

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**CRISTIANE PEREIRA DE LIMA**

**RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS A BACTERIÓFAGOS ISOLADOS NA**  
**PRODUÇÃO DE QUEIJOS DE COALHO NO CEARÁ**

**FORTALEZA**

**2010**

**CRISTIANE PEREIRA DE LIMA**

**RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS A BACTERÍOFAGOS ISOLADOS NA  
PRODUÇÃO DE QUEIJOS DE COALHO NO CEARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de Concentração:

Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora:

Profª Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Co-Orientadora:

Dra. Laura Maria Bruno

**FORTALEZA - CE  
2010**

L697r Lima, Cristiane Pereira de  
Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de  
queijos de coalho no Ceará / Cristiane Pereira de Lima, 2010.  
56 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo

Co-orientadora: Dra. Laura Maria Bruno

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de  
Ciências Agrárias, Depto. de Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2010.

1. Fagos. 2. Leite. 3. Fermento láctico. I. Figueiredo, Evânia Altina Teixeira  
de (Orient.). II. Bruno, Laura Maria (Co-orient.). III. Universidade Federal do  
Ceará – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

CRISTIANE PEREIRA DE LIMA

**RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS LÁTICAS A BACTERÍOFAGOS ISOLADOS NA  
PRODUÇÃO DE QUEIJOS DE COALHO NO CEARÁ**

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

Aprovada em: 26 / 03 / 2010

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Laura Maria Bruno (Co – orientadora)**  
**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Maria de Fatima Borges**  
**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

**Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Terezinha Feitosa**  
**Embrapa Agroindústria Tropical**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Juliane Döering Gasparin Carvalho**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

**À Deus, por ter me permitido  
concluir este trabalho.**

## AGRADECIMENTOS

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

À Embrapa Agroindústria Tropical pelo apoio técnico durante a execução deste trabalho;

À minha família pelo amor, carinho, apoio e pela presença constante em minha vida;

Ao meu noivo Heberon, pelo amor, companheirismo, apoio e estímulo;

À Prof<sup>a</sup> Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pela amizade, orientação e confiança durante a realização deste trabalho;

À Dr<sup>a</sup> Laura Maria Bruno, pela orientação, dedicação e incentivo durante toda a minha vida acadêmica e, em especial, pela amizade, apoio e confiança tornando possível a realização deste trabalho, transformando as dificuldades do dia a dia em momentos prazerosos.

À Prof<sup>a</sup> Juliane Döering Carvalho, pela amizade, ensinamentos, e constante incentivo permitindo que tudo isso fosse possível;

À Dr<sup>a</sup> Terezinha Feitosa Machado, pela amizade, disponibilidade, e apoio;

À Dr<sup>a</sup> Maria de Fátima Borges, pela amizade, incentivo e apoio;

Ao Instituto de Lactologia Industrial pelo apoio para a realização deste trabalho;

À Dr<sup>a</sup> Andrea Quiberoni, pela orientação, ensinamentos e amizade;

À Régia pelo apoio, colaboração, incentivo e amizade;

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, pelo apoio e agradável convivência, facilitando a execução deste trabalho;

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Lactologia Industrial, pelo auxílio na realização desse trabalho;

Aos amigos e colegas do mestrado, pelo convívio e troca de experiências durante esta caminhada;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa.

E a todos os demais não citados aqui, mas igualmente merecedores da minha eterna gratidão.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivos isolar bacteriófagos de amostras de leite, soro e queijo de Coalho e avaliar a resistência de cepas de *Lactobacillus paracasei*, pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical da Embrapa Agroindústria Tropical aos fagos isolados, visando à elaboração de um fermento láctico específico para fabricação de queijo de Coalho. As amostras foram obtidas em quatro Unidades de processamento de queijo de Coalho, sendo duas artesanais e duas industriais, localizadas no Ceará. Para o isolamento dos bacteriófagos foi empregado o teste de lise celular (teste spot), enquanto que a resistência das culturas aos fagos foi avaliada pelos testes de capacidade de produzir ácido e de turbidez. As cepas avaliadas foram resistentes aos bacteriófagos provenientes das Unidades de processamento de queijo de Coalho. Posteriormente a resistência destas cepas a fagos da Coleção do Instituto de Lactología Industrial (Santa Fe, Argentina) também foi avaliada. Novamente as bactérias foram resistentes aos fagos testados. Os resultados obtidos indicaram que as culturas lácticas testadas são resistentes a bacteriófagos e podem ser utilizadas na composição de fermento láctico destinado à elaboração de queijo de Coalho, a partir de leite pasteurizado.

Palavras-chave: queijo de Coalho, bactérias ácido lácticas, bacteriófagos.

## ABSTRACT

The aims of this work were isolate bacteriophages from milk samples, whey and Coalho cheese and evaluate the resistance of strains of *Lactobacillus paracasei* from Interesting Microorganisms to Tropical Agroindustry Collection belonging to Embrapa Agroindústria Tropical, to isolated phages, with the purpose to elaborate of specific lactic yeast for the Coalho cheese making. Samples were obtained from four Coalho cheese processing units, which are two artisanal and two industrial, located in Ceará. For the bacteriophages isolation it was employed lysis cell test (spot test), while cultures resistance to phages was evaluated by the acid production and turbidity tests. Strains tested were resistant to phages isolated from Coalho cheese processing units and also to phages from Industrial Lactologia Institute's Collection (Santa Fe, Argentina), which were tested later. The data showed lactic cultures evaluated are resistant to bacteriophages and they can be used in the composition of the starter cultures designated to Coalho cheese manufacturing from pasteurized milk.

Keywords: Coalho cheese, lactic acid bacteria, bacteriophages.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma de processamento de queijo de coalho artesanal (linha tracejada) e industrial (linha contínua) fabricado no estado do Ceará 16
- Figura 2.** Classificação dos bacteriófagos baseado em características morfológicas 24
- Figura 3.** Classificação dos fagos em famílias 24
- Figura 4.** Ciclos de replicação fágica 25
- Figura 5.** Estrutura de um bacteriófago de bactéria láctica 26
- Figura 6.** Manchas (spot) decorrentes da lise celular de *E. coli* provocada por bacteriófagos específicos. 36
- Figura 7.** Representação dos valores máximos de redução do ácido láctico produzido (%) pelas cepas testadas inoculadas com os filtrados suspeitos de conter bacteriófagos. 40
- Figura 8.** Representação dos valores máximos da redução do pH do leite fermentado pela culturas testadas quando inoculadas juntamente com filtrado suspeito de conter bacteriófagos 40

### GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Valor máximo da redução de ácido láctico produzido (%) pela cepa inoculada juntamente com o FNNT, após seis horas de incubação. 39
- Gráfico 2.** Valor máximo da redução de pH do leite fermentado pela cultura láctica inoculada juntamente com o FNNT, após seis horas de incubação. 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Cepas de Referência de bactérias utilizadas nos testes de avaliação da resistência a bacteriófagos presentes nas amostras	29
<b>Tabela 2.</b>	Bacteriófagos utilizados para avaliar a resistência de <i>Lactobacillus paracasei</i>	30
<b>Tabela 3.</b>	Sensibilidade de bactérias lácticas e <i>E. coli</i> a bacteriófagos presentes em amostras de leite, soro e queijo de Coalho de quatro Unidades de processamento do Ceará	35
<b>Tabela 4.</b>	Sensibilidade de cepas da Coleção de Micro-organismos da Embrapa Agroindústria Tropical a fagos presentes em filtrados de amostras de leite, soro e queijo de Coalho de quatro Unidades de processamento no Ceará	38
<b>Tabela 5.</b>	Resultados para o teste de turbidez para as culturas lácticas de referência e para as cepas selvagens de <i>Lb. paracasei</i> , pertencentes à Coleção de Micro-organismos da Embrapa Agroindústria Tropical	42
<b>Tabela 6.</b>	Resistência das cepas selvagens de <i>Lb. paracasei</i> , pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical aos bacteriófagos pertencentes à Coleção do INLAIN	43
<b>APÊNDICE</b>		
<b>Tabela A 1</b>	Identificação bioquímica e molecular dos isolados analisados	52
<b>Tabela A 2</b>	Redução no percentual de ácido láctico produzido por culturas lácticas com a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNNT) após 6 horas de incubação	52
<b>Tabela A 3</b>	Redução de pH do leite após o crescimento das culturas lácticas inoculadas com a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNNT) após 6 horas de incubação.	53

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- ATCC** - American Type Culture Collection
- BAL** - Bactérias ácido lácticas
- BHI** - Brain Heart Infusion (meio)
- FNTT** - Filtrado não tratado termicamente
- FTT** - Filtrado tratado termicamente
- INLAIN** - Instituto de Lactologia Industrial
- LDR** - Leite Desnatado Reconstituído (meio)
- MRS** - Man, Rogosa e Sharpe (meio)
- UP** - Unidade de Processamento
- UFP** - Unidades formadoras de placas

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo Geral .....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Queijo de Coalho.....	14
3.1.1. Características do queijo de Coalho.....	17
3.1.1.1. Características físico-químicas do queijo de Coalho .....	17
3.1.1.2. Características microbiológicas do queijo de Coalho .....	17
3.2. Bactérias ácido láticas .....	19
3.2.2. <i>Leuconostoc</i> .....	21
3.2.3. <i>Streptococcus</i> .....	21
3.2.4. <i>Enterococcus</i> .....	21
3.2.5. <i>Lactobacillus</i> .....	22
3.3. Bacteriófagos.....	23
3.3.1. Características gerais .....	23
3.3.2. Ciclos de replicação dos bacteriófagos.....	24
3.3.3. Bacteriófagos de bactérias ácido láticas .....	25
3.3.4. Fatores que favorecem a infecção por bacteriófagos e métodos de controle.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Amostras.....	29
4.2. Micro-organismos: .....	29
4.2.1. Bactérias.....	29
4.2.2. Bacteriófagos .....	30
4.3. Conservação e ativação das culturas .....	30
4.3.1. Bactérias.....	30
4.3.2. Bacteriófagos .....	31
4.3.2.1. Propagação dos bacteriófagos .....	31
4.4. Isolamento dos bacteriófagos .....	32
4.4.1. Preparação das Amostras .....	32
4.4.2. Obtenção do filtrado suspeito de conter bacteriófagos.....	32
4.4.3. Teste spot .....	33
4.5. Avaliação da resistência das culturas a bacteriófagos.....	33
4.5.1. Teste de turbidez .....	33
4.5.2. Teste da produção de ácido.....	33
4.5.3. Avaliação da resistência de cepas de <i>Lb. paracasei</i> a bacteriófagos de referência ...	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. Isolamento dos bacteriófagos .....	35
5.1.1. Teste Spot .....	35
5.2. Avaliação da resistência das culturas aos bacteriófagos .....	38
5.2.1. Teste da produção de ácido.....	38
5.2.2. Teste de Turbidez.....	41
5.2.3. Resistência de cepas de <i>Lb. paracasei</i> a bacteriófagos de referência.....	43
6. CONCLUSÕES .....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
8. APÊNDICE .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

O queijo de Coalho, um dos queijos mais tradicionais produzidos no Nordeste brasileiro, apresenta tecnologia de fabricação simples, sendo amplamente fabricado e consumido nesta região. Nos últimos anos este produto começou a ser também produzido na região Sudeste, aonde vem sendo cada vez mais apreciado como acompanhamento de churrascos e outras refeições.

De acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijo de Coalho é o produto que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas, e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (Brasil, 2001).

A legislação brasileira estabelece que o queijo deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (Brasil, 2001), contudo muitos produtores rurais ainda utilizam o leite cru, o que representa um perigo em potencial para a saúde do consumidor, devido à possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos.

A pasteurização, além de destruir os micro-organismos patogênicos, promove a destruição da microbiota natural do leite, afetando o desenvolvimento das características sensoriais do queijo. Neste sentido, nos últimos anos, pesquisadores em todo o mundo têm se preocupado em selecionar bactérias ácido lácticas (BAL) pertencentes à microbiota láctica natural do leite cru e de queijos artesanais regionais, de modo a obter fermentos iniciadores e adjuntos especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos.

