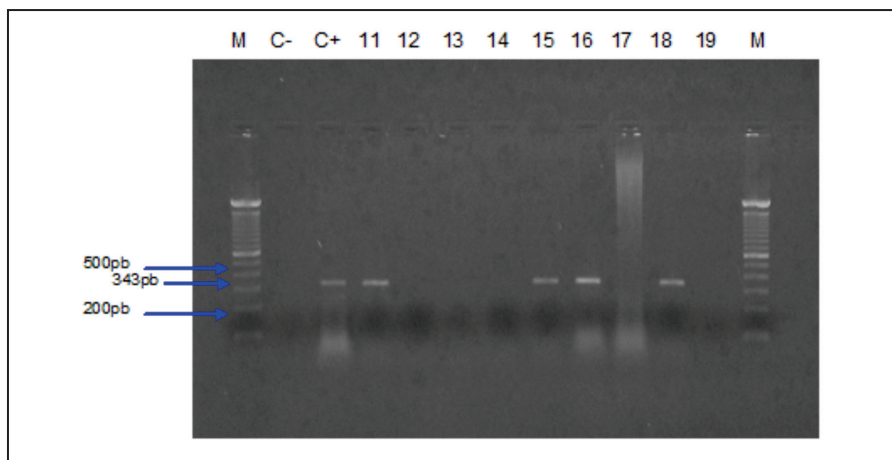
Os produtos das PCR foram analisados em gel de agarose 1% (Bioagency) a 90 V por 40 minutos em 1X tampão TBE (90 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) corado com brometo de etídio. Um marcador de 100 pb (Promega) foi usado como marcador de peso molecular.

## Resultados e Discussão

A amplificação do DNA de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* com os *primers* LHis4R e LHis3F gera um produto de 343 pb (BEIMFORH et al., 1997). Após a PCR com os 19 prováveis *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, o amplicom de 343 pb foi obtido apenas para nove das cepas avaliadas, bem como para a cepa de referência *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 (Figuras 1 e 2).



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers LHis4R e LHis3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. (M: marcador de peso molecular 100 pb; C-: controle negativo da reação; C+: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 – controle positivo; 1-10: isolados testados).



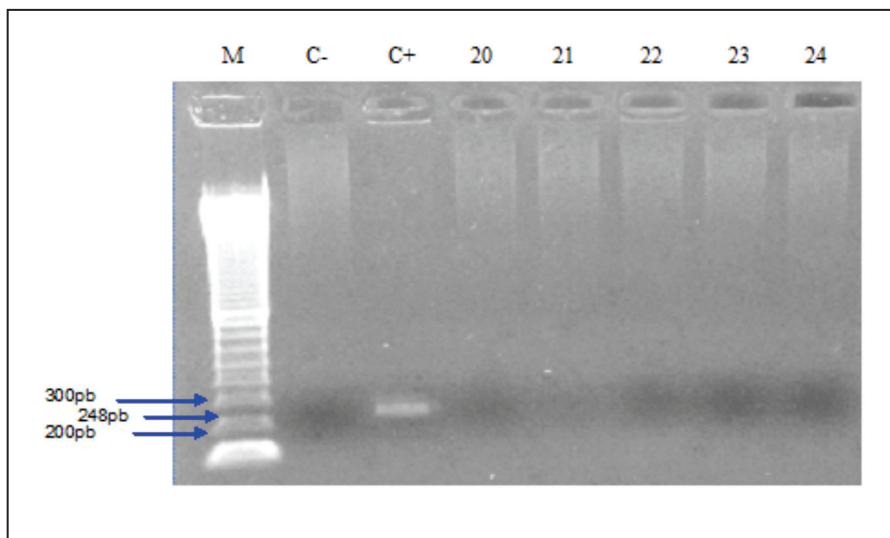
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os primers LHis4R e LHis3F específicos para *Lc. lactis* subsp. *lactis*. M: marcador de peso molecular 100 pb; C-: controle negativo; C+: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 14579 – controle positivo; 11-19: isolados testados.