BAL constituem um grupo de micro-organismos Gram-positivos frequentemente utilizados em fermentações de alimentos. Essas bactérias ao fermentarem carboidratos, produzem ácido láctico, sendo consideradas as principais responsáveis pela acidificação do queijo. Essa redução do pH auxilia na atividade do coagulante, na expulsão do soro da coalhada, na definição das características sensoriais do queijo e na prevenção do crescimento de patógenos.

Entre as características tecnológicas que as BAL devem apresentar para serem utilizadas na composição de um fermento láctico destacam-se: capacidade de acidificação, capacidade proteolítica, produção de aroma e tolerância a cloreto de sódio. Outro fator importante a ser considerado é a sua resistência à infecção por bacteriófagos.

Bacteriófagos, também denominados fagos, são vírus que infectam bactérias podendo causar dois efeitos: lise celular, causada por fagos virulentos (ou líticos), ou permanência na célula hospedeira devido à integração do DNA do fago ao DNA do hospedeiro, ocasionado pelos fagos temperados (ou lisogênicos), num estado chamado lisogenia. Como consequência da infecção por bacteriófagos pode ocorrer a diminuição da capacidade de acidificação das culturas lácticas, resultando em problemas como a ausência da fermentação e má dessoragem do queijo ocasionando substanciais perdas econômicas (ALLISON; KLAENHAMMER, 1998)

O persistente problema de infecção por bacteriófagos em indústrias de laticínios tem fomentado a demanda por pesquisas para o desenvolvimento de fermentos lácticos compostos por culturas lácticas resistentes a bacteriófagos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar cepas de BAL, previamente caracterizadas, quanto à resistência a bacteriófagos. Com isso, espera-se contribuir para a seleção de micro-organismos visando à elaboração de um fermento láctico adequado à fabricação de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado e, desta forma, favorecer a manutenção das características sensoriais típicas deste produto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a resistência de bactérias ácido lácticas a bacteriófagos provenientes de Unidades produtoras de queijos de Coalho artesanal e industrial.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Promover o isolamento dos bacteriófagos das amostras de leite, soro e queijo de Coalho de duas Unidades produtoras artesanais e duas industriais;
- Avaliar a resistência de cepas de referência de BAL aos bacteriófagos presentes nas amostras;
- Avaliar a resistência de cepas de BAL pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical a bacteriófagos provenientes das Unidades produtoras de queijos de Coalho bem como aos fagos da Coleção do Instituto de Lactologia Industrial – INLAIN, Santa Fe, Argentina.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Queijo de Coalho

O queijo é um alimento rico em proteínas de alto valor biológico, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos, existindo em todo o mundo mais de 1.000 tipos, feitos a partir de diferentes leites e diferentes processos de produção (LÁCTEA BRASIL, 2006).

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos. Acredita-se que ele tenha sido descoberto antes da criação da manteiga, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial da sua fabricação. Há relatos de consumo de leite coagulado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra há 6.000 anos a.C. (PERRY, 2004).

Era comum que viajantes e mercadores há centenas de anos, transportassem leite em um cantil feito de estômago de carneiro. Desse modo o leite coalhava e formava o queijo. Há registros de Columelo, um romano amante da boa mesa, da fabricação de queijo num tratado de Gastronomia do século I a.C. Nesse período tinha sido descoberta a prensa, que permitia obter queijos de pasta ainda mais seca e dura (LÁCTEA BRASIL, 2006).

No Brasil, atualmente, a produção de queijos é bastante expressiva. Pesquisas realizadas pelo SEBRAE (2008) mostram que entre 2002 e 2006, este mercado cresceu cerca de 20%, com a produção passando de 477.300 toneladas para 572.000 toneladas por ano, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor brasileiro (PERRY, 2004).

O queijo de Coalho é um dos produtos lácteos mais tradicionais produzidos no Nordeste brasileiro, sendo o queijo mais difundido no Estado do Ceará. Possui grande importância sócio-econômica, com expressiva participação na fonte de renda e geração de emprego local. Pela sua popularidade, pode ser facilmente encontrado para comercialização nas próprias unidades produtoras, feiras, padarias, confeitarias, lojas de produtos típicos nordestinos, armazéns, mini e supermercados, bares, restaurantes, entre outros.

A denominação “queijo de Coalho” provavelmente se deve ao fato deste queijo ter sido inicialmente fabricado pela adição de coalho animal presente em pedaços do estômago de animais ruminantes jovens (mocó, preá, cabrito, bezerro) ao leite, promovendo a sua coagulação (AQUINO, 1983). Esta forma de fabricação persiste até os dias atuais na região do Jaguaribe/CE, onde 50% dos produtores ainda a utilizam (NASSU *et al.*, 2001).

Pelo fato de não necessitar de equipamentos caros, a produção deste queijo é explorada com bastante êxito nas comunidades rurais. Em sua grande maioria, é produzido em nível caseiro e artesanal, com tecnologia bem simples, transmitida de geração a geração em todas as regiões produtoras do estado.

A indústria queijeira na região Nordeste divide-se, basicamente, em pequenas unidades artesanais, sem qualquer fiscalização, e médias empresas, regulamentadas e inspecionadas pelo Ministério da Agricultura e órgãos oficiais estaduais e municipais (NASSU *et al.*, 2001). O predomínio desses pequenos produtores dificulta a obtenção de informações oficiais sobre a produção total, uma vez que não há um registro oficial sobre o que é produzido (SEBRAE, 2008).

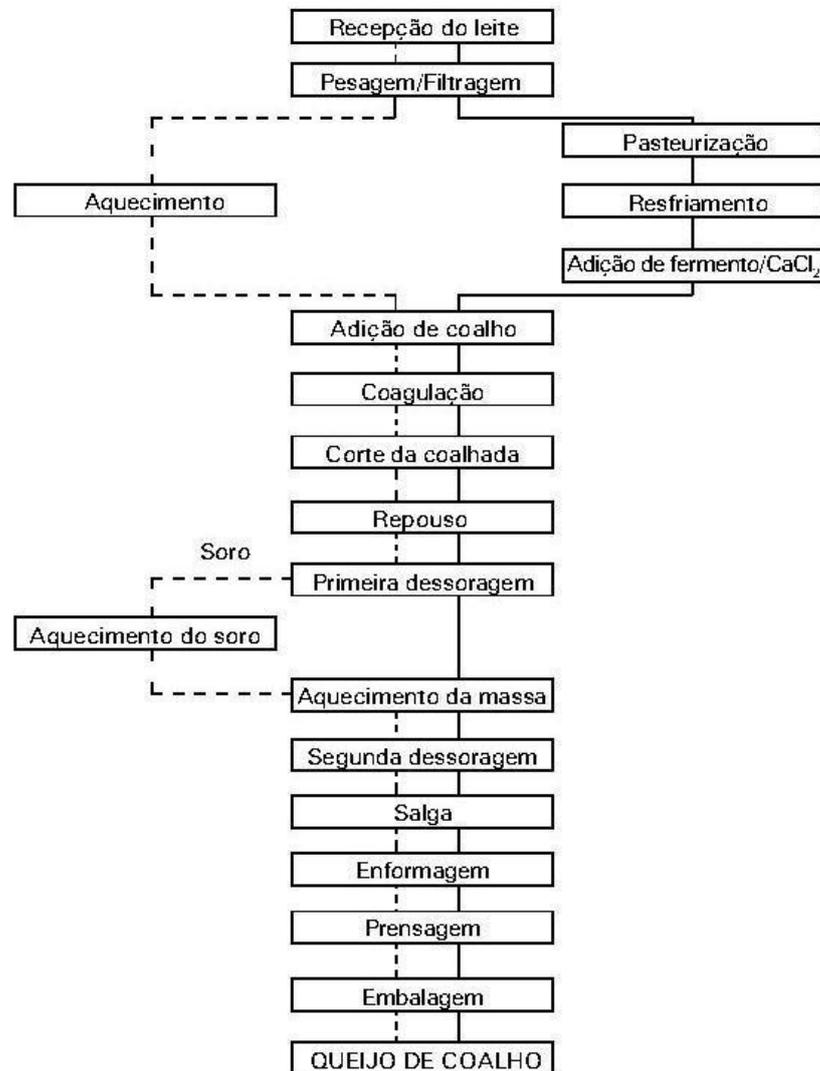
De acordo com a instrução normativa nº30 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) o queijo de Coalho é obtido pela coagulação do leite, por ação do coalho ou de enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de BAL selecionadas. É um queijo de consistência semi dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada. (Brasil, 2001). Sua textura “borrachuda”, que não derrete ao ser assado e seu sabor ácido suave são algumas características bastante apreciadas pelos consumidores (CARVALHO *et al.*, 2005).

A principal enzima responsável pela coagulação do leite é a quimosina também conhecida como renina, uma fosfoproteína de ação proteolítica presente no estômago de ruminantes jovens. Ela atua hidrolisando ligações peptídicas da caseína, transformando-a em para-caseína que precipita em presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  formando, então, a coalhada (PERRY, 2004).

Ao contrário de sua forma simples de produção, a utilização do queijo de Coalho é bastante variada. Este queijo pode ser consumido cru, grelhado, assado na brasa na forma de espetinho, além de ser ingrediente em vários pratos típicos da região Nordeste. Nos últimos anos este produto vem sendo cada vez mais consumido na região Sudeste, onde é produzido sob a forma de espeto para churrasco em vários laticínios na região de Campinas (PEREZ, 2005).

Apesar da importância econômica e grande popularidade na região Nordeste, a fabricação do queijo de Coalho não conta com tecnologia apropriada, o que leva ao mercado produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação ao padrão do produto (NASSU *et al.*, 2001).

O fluxograma geral de produção do queijo de Coalho no estado do Ceará pode ser observado na Figura 1.



Fonte: Adaptado de Nassu *et al.* (2001)

**Figura 1** - Fluxograma de processamento de queijo de Coalho artesanal (linha tracejada) e industrial (linha contínua) fabricado no estado do Ceará.

O cozimento da massa é realizado pela incorporação de parte do soro, que é previamente retirado e aquecido a uma temperatura entre 85 a 100°C. Este procedimento pode ser realizado também, com água quente ou vapor direto até a obtenção de massa semi cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45 e 60°C) (CARVALHO *et al.*, 2005). Nesta etapa pode ocorrer a seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, contribuindo para a definição da microbiota final deste queijo (CARVALHO, 2007).

### **3.1.1. Características do queijo de Coalho**

#### **3.1.1.1. Características físico-químicas do queijo de Coalho**

Embora o queijo de Coalho seja produzido há mais de um século, ainda hoje não existe uma padronização nas técnicas de sua elaboração, o que resulta numa grande variabilidade de suas características físico-químicas (CARVALHO, 2007).

Essas variações são refletidas na abrangência dos parâmetros físico-químicos do regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo de Coalho, que o classifica como de médio (36,0-45,9%) a alto teor de umidade (46,0-54,9%), de massa semi-cozida ou cozida, semi-gordo (25,0-44,9%) ou gordo (45,0-59,9%) (Brasil, 2001).

Perez (2005) avaliou a composição média de sete diferentes marcas de queijo de Coalho comercializado em Campinas e verificou que o teor de umidade variou entre 37,49 a 42,05 %, a gordura de 30,01 a 32,06 %, e o teor protéico variou de 21,29 a 24,44 %. Uma das marcas foi classificada como de baixo teor de umidade, não se enquadrando nos requerimentos exigidos pela legislação brasileira.

Em outro estudo, Carvalho (2007) analisou 12 amostras de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará e constatou que em relação ao teor de umidade 75,0 % (9/12) foram classificadas como de média umidade e 16,5 % (2/12) de alta umidade. No entanto, 8,5 % (1/12) apresentou baixa umidade, se encontrando fora do padrão estabelecido pelo regulamento técnico de identidade e qualidade deste queijo.

A composição do leite e a falta de padronização nas operações de elaboração do queijo de Coalho podem ser consideradas como os principais fatores tecnológicos que exercem influência na qualidade e nas características do produto final.

#### **3.1.1.2. Características microbiológicas do queijo de Coalho**

Apesar da legislação estabelecer que o leite utilizado na elaboração de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 2001), muitos produtores rurais ainda utilizam o leite cru. Em algumas localidades ele ainda é obtido sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e, em consequência, apresenta elevado número de diversos tipos de micro-organismos, inclusive patogênicos, o que constitui um risco à saúde da população (FREITAS FILHO *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2008).

Nassu *et al.* (2001) verificaram que no processamento do queijo de Coalho, em 78,9 % dos casos o leite não é resfriado e chega às unidades processadoras em latões com tampa e em veículos geralmente descobertos. Esses pesquisadores constataram ainda que produtores que processam volumes acima de 300 litros levam até cinco horas para utilizar o leite, uma vez que o recebem de terceiros. O problema também é agravado pela não adoção de Boas Práticas de Fabricação principalmente em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias.

A contaminação microbiana somada à riqueza de nutrientes do queijo de Coalho, a qual favorece o desenvolvimento dos micro-organismos presentes, atribuem a este produto risco potencial em causar doenças transmitidas por alimentos, assim como destacada relevância para a saúde pública. Investigações conduzidas por Borges (2006) e Feitosa *et al.* (2008) demonstraram alto nível de contaminação do produto, evidenciada pela presença de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, além de micro-organismos do grupo dos coliformes, tornando-o impróprio para o consumo humano.

Leite *et al.* (2002) avaliaram 32 amostras de queijo de Coalho comercializadas em Salvador e detectaram a presença de *Escherichia coli* em 95,5 % (28/32) e de *L. monocytogenes* em uma delas. Branco *et al.* (2003) analisaram 84 amostras de queijo de Coalho e verificaram que 19 % (16/84) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*.

Santana *et al.* (2008) analisaram 60 amostras de queijo Coalho comercializadas em Aracaju e verificaram que 46,7 % (28/60) foram positivas para a presença de *Staphylococcus coagulase* positiva. Resultados semelhantes foram observados por Barbosa *et al.* (2005) que detectaram a presença deste micro-organismo em 100 % (25/25) das amostras de queijo Coalho comercializadas na cidade de Teresina.

Apesar de o leite ser uma fonte de micro-organismos indesejáveis do ponto de vista de segurança microbiológica, ele também é fonte de BAL. Estas bactérias contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais desejáveis do produto. Elas fermentam carboidratos, produzindo ácido, e são consideradas as principais responsáveis pela acidificação do queijo, favorecendo a sua conservação. Outras atividades metabólicas destes micro-organismos também permitem aumentar sua vida-de-prateleira.

### 3.2. Bactérias ácido lácticas

BAL constituem um grupo de micro-organismos Gram-positivos comumente utilizados na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (MADERA *et al.*, 2003). A principal função das BAL nos alimentos é a acidificação a um pH próximo de 4, que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, permitindo que o período de conservação dos produtos fermentados seja maior que o dos produtos onde a matéria-prima não é fermentada (PIARD *et al.*, 1999).

As primeiras definições de bactérias lácticas baseavam-se na capacidade de fermentação e coagulação do leite por esse grupo de micro-organismos, incluindo também os coliformes. Beijerinck em 1901 descreveu *Lactobacillus* como bactérias Gram-positivas, separando coliformes das bactérias lácticas. Atualmente as BAL associadas a alimentos incluem espécies do gênero *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (STILES e HOLZAPFEL, 1997). Desses 11 gêneros existentes, apenas cinco são comumente encontrados em queijos artesanais: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (FOX *et al.*, 2000).

BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados (PIARD *et al.*, 1999). Também são produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas (GUEDES NETO *et al.*, 2005; TAMANINI *et al.*, 2008).

Os fermentos lácticos são compostos de BAL iniciadoras, comumente chamadas de culturas starters, e de micro-organismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas (CARVALHO, 2007). Na elaboração de queijos o papel destes fermentos está relacionado à produção de ácido láctico, que facilita a ação do coalho, auxiliando na expulsão do soro, definindo as características sensoriais do queijo e prevenindo o crescimento de patógenos (CAVALCANTE *et al.*, 2007). No entanto, o uso de fermentos lácticos comerciais implica na perda das características que são peculiares a cada tipo de queijo, quando comparados aos fabricados a partir de leite cru (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004).

De acordo com Carvalho (2007), a adição de fermento láctico, logo após a etapa de pasteurização, pode amenizar a perda de características sensoriais em queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, mas não consegue recuperar as características individuais e específicas do queijo elaborado com leite cru, acabando por promover uma padronização cega do produto.

Neste sentido, nos últimos anos, pesquisadores em todo o mundo têm se preocupado em selecionar cepas pertencentes à microbiota láctica natural do leite cru e de queijos artesanais de suas regiões, de modo a obter fermentos iniciadores e adjuntos especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos (CARVALHO, 2007; DURLU-OSKAYA *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2001).

Carvalho (2007) isolou e caracterizou BAL de amostras de queijos de Coalho artesanais provenientes do Ceará. Na identificação de gênero foram encontrados *Enterococcus* (59,6%), *Lactobacillus* (22%), *Streptococcus* (12,8%), *Lactococcus* (1,7%) e *Leuconostoc* (0,6%). Essas BAL foram caracterizadas quanto às propriedades tecnológicas e cepas com características importantes para a fabricação de queijo de Coalho foram selecionadas como promissoras para serem empregadas na composição de fermentos lácticos destinados a sua produção, utilizando leite pasteurizado como matéria prima.

Cavalcante *et al.* (2007) elaboraram queijos de Coalho a partir de leite pasteurizado, inoculado com cepas de BAL isoladas de amostras de leite cru e queijos de Coalho artesanais provenientes de três regiões tradicionais produtoras do Ceará (Tauá, Morada Nova e Jaguaribe). O produto apresentou boa aceitação pelos consumidores quando avaliado sensorialmente, demonstrando ser possível melhorar sua qualidade microbiológica, sem perda das características típicas do queijo de Coalho artesanal elaborado com leite cru.

### **3.2.1. *Lactococcus***

Os *Lactococcus* são os principais micro-organismos responsáveis pela acidificação de produtos lácticos fermentados devido a sua capacidade em converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Carvalho (2007) caracterizou tecnologicamente 235 BAL isoladas de amostras de leite, massa do queijo e queijos de Coalho artesanal produzido no Ceará e verificou que o gênero *Lactococcus* (35) apresentou a maior percentagem (17,1%) de produtores rápidos de ácido.

Além de ácido láctico, os micro-organismos deste gênero, produzem também diacetil, dióxido de carbono e outros compostos de aroma. Apresentam como principal

característica a capacidade de crescer a 10°C, em pH ótimo de 6,0-6,5, mas não crescem a 45°C (TEUBER, 1995).

### 3.2.2. *Leuconostoc*

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

### 3.2.3. *Streptococcus*

Neste gênero, somente a espécie *Streptococcus thermophilus* é utilizada nas fermentações lácticas. Apresentam grande resistência ao aquecimento crescendo bem a 45°C e a 52°C e conseguindo, inclusive, sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995).

Cepas de *S. thermophilus* são frequentemente utilizadas em combinação com *Lactobacillus* spp., o qual desempenha o importante papel de utilizar a galactose, porção de lactose, que não é utilizada pelo *S. thermophilus*, complementando a acidificação do queijo e reduzindo o fenômeno de escurecimento que ocorre com o aquecimento (MICHEL; MARTLEY, 2001).

### 3.2.4. *Enterococcus*

Este gênero inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas mais frequentes em alimentos. Apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. No entanto, sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremos (CARIDI *et al.*, 2003).

A influência positiva dos *Enterococcus* em queijos está relacionada ao desenvolvimento das propriedades sensoriais, através de reações bioquímicas (proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis) que ocorrem

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

*Enterococcus* é o gênero predominante entre as BAL isoladas do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará (CARVALHO, 2007) e, portanto, pode ter uma contribuição significativa nas características sensoriais do mesmo. Contudo, sua presença em alimentos preocupa a saúde pública pela sua origem entérica e envolvimento em infecções hospitalares, relacionado ao aumento de sua resistência a antibióticos. Bruno *et al.* (2008) avaliaram o potencial patogênico de 64 culturas de *Enterococcus* isolados de queijos de Coalho artesanais e constataram que 42,2% (27/64) dos isolados deste gênero foram considerados potencialmente patogênicos.

### 3.2.5. *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compreende bacilos Gram positivos, não esporulados, catalase negativos, anaeróbios facultativos, que comumente produzem ácido lático como principal metabólito da fermentação de carboidratos. Possuem comprimento variável, e podem ser curvados, curtos, corineiformes ou cocobacilos (GUGLIELMOTTI, 2003).

Este gênero inclui cerca de 80 espécies reconhecidas, embora 5 espécies heterofermentativas de *Lactobacillus* tenham sido transferidas para o gênero *Weissella*. A divisão clássica dos micro-organismos deste gênero está baseada em suas características fermentativas: 1- obrigatoriamente homofermentativos; 2- heterofermentativos facultativos e 3- obrigatoriamente heterofermentativos (AXELSSON, 2004).

Algumas espécies de *Lactobacillus* são utilizadas mundialmente como culturas iniciadoras na produção de queijos e leites fermentados (CAPRA; QUIBERONI; REINHEIMER, 2006). Cepas específicas de *L. casei* com características probióticas são também utilizadas em alimentos funcionais e produtos de saúde (TYNNKYNNEN *et al.*, 1999).

Atualmente, vários estudos têm identificado cepas de *Lb. paracasei* capazes de produzir certos atributos importantes para a elaboração de queijos. Estas cepas começaram gradualmente a ser adicionadas aos tanques de fermentação como culturas adjuntas, com a finalidade de proporcionar um amadurecimento controlado, acelerado ou produzir atributos específicos (CAPRA, 2007).

### 3.3. Bacteriófagos

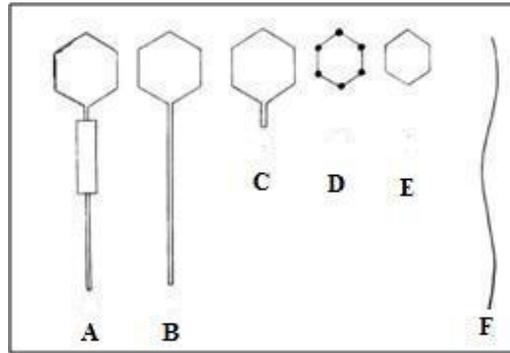
#### 3.3.1. Características gerais

Bacteriófagos, também denominados fagos, são vírus que infectam bactérias, sendo inofensivos aos seres humanos, animais e plantas. São os seres mais abundantes do ambiente e estão presentes, em grande número, na água e em alimentos de várias origens. Cada fago é específico para uma determinada espécie de bactéria sendo incapazes de infectar outras (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

A estrutura da maioria dos vírus está fundamentada nos mesmos princípios: possuem um núcleo composto de ácidos nucleicos que contem a informação genética necessária para a sua replicação, podendo ser DNA ou RNA, rodeado por uma camada protéica chamada cápside ou capsídeo (GUGLIELMOTTI, 2003)

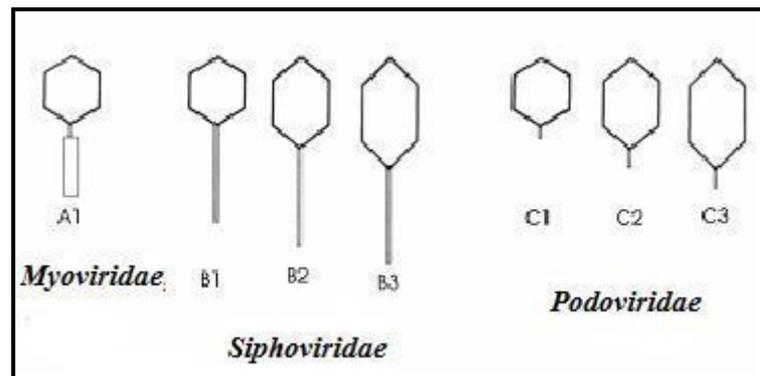
De acordo com Sulakvelidze, Alavidze e Morris, (2001) a história da descoberta dos bacteriófagos tem sido objeto de vários debates. Ernest Hankin, um bacteriologista britânico relatou em 1896 a presença de agentes antibacterianos que destruíam o *Vibrio cholerae*, nas águas dos rios Ganges e Jumna na Índia. Nesta mesma época, outros pesquisadores relataram casos similares, no entanto, nenhum destes explorou suas descobertas. Quase 20 anos mais tarde, Frederick W. Twort, um bacteriologista da Inglaterra identificou o primeiro ataque de fagos a bactérias e em 1917 d'Hérelle os denominou *bacteriophagos*, que significa “comedor de bactérias” em grego.