As 19 bactérias utilizadas neste estudo haviam sido previamente identificadas como *Lc. lactis* subsp. *lactis* com base em suas características fenotípicas e bioquímicas usando o sistema API 50 CHL (CARVALHO, 2007). No entanto, a PCR espécie-específica mostrou que somente 47,3% desses *Lactococcus* pertencem à espécie *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Muitos outros pesquisadores têm verificado discrepâncias entre as identificações fenotípicas e genotípicas. Delgado e Mayo (2004) avaliaram com técnicas moleculares 39 *Lactococcus* previamente classificados fenotipicamente e encontraram entre eles 10 estirpes de *Enterococcus*. Diop et al. (2007) identificaram, com o sistema API 50 CHL, quatro isolados Gram positivos, catalase negativos, com forma de cocos ou ovoide e produtores de bacteriocina como *Lc. lactis* subsp. *lactis*, mas a confirmação genotípica mostrou que o isolado ovoide era uma cepa de *E. faecium*. De acordo com Delgado e Mayo (2004), há uma grande variabilidade nos padrões de fermentação nos quais se baseiam os procedimentos tradicionais de classificação de espécies, o que dificulta uma identificação acurada dessas bactérias apenas com esse tipo de método.

Após a amplificação do DNA de *Lactobacillus* com o par de *primers* específicos para *Lb. plantarum*, apenas a cepa de referência *Lb. plantarum* ATCC 8914 produziu o fragmento esperado de 248 pb, como descrito por Song et al. (2000). As cinco bactérias previamente identificadas como *Lb. plantarum* não apresentaram nenhum produto de PCR após a amplificação com o par de *primers* Lpla2/Lpla3 (Figura 3).

Nigatu (2000) conduziu um estudo para determinar a concordância entre os resultados baseados no padrão de fermentação obtido com o sistema API 50 CHL de 42 *Lactobacillus* oriundos de alimentos e os seus perfis de RAPD, e verificaram que todos os isolados geneticamente determinados como *Lb. plantarum*, com exceção de um, haviam sido identificados fenotipicamente como *Lb. fermentum*. Vuyst e Vancanneyt (2007) verificaram que isolados de *Lb. rossie* não puderam ser identificados como uma espécie conhecida usando as galerias do sistema API 50 CH. Segundo Quere et al. (1997), uma clara identificação de espécies usando apenas métodos fenotípicos, como os de padrão de fermentação

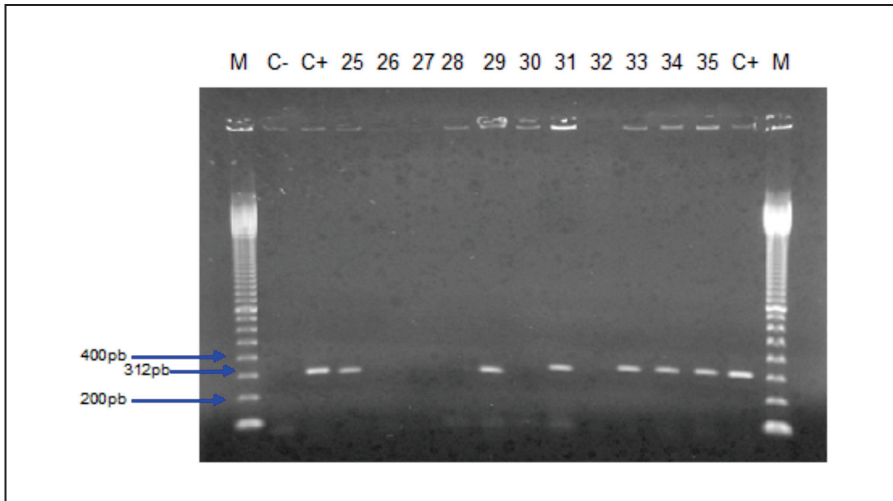
de açúcares, sobretudo dentro do gênero *Lactobacillus*, pode, algumas vezes, ser ambígua e complicada devido ao número crescente de espécies de BAL nas quais essas características de fermentação de açúcares variam muito pouco. De acordo com Nigatu (2000), a discrepância entre dados fenotípicos e genotípicos sugerem que os perfis do API CH devem ser complementados com resultados de genética molecular para uma identificação efetiva de *Lactobacillus*.