Bradley (1967) classificou os bacteriófagos com base em suas características morfológicas, dividindo-os em seis grupos denominados de A a F. No grupo A estão os fagos com estruturas mais complexas. Estes possuem cabeça hexagonal, cauda longa com bainhas contráteis; os fagos do grupo B também possuem cabeça hexagonal sendo ligeiramente mais simples que os do grupo anterior; no grupo C estão os que possuem caudas mais curtas; o grupo D é composto por fagos sem cauda, possuindo apenas as cabeças hexagonais ou inchaços nos cantos; o grupo E é semelhante ao grupo anterior e difere apenas por não possuir inchaços nos cantos e finalmente o grupo F é composto por fagos com estruturas extremamente simples, possuindo a forma de um filamento largo e flexível (Figura 2).



**Figura 2** - Classificação dos fagos baseado em características morfológicas (BRADLEY, 1967).

Uma classificação mais recente foi proposta por Ackerman *et al.* (1984) na qual os três grupos básicos de Bradley (A, B, C) se organizam em três famílias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* respectivamente. (Figura 3).

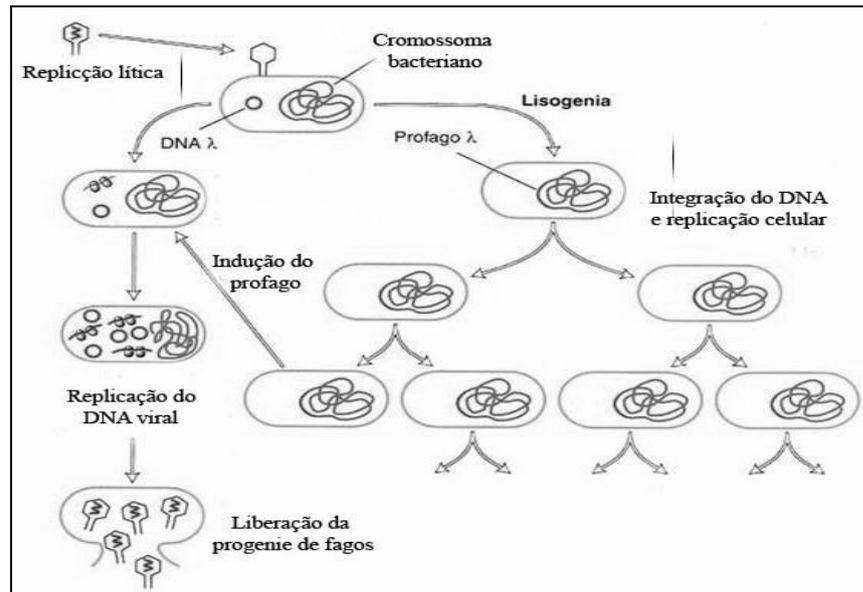


**Figura 3** - Classificação dos fagos em famílias, segundo Ackermann *et al.* (1984)

### 3.3.2. Ciclos de replicação dos bacteriófagos

Os fagos não possuem metabolismo próprio e, por esse motivo, necessitam do metabolismo, dos recursos energéticos e dos recursos materiais dos seus hospedeiros para se replicarem (SILLANKORVA, 2004).

Ao infectarem as bactérias, os bacteriófagos podem causar dois efeitos: lise da célula, ocasionada por bacteriófagos virulentos (ou líticos), ou permanência na célula hospedeira devido à integração do DNA do fago ao DNA do hospedeiro, ocasionado pelos bacteriófagos temperados (ou lisogênicos), num estado chamado lisogenia (McGRATH; FITZGERALD; SINDEREN, 2004; SUÁREZ *et al.*, 2002) (Figura 4).



**Figura 4** - Ciclos de replicação fágica (CAPRA, 2007; GUGLIELMOTTI, 2003)

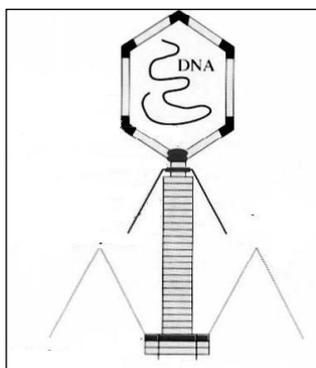
O ciclo lítico é considerado a principal fonte de bacteriófagos no ambiente. As principais etapas deste ciclo de replicação são: adsorção, onde os bacteriófagos se ligam a receptores específicos existentes na superfície dos hospedeiros para iniciar a replicação; injeção do ácido nucléico na bactéria hospedeira; replicação do ácido nucléico resultando na formação de novas partículas fágicas e finalmente lise celular com a liberação de novos bacteriófagos.

O ciclo lisogênico é uma via alternativa de proliferação fágica. As etapas de adsorção e injeção de material genético são similares ao ciclo lítico. Após estas etapas o DNA do fago é integrado ao cromossoma bacteriano. Como consequência disto, a lise celular não ocorre e o DNA fágico se comporta como um gene dentro do cromossoma bacteriano, replicando-se em forma sincronizada com este, dando origem a uma progênie de células lisogênicas. Estes bacteriófagos em estado de latência são conhecidos como profagos ou fagos temperados e as células bacterianas hospedeiras são cepas lisógenas (CAPRA, 2007; GUGLIELMONTTI, 2003;).

### 3.3.3. Bacteriófagos de bactérias ácido lácticas

Segundo McGrath, Fitzgerald e Sinderen (2002), Whitehead e Cox, em 1935, foram os primeiros pesquisadores a identificar *Lactococcus lactis* infectados por bacteriófagos. Desde então a infecção por bacteriófagos tem sido considerada como a principal causa de grandes perdas em indústrias de laticínios.

Na Figura 5 observam-se as estruturas dos bacteriófagos que infectam bactérias lácticas. Estes vírus são compostos por uma cabeça e uma cauda (estrutura binária), formada por proteínas. A cabeça pode ser alongada ou isométrica com o material genético no interior. Seu comprimento pode variar entre 24 até 500 nm. (GUGLIELMOTTI, 2003).



**Figura 5** – Estrutura de um bacteriófago de bactéria láctica (GUGLIELMOTTI, 2003)

Os bacteriófagos estão associados à maioria das espécies bacterianas e estão presentes, em número variável, onde seus hospedeiros são encontrados, ou seja, nos ambientes de processamento de produtos lácteos (McGRATH; FITZGERALD; SINDEREN, 2004; SUÁREZ *et al.*, 2002). Muitos deles são resistentes às condições de pasteurização, pouco afetados por alterações de pH do meio e capazes de sobreviver por longos períodos, em estado de dormência, sob refrigeração, congelamento e mesmo sob forma seca (PERRY, 2004)

A infecção de culturas iniciadoras por bacteriófagos é reconhecidamente um problema na indústria de laticínios e, como consequência, fagos de todas as espécies de BAL de importância tecnológica têm sido isolados. Ainda hoje, em todo o mundo este problema é a causa de numerosos incidentes nas fermentações lácticas (QUIBERONI *et al.*, 2003). Esta infecção pode ocorrer devido à pasteurização do leite não ser suficiente para destruir os bacteriófagos e ao uso contínuo de um único fermento láctico (ALLISON; KLAENHAMMER, 1998).

Bacteriófagos líticos, ao infectarem as bactérias lácticas, podem ocasionar a diminuição da capacidade de acidificação das culturas lácticas, resultando em problemas como a ausência da fermentação e má dessoragem do queijo. Em termos comerciais, estas consequências incluem: ruptura da escala de produção, redução da qualidade do produto e de seu valor comercial, e, em casos mais severos, o abandono da produção (McGRATH; FITZGERALD; SINDEREN, 2004). Cada célula infectada por um bacteriófago pode liberar

até 200 novas partículas virais, acarretando uma contaminação ambiental nas grandes indústrias. (PERRY, 2004).

Fagos temperados podem também afetar o processo fermentativo. Durante o ciclo lisogênico o DNA do fago se integra no cromossomo bacteriano, tornando-se um profago. As células infectadas permanecem vivas e se reproduzem normalmente enquanto o fago se encontra na fase de latência. Se a célula lisógena for sujeita a algum estresse, este profago pode se removido do cromossomo bacteriano iniciando um ciclo lítico.

### **3.3.4. Fatores que favorecem a infecção por bacteriófagos e métodos de controle**

Até recentemente a infecção por bacteriófagos somente constava como problema citado na literatura devido ao fato de que a grande maioria dos laticínios brasileiros se constituía por pequenas unidades industriais, onde o trabalho geralmente adotado não favorecia a manutenção e propagação desta contaminação. Entretanto, atualmente é crescente o número de unidades de médio e grande porte, onde a operação diária com dezenas de milhares de litros de leite, que geram quase igual volume de soro, favorece tremendamente o surgimento e a propagação deste tipo de infecção (MILKNET, 2008).

A fabricação de queijos é o processo fermentativo mais sensível à infecção por estes vírus, pois envolve o uso de tanques abertos, tratamento térmico brando do leite e manipulação do produto durante o processamento (SUÁREZ *et al.*, 2002). Bacteriófagos foram isolados de produtos lácteos argentinos, sendo detectados em 26 (79%) amostras de queijo (SUÁREZ *et al.*, 2002).

Dentre as razões que contribuem para a suscetibilidade dos processos fermentativos à infecção por bacteriófagos estão o uso de leite cru, o qual pode conter bacteriófagos, e a utilização repetida de culturas definidas em condições não assépticas de processamento (ALISSON; KLAENHAMMER, 1998). Desta forma, a substituição do leite cru por leite pasteurizado e o emprego de um fermento láctico específico na elaboração de queijos de Coalho poderá desestabilizar o processo, uma vez que o uso continuado de uma cultura láctica definida, seja ela única ou composta por mais de um tipo de micro-organismo, pode favorecer a proliferação de bacteriófagos que naturalmente estão presentes no ambiente do processamento, elevando a sua quantidade a valores que são prejudiciais ao processo.

Após a constatação de que os bacteriófagos são responsáveis por grandes perdas econômicas nas indústrias de laticínios, vários métodos de controle têm sido investigados. Dentre eles podem ser citados: a utilização de tanques fechados durante a fermentação, a

desinfecção regular de equipamentos e aplicação de culturas iniciadoras resistentes a fagos (ALISSON; KLAENHAMMER, 1998)

O uso de temperaturas elevadas, altas pressões e produtos químicos na inativação de bacteriófagos também tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. Capra *et al.* (2009) investigaram o efeito da aplicação de altas pressões sobre a viabilidade de bacteriófagos de BAL presentes no leite cru e verificaram que alguns fagos foram completamente inativados utilizando o tratamento de 60MPa. Estes pesquisadores constataram que a inativação depende muito da concentração inicial do fago.

Buzrul *et al.* (2007) avaliaram a resistência de 10 bacteriófagos de *Lactococcus* a diferentes tratamentos térmicos (72 °C/15 min e 90 °C/ 5 min), e a diferentes concentrações de etanol e isopropanol (10%, 50%, 75% e 100%) e verificaram que os tratamentos térmicos não foram eficientes na inativação de nenhum dos bacteriófagos avaliados. No entanto, este estudo confirmou o efeito letal do etanol, comumente utilizado na desinfecção de utensílios e equipamentos.

Atamer *et al.* (2009) testaram a resistência ao calor de 56 bacteriófagos específicos para *L. latis* e verificaram que 40% destes resistiram ao tratamento térmico aplicado (80° C/5 min.) demonstrando que os procedimentos usuais de pasteurização adotados pelas indústria de laticínios podem ser insuficientes para inativar completamente as suspensões virais presentes no leite.

Apesar das pesquisas e dos avanços tecnológicos nos processos fermentativos, a incidência e o impacto da infecção por bacteriófagos continuam sendo um problema para indústrias de laticínios. Pesquisas para a resolução deste problema têm focado também no desenvolvimento de culturas iniciadoras fago-resistentes. Estes estudos envolvem a análise das interações fago-hospedeiro e na caracterização dos processos genéticos essenciais para o ciclo de vida do fago (McGRATH; FITZGERALD; SINDEREN, 2002). Neste contexto, buscam-se cepas de bactérias lácticas resistentes a bacteriófagos para serem usadas na forma concentrada, inoculadas diretamente no leite para produção de queijos (McGRATH; FITZGERALD; SINDEREN, 2004).

Uma fonte conveniente para se encontrar tais bactérias são as pequenas unidades produtoras de queijos artesanais, pois a complexidade da microbiota láctica da matéria prima promove forte seleção de bactérias resistentes a bacteriófagos (MADERA *et al.*, 2003). Apesar de o leite cru ser a maior fonte de contaminação de fagos para o ambiente industrial, ele possui microbiota láctica de composição complexa, que seleciona naturalmente as cepas resistentes a bacteriófagos (SUÁREZ *et al.*, 2002)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Amostras

Foram coletadas amostras de leite, soro (oriundo do processo de fabricação dos queijos) e queijo de Coalho em quatro Unidades de processamento de queijo de Coalho do Ceará, sendo duas produtoras de queijos artesanais e duas, de queijos industrializados. As amostras foram transportadas, em caixas isotérmicas, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram avaliadas.

### 4.2. Micro-organismos:

#### 4.2.1. Bactérias

Para os testes de isolamento de bacteriófagos foram utilizadas três cepas de referência de BAL e uma de *Escherichia coli* pertencentes à coleção de culturas da *American Type Culture Collection* – ATCC, listadas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Cepas de Referência de bactérias utilizadas nos testes de avaliação da resistência a bacteriófagos presentes nas amostras.

Bactérias	ATCC
<i>Streptococcus thermophilus</i>	19258
<i>Lactococcus lactis</i>	14579
<i>Lactobacillus paracasei</i>	BAA-52
<i>Escherichia coli</i>	11775

Além destas, 11 (onze) cepas de *Lactobacillus paracasei* (Tabela A1 - Apêndice), selecionadas por apresentarem potencial tecnológico para a elaboração de fermento láctico específico para fabricação de queijo de Coalho (CARVALHO, 2007) e pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical, foram também avaliadas quanto à resistência de bacteriófagos presentes nas amostras. Estas bactérias foram ainda avaliadas quanto à resistência a fagos líticos específicos para *Lb. paracasei* pertencentes à Coleção do Instituto de Lactologia

Industrial – INLAIN (Santa Fe, Argentina). A bactéria hospedeira *Lb. paracasei* A (CAPRA, 2007) foi utilizada como controle nestes testes.

#### 4.2.2. Bacteriófagos

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados fagos provenientes das quatro Unidades de processamento de queijo de Coalho. Além destes, oito bacteriófagos pertencentes à coleção do INLAIN (Tabela 2) também foram utilizados. Destes, sete foram isolados de plantas industriais de empresas lácteas da Argentina e um foi adquirido da coleção ATCC. O fago MLC – A, por ter sido caracterizado em mais detalhes, se encontra hoje depositado no Centro de Referência para Bacteriófagos Félix d’Hérelle - Québec, Canadá (CAPRA, 2007).

**Tabela 2** – Bacteriófagos utilizados para avaliar a resistência de *Lb. paracasei*.

Bacteriofagos	
INLAIN	ATCC
MLC-A	J-1
PMLC-A	
MLC-A 2	
MLC-A 7R	
MLC-A 8	
MLC-A 17	
MLC-A 19	

### 4.3. Conservação e ativação das culturas

#### 4.3.1. Bactérias

As BAL mantidas a -80°C em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia) e glicerol (15% v/v) foram descongeladas em temperatura ambiente e depois ativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) 10% a 35°C (mesofílicas) ou 42°C (termofílicas) por 24 horas. O procedimento foi repetido para que as células retomassem a sua atividade de crescimento. Em seguida, a cultura foi repicada em ágar MRS (Acumedia) para obtenção de colônias

isoladas. Uma colônia selecionada foi, então, ativada em caldo MRS, suplementado com 0,3% de extrato de levedura (BD) e 0,2% de glucose (Vetec) e, incubada na temperatura adequada por 24 a 48 horas. Esse caldo foi utilizado nos testes de avaliação da resistência aos bacteriófagos. Para a reativação da *E. coli* o procedimento foi similar. A cepa mantida em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) (Acumedia) a -80°C foi descongelada e depois ativada no mesmo meio (BHI) a 35°C. Em seguida, foi repicada em ágar BHI e, da mesma forma, uma colônia foi selecionada para reativação.

#### **4.3.2. Bacteriófagos**

Os bacteriófagos da Coleção do INLAIN, mantidos a -20°C, foram descongelados e propagados sobre a cepa hospedeira *Lb. paracasei* A utilizando MRS caldo suplementado com CaCl<sub>2</sub> 10 mM (MRS-Ca) até obtenção de altos títulos (10<sup>9</sup> Unidades Formadoras de Placas (UFP)/mL), e posteriormente conservada em geladeira a 4°C (CAPRA, 2007).

##### **4.3.2.1. Propagação dos bacteriófagos**

Os bacteriófagos foram propagados como descrito por Capra (2007). Alíquotas de 300 µL de um cultivo previamente ativado (37°C /16-18 horas) da cepa hospedeira foram inoculadas em numa série de cinco tubos contendo 10 mL de caldo MRS-Ca, para cada fago. Na sequência, 100 µL da solução fágica, em diferentes concentrações, foram adicionados aos tubos contendo a bactéria sensível. Os tubos foram agitados suavemente e incubados a temperatura de 37°C por aproximadamente 5 horas. Paralelamente, um tubo controle (somente o inóculo bacteriano) também foi incubado nas mesmas condições para se observar o desenvolvimento natural da cepa. Após o período de incubação, o tubo em que a lise se manifestou de forma completa e mais tardiamente foi escolhido para utilização nos testes, pois desta forma garantiu-se uma máxima propagação fágica. O lisado resultante foi filtrado em membrana (0,45 µm) para a remoção de possíveis células bacterianas e foi utilizado nos ensaios de resistência.

## **4.4. Isolamento dos bacteriófagos**

### **4.4.1. Preparação das Amostras**

Para cada amostra de queijo de Coalho, uma alíquota de 10g, mensurada em balança semi analítica (Marte, AS1000C), foi diluída em 90 mL de uma solução de citrato de sódio 2% (Vetec) aquecida a 45°C e em seguida homogeneizada em homogeneizador tipo Stomacher (Seward, 400). As demais amostras (leite e soro) foram utilizadas diretamente, sem diluições.

Estas amostras foram utilizadas para o isolamento de bacteriófagos de acordo com a metodologia proposta por Svensson e Christiansson (1991), na qual primeiramente é obtido um filtrado suspeito de conter bacteriófagos que na sequência é testado contra a bactéria de interesse.

### **4.4.2. Obtenção do filtrado suspeito de conter bacteriófagos**

O pH das amostras foi mensurado e ajustado asépticamente para 4,6, (para precipitação da caseína) com a utilização de ácido clorídrico 1N. Seguidamente, todas as amostras foram centrifugadas (5000g/20minutos) em centrífuga Biofuge Stratos (Heraeus Instruments) para remoção de grandes partículas (proteínas) e filtradas a vácuo (0,22µm), para a remoção de bactérias. Os filtrados assim obtidos são considerados suspeitos de conter bacteriófagos e foram utilizados nos ensaios para verificação da resistência das cepas a bacteriófagos selvagens do seu ambiente de processamento. Para diferenciar o efeito dos bacteriófagos dos efeitos de outros agentes inibidores, uma alíquota de cada filtrado foi tratada termicamente a 90°C por 15 minutos em banho-maria (Quimis – Q215M2). Este aquecimento inativa os bacteriófagos, mas não tem efeito sobre outros agentes inibidores, como, por exemplo, antibióticos. Este filtrado tratado termicamente foi utilizado como controle negativo para a presença de fagos nos testes de avaliação de resistência a bacteriófagos.

#### **4.4.3. Teste spot**

Em uma placa contendo uma fina camada de ágar MRS-Ca (10mM) foi vertido um tubo contendo uma alíquota de 100 µL das culturas lácticas de referência (Tabela 1) misturada a 2,5 mL de ágar MRS semi-sólido (0,6%) e 50 µL de cloreto de cálcio 1M, formando assim uma nova camada. Sobre esta base, uma gota (aproximadamente 10 µL) de cada filtrado obtido no item 4.4.2 foi adicionada. Após um período de aproximadamente 30 minutos, as placas foram incubadas a 35 ou 42°C por 48 horas. A formação de manchas claras sobre a placa indicou a sensibilidade da cepa testada ao fago presente no filtrado (SVENSSON; CHRISTIANSSON, 1991). O mesmo procedimento foi utilizado para a cepa de *E. coli*, com substituição do ágar MRS por BHI.

### **4.5. Avaliação da resistência das culturas a bacteriófagos**

#### **4.5.1. Teste de turbidez**

O teste de turbidez foi realizado conforme metodologia descrita por Svensson e Christiansson, (1991). A um tubo contendo 5 mL de MRS - Ca foi acrescentado 1% da cultura previamente ativada, e 100 µL do filtrado obtido em 4.2.2. Esta mistura foi incubada a 35°C (mesofílicos) ou 42°C (termofílicos) por 24 horas. O controle foi realizado pela incubação da cultura sem o filtrado, nas mesmas condições citadas. O crescimento da cultura, ou seja, a turbidez do meio foi acompanhada visualmente em comparação com o tubo controle, durante intervalos regulares de tempo de 6 horas. O crescimento da cepa (tubo turvo) indica a resistência da mesma ao fago presente no filtrado não tratado termicamente. O mesmo procedimento foi realizado para o filtrado tratado termicamente para desta forma, diferenciar o efeito dos bacteriófagos de efeitos de outros agentes inibidores, caso estejam presentes nas amostras.

#### **4.5.2. Teste da produção de ácido**

O teste de produção de ácido foi realizado para verificar a capacidade acidificante das culturas na presença e ausência do filtrado suspeito de conter bacteriófagos. Foram preparados três frascos contendo 50 mL de LDR 10% e: a) 1 mL do filtrado não tratado termicamente e 1% do inóculo da cultura a ser testada; b) 1 mL do filtrado tratado

termicamente e 1% do inóculo da cultura a ser testada; c) apenas 1% do inóculo da cultura a ser testada (controle). O pH e acidez do meio foram mensurados. Os frascos foram incubados a 35°C (mesofílicos) ou 42°C (termofílicos) e após 6 horas, o pH e a acidez foram novamente determinados. A aferição do pH foi realizada em potenciômetro digital (PHTEK modelo PHS-3B), previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (Vetec). A acidez das amostras foi mensurada pelo método titulométrico com solução de hidróxido de sódio (Vetec) 0,1 N, conforme a metodologia AOAC 935.17 (AOAC, 1997). Os resultados foram expressos em percentuais de acidez em ácido láctico (g/100g amostra).

#### **4.5.3. Avaliação da resistência de cepas de *Lb. paracasei* a bacteriófagos de referência**

Para verificar a resistência de cepas de *Lb. paracasei*, pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical, aos bacteriófagos pertencentes à Coleção do INLAIN (Tabela 2), o teste de turbidez foi novamente empregado, com algumas modificações.