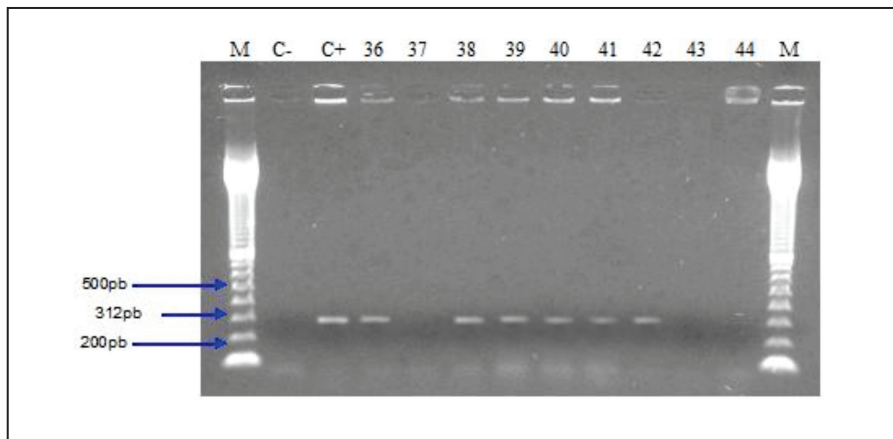
**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpla2 e Lpla3 específicos para *Lb. plantarum*. M: marcador de peso molecular 100 pb; C-: controle negativo; C+: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8914 – controle positivo; 20-24: isolados testados.

A amplificação do DNA com o par de *primers* específico para *Lactobacillus paracasei* gerou um produto de PCR de 312 pb para 12 (60%) dos 20 supostos *Lb. paracasei*, bem como para a cepa de referência *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 (Figuras 4 e 5).





**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. M: marcador de peso molecular 100 pb; coluna C-: controle negativo; C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 – controle positivo; 25-35: isolados testados.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose do produto de PCR amplificado com os *primers* Lpar4 e LU5 específicos para *Lb. paracasei*. M: marcador de peso molecular 100 pb; C-: controle negativo da reação; C+: *Lactobacillus paracasei* ATCC BAA-52 – controle positivo; 36-44: isolados testados.



Tanto os supostos *Lb. plantarum* como os *Lb. paracasei* (Tabela 1) submetidos à identificação específica para espécie neste estudo haviam sido previamente analisados em relação às propriedades tecnológicas para elaboração de queijo coalho e haviam demonstrado potencial para serem utilizados na composição de cultura láctica para esse tipo de queijo (CARVALHO, 2007). *Lb. paracasei* tem sido identificado como bactéria ácido-láctica não iniciadora (do inglês: *non starter lactic acid bacteria* – NSLAB), ou cultura adjunta, em diversos queijos. Crow et al. (2001) relataram que a maior parte de isolados não iniciadores de queijos cheddar da Nova Zelândia pertenciam a duas espécies: *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* e *Lb. ramnhusus*. A espécie *Lb. paracasei* spp. também foi detectado em cinco variedades diferentes de queijos duros da Estônia (KASK et al., 2003). A identificação de *Lb. paracasei* com características tecnológicas para elaboração de queijo coalho é um resultado interessante principalmente porque esse microrganismo está entre as mais importantes bactérias ácido-lácticas de alimentos consideradas GRAS (do inglês: *generally recognize as safe* – geralmente reconhecidas como seguras). Além do mais, estirpes de *Lb. paracasei* têm mostrado uma característica adicional positiva uma vez que algumas de suas espécies são também probióticas.

## Conclusão

A PCR específica aplicada às 44 bactérias ácido-lácticas com potencial tecnológico para serem empregadas na composição de cultura láctica para queijo coalho permitiu a confirmação da identificação de 12 microrganismos como *Lactobacillus paracasei* e 9 como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. No entanto, sugere-se que alguns estudos adicionais como, por exemplo, os relacionados à diversidade desses microrganismos e sua resistência a bacteriófagos, sejam conduzidos para selecionar as cepas mais adequadas para uma cultura para queijo coalho. Também se sugere que outras análises moleculares como o sequenciamento do DNA de isolados promissores não identificados neste trabalho sejam realizadas, uma vez que uma cultura láctica normalmente é composta por mais de uma espécie bacteriana.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (Pibic-CNPq)/Embrapa, pelas bolsas concedidas.

## Referências

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

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.

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

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**, v. 11. p. 275-283, 2001.

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

DIOP, M. B.; DUBOIS-DAUPHIN, R.; TINE, E.; NGOM, A.; DESTAIN, J.; THONART, P. Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 11, n. 4, p. 275-281, 2007.

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

KASK, S.; ADAMBERG, K.; ORLOWSKI, A.; VOGENSEN, F. K.; MOLLER, P. L.; ARDÖ, Y.; PAALME, T. Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. **Food Research International**, v. 36, p. 1037-1043, 2003.

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

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

NASSU, R. T.; LIMA, J. R.; BASTOS, M. S. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 89, p. 28-36, 2001.

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

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

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

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

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



---

*Agroindústria Tropical*

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