De acordo com a metodologia descrita por Capra (2007), uma alíquota de 0,2 mL da cultura previamente ativada foi inoculada em um tubo contendo 5 mL de caldo MRS-Ca. Em seguida 100 µL da solução fágica obtida no item 4.3.2. foi adicionada a este mesmo tubo e incubada a 37°C. Um tubo contendo somente o inóculo bacteriano foi utilizado como controle de crescimento. A observação visual do aumento de turbidez foi efetuada pela comparação do tubo controle com os tubos contendo os bacteriófagos por um período de tempo tal que permitisse um bom desenvolvimento do cultivo controle (aproximadamente 6 horas).

Se neste primeiro repique não fosse observada diferença de turbidez entre o tubo controle e o tubo com o fago após o período de incubação, dois repiques adicionais, partindo da primeira série de tubos, eram realizados e o mesmo procedimento de incubação era repetido. Desta forma, se a cultura fosse pouco sensível ao fago testado, os repiques possibilitariam a propagação do fago, aumentando o seu título e conseqüentemente favorecendo a lise do cultivo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento dos bacteriófagos

#### 5.1.1. Teste Spot

Os resultados da avaliação da sensibilidade de bactérias lácticas de referência (*St. thermophilus* ATCC 19258, *Lc. lactis* ATCC 1996, *Lb. paracasei* ATCC BAA-52) e *E. coli* ATCC 11775 a fagos presentes em filtrados oriundos de amostras de leite, soro e queijo de Coalho de quatro Unidades de Processamento localizados no Ceará são apresentados na Tabela 3. De acordo com o teste spot, após o crescimento bacteriano, quando o micro-organismo testado é sensível ao fago presente na amostra, este fago lisa as células hospedeiras e infecta as células vizinhas formando uma mancha clara em torno do ponto onde o filtrado suspeito de conter bacteriófagos foi inoculado.

**Tabela 3** – Sensibilidade de bactérias lácticas e *E. coli* a bacteriófagos presentes em amostras de leite, soro e queijo de Coalho de quatro Unidades de processamento do Ceará.

Micro-organismo	Amostra	FTT				FNNT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>	UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>
<i>S. termophilus</i>	Leite	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i>	Leite	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. lactis</i>	Leite	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	Leite	-	-	-	-	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-	-	-	+	+
	Queijo	-	-	-	-	-	-	-	-

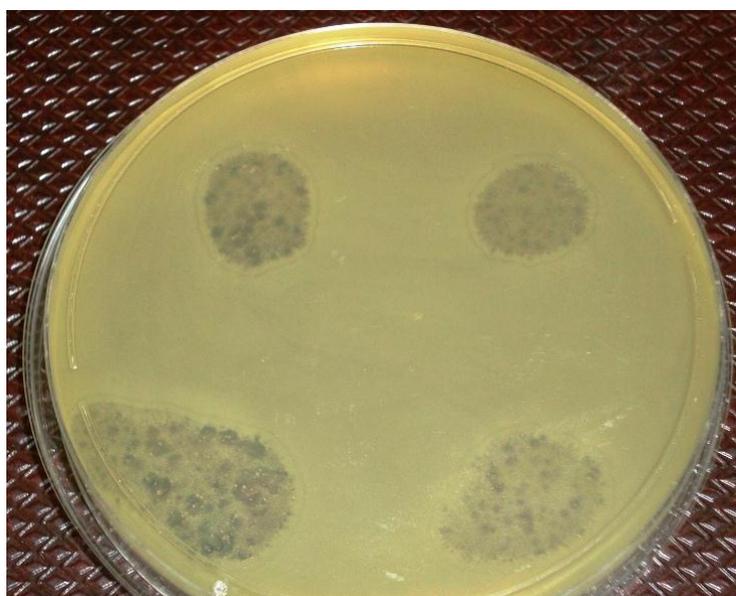
FTT: Filtrado tratado termicamente; FNNT: Filtrado não tratado termicamente; UP: Unidade de processamento  
O sinal “+” indica que a cepa avaliada apresentou sensibilidade ao fago presente na amostra

Todas as cepas de bactérias lácticas de referência avaliadas não apresentaram sensibilidade aos bacteriófagos que poderiam estar presentes nos filtrados analisados, uma vez que não houve visualização de manchas (spot) nas placas referentes a estas culturas. Isto pode

ter ocorrido tanto pela resistência natural das bactérias aos bacteriófagos presentes, quanto em decorrência de não haver bacteriófagos nestas amostras.

De acordo com Hagens e Offerhaus (2008) bacteriófagos são os organismos mais abundantes do ambiente e estão presentes em alto número na água e em alimentos de várias origens. Então, para refutar a hipótese da não existência de bacteriófagos nos filtrados, o mesmo teste foi realizado com cepa de *E. coli*, a qual demonstrou ser sensível aos fagos dos filtrados oriundos das amostras de soro das unidades de processamento artesanal, Unidades de Processamento 3 e 4 (UP<sub>3</sub> e UP<sub>4</sub>) (Tabela 3 e Figura 6).

A presença de bacteriófagos para *E. coli* apenas nos filtrados de soro das Unidades de processamento artesanais pode estar relacionada com a não adoção das Boas Práticas de Fabricação por estas empresas, o que favorece a veiculação da *E. coli* e, conseqüentemente, eleva o número de bacteriófagos específicos para esse micro-organismo. De acordo com Allwood *et al.* (2004) bacteriófagos de *E. coli* tem sido isolados de um grande número de produtos, incluindo galinha, porco, carne moída, cogumelos, alface, legumes crus, empadão de frango e guloseimas, com contagens elevadas de até 10<sup>4</sup> UFP/g.



**Figura 6** - Manchas (spot) decorrentes da lise celular de *E. coli* provocada por bacteriófagos específicos.

Apesar do isolamento de fago específico para *E. coli* não ser o aspecto principal deste trabalho, este é um resultado interessante, uma vez que o uso de bacteriófagos líticos no controle de bactérias patogênicas tem sido ultimamente abordado por vários pesquisadores. O'Flynn *et al.* (2004) caracterizaram bacteriófagos específicos de *E. coli* O157: H7 e

avaliaram a utilização de três bacteriófagos líticos no biocontrole deste micro-organismo. Estes autores concluíram que o uso de bacteriófagos pode ser um método alternativo viável no controle deste patógeno.

Embora não se tenha conseguido isolar bacteriófagos específicos para as bactérias lácticas de Referência analisadas, o mesmo teste foi efetuado com as cepas selvagens da Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical, previamente isoladas por Carvalho (2007) e com potencial para serem utilizadas como fermento láctico para a produção de queijo de Coalho. Também foi verificado que estas bactérias autóctones foram resistentes aos bacteriófagos presentes tanto nas amostras oriundas do processamento industrial como do processamento artesanal de queijo de Coalho (Tabela 4). Como as cepas avaliadas foram isoladas de queijos de Coalho artesanais, elas foram submetidas a uma seleção para sobreviver às etapas de processamento do queijo e, provavelmente desenvolvendo insensibilidade a bacteriófagos. Madera *et al.* (2003) inclusive afirmam que pequenas fábricas que produzem queijos artesanais, sem adição de qualquer fermento láctico, são uma fonte conveniente para a seleção de bactérias resistentes a bacteriófagos.

Estes resultados diferem dos encontrados por Quiberoni *et al.* (2006) que utilizaram o spot teste para verificar a resistência de *St. thermophilus* a bacteriófagos específicos isolados de amostras de soro de queijo de indústrias argentinas. Eles detectaram a sensibilidade desta cepa a dez diferentes bacteriófagos presentes nas amostras. Oriani e Yokoya (2004) também isolaram bacteriófagos, específicos para *Lactococcus*, de amostras de soro e mostraram que o nível de sensibilidade das bactérias componentes de fermentos comerciais variou consideravelmente entre os diferentes tipos de fermentos avaliados.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as cepas selvagens de *Lb. paracasei* avaliadas são resistentes aos bacteriófagos das amostras de leite, soro e queijo de Coalho, provenientes tanto de Unidades de processamento industriais, como de artesanais e podem, portanto, ser indicadas para compor a formulação de um fermento específico para a fabricação de queijo de Coalho.

**Tabela 4** - Sensibilidade de cepas da Coleção de Micro-organismos da Embrapa Agroindústria Tropical a fagos presentes em filtrados de amostras de leite, soro e queijo de Coalho de quatro Unidades de processamento no Ceará.

Micro-organismo	Amostra	FNTT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>
<i>Lb. paracasei</i> 1	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 2	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 3	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 4	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 5	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 6	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 7	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 8	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 9	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 10	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-
<i>Lb. paracasei</i> 11	Leite	-	-	-	-
	Soro	-	-	-	-
	Queijo	-	-	-	-

FNTT: Filtrado não tratado termicamente; UP: Unidade de processamento

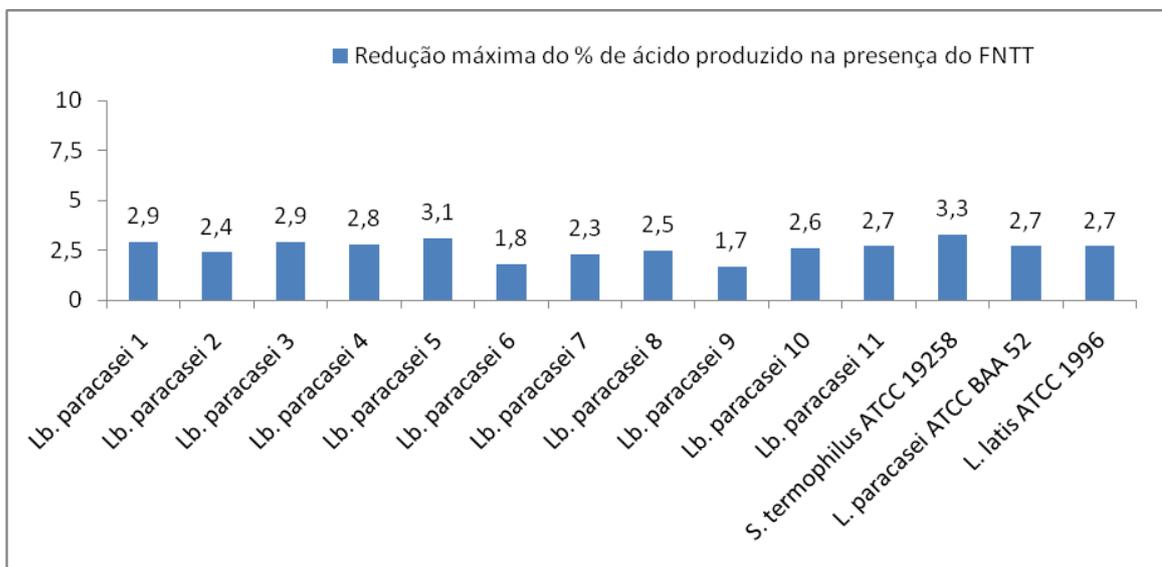
## 5.2. Avaliação da resistência das culturas aos bacteriófagos

### 5.2.1. Teste da produção de ácido

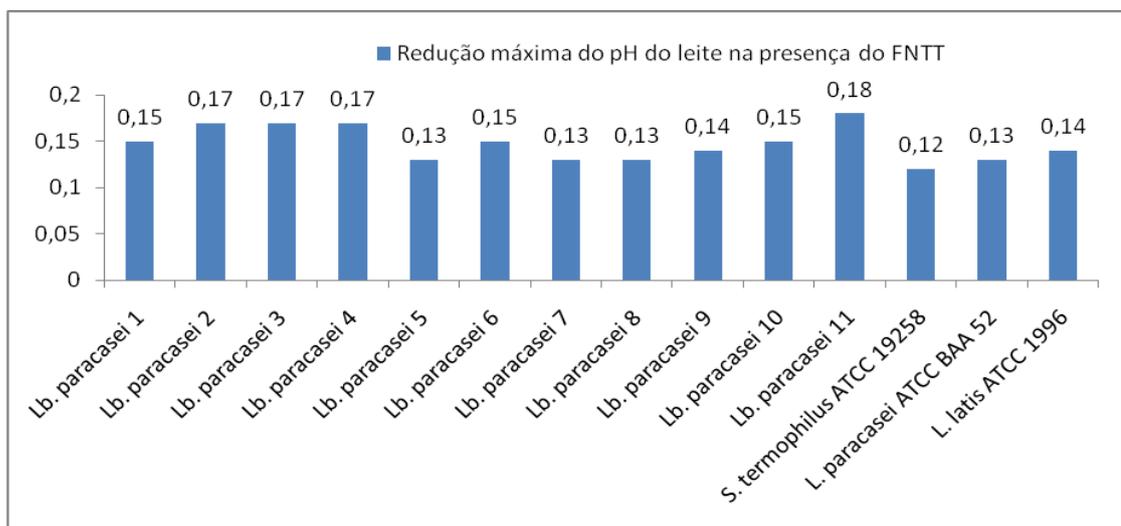
Os resultados do teste de produção de ácido em termos de acidez e pH podem ser observados nos Gráficos 1 e 2, respectivamente (tabelas A2 e A3 do Apêndice). Os valores

constantes nos gráficos representam a redução máxima, após 6 horas de incubação, na quantidade de ácido produzido (% de ácido láctico) e do pH do leite fermentado pela cultura quando inoculada juntamente com os filtrados suspeitos de conter bacteriófagos (FNTT) das amostras das quatro Unidades de processamento. Estes valores são obtidos a partir do cálculo da diferença do % de ácido láctico produzido e de pH entre o frasco que contém apenas o inóculo bacteriano (controle) e o frasco que contém a cultura adicionada ao FNTT.

**Gráfico 1.** Valor máximo da redução de ácido láctico produzido (%) pela cepa inoculada juntamente com o FNTT, após seis horas de incubação.

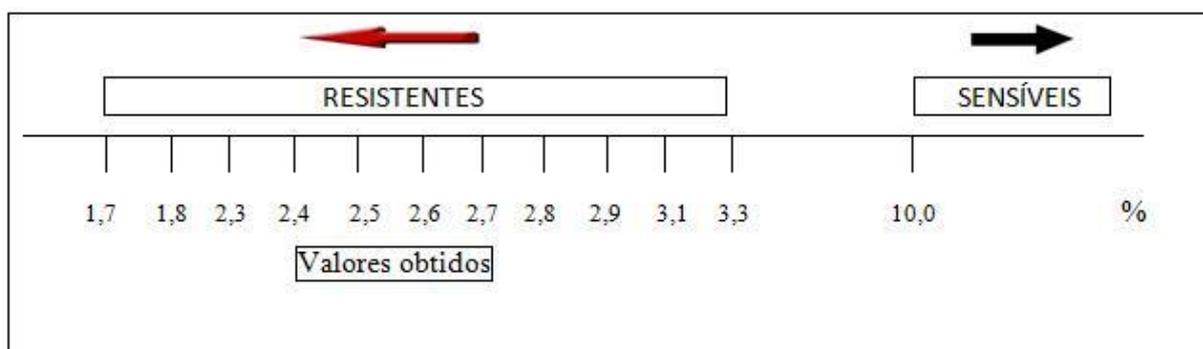


**Gráfico 2.** Valor máximo da redução de pH do leite fermentado pela cultura láctica inoculada juntamente com o FNTT, após seis horas de incubação.

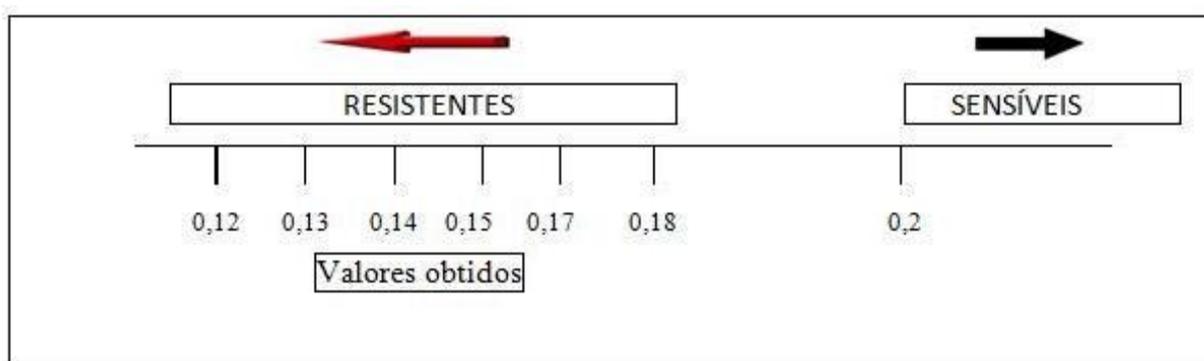


Bacteriófagos, ao infectarem suas cepas hospedeiras, ocasionam uma diminuição na capacidade da produção de ácido. De acordo com Svensson e Crhistianson, (1991), para uma cultura ser considerada sensível a bacteriófagos, é necessário que a redução na quantidade de ácido produzido e de pH da cultura quando inoculada juntamente com o filtrado suspeito de conter bacteriófagos sejam superiores a 10 % e 0,2, respectivamente.

Todas as culturas lácticas avaliadas mostraram-se resistentes aos bacteriófagos presentes nas amostras visto que, a redução na quantidade de ácido produzido (% de ácido láctico) e do pH das cepas inoculadas com os filtrados suspeitos de conter bacteriófagos das amostras dos quatro Unidades de processamento não ultrapassaram 3,3 % (Gráfico 1 e Figura 7) e 0,18 (Gráfico 2 e Figura 8), respectivamente.



**Figura 7** – Representação dos valores máximos de redução do ácido láctico produzido (%) pelas cepas testadas inoculadas com os filtrados suspeitos de conter bacteriófagos.



**Figura 8** – Representação dos valores máximos da redução do pH do leite fermentado pela culturas testadas quando inoculadas juntamente com filtrado suspeito de conter bacteriófagos.

Hussain *et al.* (2008) ao caracterizarem bacteriófagos oriundos de amostras de soro, avaliaram a habilidade de acidificação de cepas de *Lc.lactis* infectadas por bacteriófagos

líticos presentes nas amostras e constataram que houve um declínio na produção de ácido durante o período avaliado indicando a sensibilidade destas cepas aos fagos. Neste estudo os pesquisadores detectaram a presença de bacteriófagos específicos para esta espécie em 42 % (5/12) das amostras avaliadas.

Em contrapartida, Oriani e Yokoya (2004) avaliaram a sensibilidade de *Lactococcus* de fermento comercial a bacteriófagos presentes no ambiente de processamento e verificaram que em alguns casos os decréscimos de acidez não estavam relacionados com a infecção fágica, uma vez que embora fosse detectada a sensibilidade a partículas fágicas para algumas cepas no spot teste, as mesmas cepas não apresentavam diminuição na sua capacidade de produção de ácido.

### 5.2.2. Teste de Turbidez

Os resultados do teste de turbidez tanto para as culturas de referência, como para as cepas selvagens de *Lb. paracasei* estão apresentados na Tabela 5. Foi observado que todas as cepas avaliadas apresentaram o mesmo desenvolvimento do controle, quando inoculadas juntamente com os filtrados suspeitos de conter bacteriófagos (FNNT). Isto indica que todos os micro-organismos testados, incluindo as cepas autóctones da Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, demonstraram ser resistentes aos bacteriófagos selvagens avaliados, corroborando os resultados obtidos nos teste de produção de ácido e nos testes spot.

Quiberoni *et al.* (2003) investigaram a presença de bacteriófagos específicos para cepas de *St. thermophilus* em plantas industriais de leite fermentado na Argentina, isolaram 11 fagos nas amostras pesquisadas e observaram que as oito cepas utilizadas, isoladas de fermento comercial, mostraram-se sensíveis a pelo menos um dos bacteriófagos isolados.

Suárez *et al.* (2008) isolaram e caracterizaram quatro bacteriófagos presentes em amostras de soro de queijos argentinos e verificaram que três cepas de *Lc. lactis* mostraram ser sensíveis a pelo menos um fago, sendo uma cepa sensível a dois bacteriófagos distintos.

Neste teste de turbidez, foi observado também que não havia agentes inibidores (antibióticos, por exemplo) nas amostras de leite, soro e queijo de Coalho coletadas nas quatro Unidades de processamento, uma vez que todas as culturas testadas quando inoculadas com os filtrado tratados termicamente (FTT) apresentaram o mesmo crescimento (turbidez) do controle (somente o inóculo) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resultados para o teste de turbidez para as culturas lácticas de referência e para as cepas selvagens de *Lb. paracasei*, pertencentes à Coleção de Micro-organismos da Embrapa Agroindústria Tropical

Micro-organismo	Amostra	FNTT				FTT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>	UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>
<i>Lb. paracasei</i> 1	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 2	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 3	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 4	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 5	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 6	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 7	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 8	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 9	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 10	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. paracasei</i> 11	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. termophilus</i> ATCC 19258	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i> ATCC BAA 52	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. latis</i> ATCC 1996	Leite	+	+	+	+	+	+	+	+
	Soro	+	+	+	+	+	+	+	+
	Queijo	+	+	+	+	+	+	+	+

O sinal “+” indica que houve o crescimento da cepa quando inoculada juntamente com os filtrados (FTT e FNTT).



## 6. CONCLUSÕES

- As culturas lácticas de Referência e as 11 cepas de *Lactobacillus paracasei* pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical mostraram-se resistentes aos bacteriófagos selvagens presentes nas amostras de leite, soro e queijo de Coalho tanto das unidades produtoras industriais como das unidades artesanais.
- As 11 cepas de *Lb. paracasei* pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical foram também resistentes aos oito diferentes bacteriófagos da Coleção do INLAIN.
- A característica de resistência a bacteriófagos apresentada pelas 11 cepas de *Lb. paracasei* as classificam como promissoras para serem avaliadas na composição de um fermento láctico especificamente destinado para a fabricação de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, H.W.; CANTOR, E.D.; JARVIS, A.W.; LEMBKE, J.; MAYO, J.A. New species definitions in phages of gram positive cocci. **Intervirology**, v. 22, n. 4, p. 81 – 190, 1984.

ALLISON, G. E.; KLAENHAMMER, T. R. Phage resistance mechanism in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 207-226, 1998.

ALLWOOD, P. B.; MALIK, Y. S.; MAHERCHANDANI, S.; VOUGHT, K.; JOHNSON, L. A.; BRAYMEN, C.; HEDBERG, C.W.; GOYAL, S. M. Occurrence of *Escherichia coli*, noroviruses, and F-specific coliphages in fresh market-ready produce. **Journal Food Protection**, v. 67, n. 11, p. 2387-90, nov., 2004.

AQUINO, F. T. M. **Produção de queijo de Coalho no estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processo**. 1983, 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed., Washington. 1997.

ATAMER, Z.; DIETRICH, J.; MAREILE, M. M.; NEVE, H.; KNUT, J. H.; HINRICHS, J. Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 4, p. 228-235, ab., 2009,

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S.; Wright, A.; Ouwehand, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.

BARBOSA, S. S.; TRAJANO, H. M. R.; MORATORI, M. C. S.; LIMA, F. L. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, procedência e condições de higiene em que são comercializados o queijo de Coalho na cidade de Teresina – Piauí. In: Reunião Anual da SBPC, 57, Fortaleza. **Anais da 57<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC**, Fortaleza, Jul., 2005

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de Coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 2005, 222f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

BRADLEY, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. **Bacteriological reviews**, v. 31, n. 4, p. 230 – 314, dez., 1967.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES; M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO; M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de Coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.CEPPA**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 209-430, jul./dez., 2003.

BRASIL. **Instrução Normativa n° 30** de 26 de julho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de Coalho. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Disponível em: < [http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_coalho.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_coalho.htm) > Acesso em: 10 dez. 2009.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; LIMA, C. P.; KUAYE, A. Y. Avaliação de patogenicidade e atividade antagonista de bactérias lácticas (*Enterococcus*) isoladas de queijos de Coalho. CD do **XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Resumos**, 2008.

BURZUL, S.; ÖZTÜRK, P.; ALPAS, H.; AKCELIK, M. Thermal and chemical inactivation of lactococcal bacteriophages, **Food Science and Technology**, v. 40, n. 10, p. 1671-77, dez.,2007.

CAPRA, M. L.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. A. Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*. Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 100, n. 2, p. 334-342, fev., 2006.

CAPRA, M. L. **Bacteriofagos de *Lactobacillus casei/paracasei*. Caracterización y estudio de la fagorresistencia**. 2007, 249f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia Química. Universidade Nacional do Litoral. Santa Fé – Argentina, 2007.

CAPRA, M. L.; PATRIGNANI, F.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. A.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Effect of high pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 5, p. 336-41, mai., 2009.

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

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

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

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

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001

FEITOSA, T.; BRITO, J. R. F.; BORGES, SOUZA, M. F.; M. A. N.; SILVA, A. B.; MARIANO, B. C. C.; SILVA, R. S.; LIMA C. P.; CARVALHO, A. K. F.; CHINELATE, G. C. B.; BARROS, L. D.; LIMA, E. C.; PINHEIRO, T. F.; Incidência de Patógenos e Caracterização Físico-química do Queijo de Coalho Artesanal e Industrial. CD do **Simpósio IAFP América Latina** – Resumos, 2008.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2000. Cap. 5. p. 54-97.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/ 3, p. 105-122, 2003. Review.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo “Coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. **EXTENSIO - Revista Eletrônica de Extensão, Santa Catarina**, v. 6, n. 8, p. 35-49, dez., 2009

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.57, n.2, p.245-250, dez., 2005

GUGLIELMOTTI, D. M. **Fagos autóctonos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: caracterización y descripción de su interacción con sus cepas sensibles**. 2003, 198f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia Química. Universidade Nacional do Litoral, Santa Fé – Argentina, 2003.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages - New weapons for food safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, Apr., 2008.

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

HUSSAIN, K.; MASUD, T.; MAQSUD, S.; MAHMOOD, T. Characterization of *Lactococcus* Phages from Dahi Whey. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 689-694, 2008

LÁCTEA BRASIL. **Queijo: Alimento nobre e saudável**. Julho de 2006. Disponível em: < [www.lacteabrasil.org.br](http://www.lacteabrasil.org.br)> Acesso em: 20 dez 2010

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; SILVA, M. D.; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo “coalho” comercializado em Salvador (BA). Importância para a saúde pública. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 2, p. 38-41, nov., 2002.

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**. London. v. 21, n. 2, p. 233-240, abr., 2004.

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

McGRATH, S.; SINDEREN, D.; FITZGERALD, G. F. Bacteriophage-derived genetic tools for use in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 01, p. 3-15, 2002

McGRATH, S.; FITZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. van. Starter Cultures: Bacteriophage. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 163-189.

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

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

MILKNET - **Artigos Técnicos**. Relato de ataque de fagos em uma fábrica de queijos. Disponível em [http://www.milknet.com.br/default.php?pg=artigo\\_tecnico&id=5&local=1](http://www.milknet.com.br/default.php?pg=artigo_tecnico&id=5&local=1)  
Acesso em: 06 jun. 2008.

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**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, jul., 2001.

O'FLYNN, G.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3417-3424, jun., 2004.

ORIANI, M. R. G.; YOKOYA, F. *Lactococcus* Bacteriophages Isolated from Whey and Their Effects on Commercial Lactic Starters. **Brazilian Archives of Biology and technology** v. 47, n. 4, p. 559-568, ago., 2004.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo de coalho comercializado no município de Campinas - SP**. 2005. 122p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campina, 2005.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n. 2, p.293-300, mar./abr., 2004.

PIARD, J-C.; LE LOIR, Y.; POQUET, I.; LANGELLA, P. Bactérias lácticas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.II, n. 8, p. 80-84, mai/jun., 1999.

QUIBERONI, A.; AUAD, L.; BINETT, A. G.; SUÁREZ, V.B.; REINHEIMER, J.A.; RAYA, R. R. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p.461-469, ago., 2003.

QUIBERONI, A.; TREMBLAY, D.; ACKERMANN, H.W.; MOINEAU, S.; REINHEIMER, J.A. Diversity of *Streptococcus thermophilus* phages in a large-production cheese factory in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3791–3799, out., 2006.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.60, n.6, p.1517-1522, dez., 2008

SEBRAE. Queijos nacionais – Estudos de mercados. Série estudos de mercado sobre agronegócio. SEBRAE / ESPM. Out., 2008. 34p Disponível em:  
[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/\\$File/NT0003909E.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/$File/NT0003909E.pdf), Acesso em: 20 dez. 2009

SILLANKORVA, S. M. **Utilização de Bacteriófagos no Controle de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. 2004, 125f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente), Universidade do Minho, Portugal, 2004.

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

SUÁREZ, V.B.; QUIBERONI, A.; BINETT, A. G.; REINHEIMER, J.A. Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1597-1604, Oct., 2002.

SUÁREZ, V.B .; MOINEAU, S.; REINHEIMER, J.A.; QUIBERONI, A. Argentinean *Lactococcus lactis* bacteriophages: genetic characterization and adsorption studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 371-379, fev., 2008

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. G. Bacteriophage therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p.649-659, Mar., 2001

SVENSSON, U.; CHRISTIANSON, A. Methods for phage monitoring. Bull. **FIL-IDF** 263, 29-39, 1991

TAMANINI, R.; CAVALETTI, L. C. S.; ANGELA, H. L.; FAGNANI, R.; BATTAGLINI, A. P. P.; MONTEIRO, A. A.; MATSUBARA, M. T.; GIOMBELLI, C. J.; NERO, L. A.; BELOTI, V. Bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. **Anais do 35º CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado – RS, Out., 2008

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

TYNNKYNNEN, S., SATOKARY, R., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., SAXELIN, M. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Belfast, v. 65, n. 9, p. 3908–3914, Sept., 1999.

## 8. APÊNDICE

**Tabela A 1:** Identificação bioquímica e molecular dos isolados analisados

Nº	Nº isolado	Identificação Bioquímica	Identificação Molecular
1	270	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
2	483	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
3	1018	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
4	1024	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
5	1042	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
6	1120	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
7	1122	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
8	1131	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
9	1133	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
10	1134	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
11	1135	<i>Lactobacillus paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>

**Tabela A 2 -** Redução no percentual de ácido láctico produzido por culturas lácticas com a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNTT) após 6 horas de incubação.

Micro-organismo	Amostra	FTT				FNTT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>	UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>
<i>Lb. paracasei</i> 1	Leite	0,9	1,4	0,0	0,7	2,2	2,1	2,3	1,3
	Soro	1,3	2,1	2,2	2,6	0,7	0,5	2,9	0,7
	Queijo	0,0	0,0	2,7	0,0	0,6	0,0	0,0	1,8
<i>Lb. paracasei</i> 2	Leite	0,9	1,2	2,0	1,2	1,0	2,4	0,0	2,4
	Soro	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0
	Queijo	0,0	0,0	0,1	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lb. paracasei</i> 3	Leite	0,3	2,4	2,6	1,8	0,0	2,9	0,0	1,3
	Soro	1,8	2,6	0,0	2,4	0,8	2,5	2,0	0,7
	Queijo	0,4	0,8	2,4	0,0	0,3	0,0	0,3	2,1
<i>Lb. paracasei</i> 4	Leite	1,4	1,5	0,1	0,0	2,5	2,3	0,0	0,4
	Soro	3,6	0,0	0,8	0,0	2,8	2,5	0,0	0,7
	Queijo	1,2	3,4	0,5	0,5	0,5	3,4	1,1	1,4
<i>Lb. paracasei</i> 5	Leite	1,6	0,3	1,4	0,0	3,0	1,0	0,5	2,2
	Soro	0,0	0,7	1,3	3,0	0,4	3,1	0,0	0,1
	Queijo	0,7	1,7	0,0	0,8	0,0	0,0	0,9	0,0
<i>Lb. paracasei</i> 6	Leite	0,0	1,4	2,1	2,5	1,6	0,8	1,8	2,2
	Soro	0,0	2,9	0,0	1,1	0,0	0,0	0,5	1,0
	Queijo	1,7	0,0	2,7	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
<i>Lb. paracasei</i> 7	Leite	0,3	0,0	1,9	0,0	1,3	0,1	0,2	1,7
	Soro	1,2	0,3	1,7	1,9	0,0	0,0	0,7	0,0
	Queijo	0,0	2,8	1,5	0,7	0,0	0,0	2,3	1,3
<i>Lb. paracasei</i> 8	Leite	2,1	0,3	0,0	0,3	0,0	1,4	0,5	2,2
	Soro	1,7	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0
	Queijo	0,1	2,5	0,2	0,1	2,5	1,5	0,2	0,0
	Leite	0,0	2,5	0,0	2,9	2,0	0,7	1,4	1,1

**Tabela A 2** - Redução no percentual de ácido láctico produzido por culturas lácticas com a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNNT) após 6 horas de incubação (continuação)

Micro-organismo	Amostra	FTT				FNNT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>	UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>	UP <sub>3</sub>	UP <sub>4</sub>
<i>Lb. paracasei</i> 9	Soro	0,1	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	1,4	0,4
	Queijo	0,0	3,1	1,9	2,2	0,4	1,7	0,0	0,0
	Leite	1,3	0,0	3,1	0,0	0,3	0,3	1,5	2,1
<i>Lb. paracasei</i> 10	Soro	0,0	2,4	2,1	2,4	0,1	2,2	2,6	0,0
	Queijo	0,0	0,5	2,9	0,4	0,0	0,0	0,1	0,8
	Leite	1,4	0,0	0,0	0,0	0,4	0,3	0,0	0,0
<i>Lb. paracasei</i> 11	Soro	2,3	1,6	2,5	1,6	1,3	2,7	2,0	2,2
	Queijo	2,0	0,1	1,4	0,0	0,5	0,0	1,8	0,0
	Leite	0,0	0,0	2,2	1,2	0,6	0,0	0,2	1,1
<i>S. termophilus</i> ATCC 19258	Soro	0,0	1,8	1,6	0,0	3,3	0,0	2,6	0,6
	Queijo	0,0	1,6	0,8	1,9	2,1	0,0	3,0	1,0
	Leite	0,0	2,8	0,0	1,6	0,3	0,0	2,4	0,0
<i>L. paracasei</i> ATCC BAA 52	Soro	0,0	0,0	0,9	0,7	0,0	0,0	2,7	0,3
	Queijo	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	1,6	1,3
	Leite	1,4	0,0	0,0	2,7	1,5	0,7	2,0	2,7
<i>L. latis</i> ATCC 1996	Soro	0,0	0,0	1,8	1,4	1,2	0,0	0,9	0,9
	Queijo	0,0	0,0	1,7	0,4	0,0	0,0	1,9	2,0

**Tabela A 3** - Diferença de pH do leite após o crescimento das culturas lácticas inoculadas com e sem a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNNT) após 6 horas de incubação.

Micro-organismo	Amostra	FTT				FNNT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>						
<i>Lb. paracasei</i> 1	Leite	0,02	0,00	0,01	0,00	0,06	0,00	0,05	0,00
	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,13	0,03
	Queijo	0,04	0,00	0,06	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00
<i>Lb. paracasei</i> 2	Leite	0,00	0,00	0,09	0,03	0,04	0,16	0,15	0,13
	Soro	0,00	0,00	0,18	0,07	0,01	0,12	0,17	0,04
	Queijo	0,00	0,00	0,14	0,11	0,05	0,10	0,06	0,02
<i>Lb. paracasei</i> 3	Leite	0,09	0,05	0,12	0,06	0,15	0,13	0,16	0,09
	Soro	0,01	0,03	0,03	0,07	0,07	0,09	0,04	0,08
	Queijo	0,11	0,01	0,05	0,13	0,08	0,06	0,17	0,14
<i>Lb. paracasei</i> 4	Leite	0,12	0,06	0,00	0,04	0,05	0,16	0,11	0,01
	Soro	0,13	0,09	0,07	0,02	0,04	0,15	0,00	0,17
	Queijo	0,14	0,00	0,17	0,01	0,09	0,08	0,06	0,03
<i>Lb. paracasei</i> 5	Leite	0,03	0,01	0,18	0,03	0,12	0,07	0,06	0,07
	Soro	0,05	0,02	0,12	0,08	0,13	0,11	0,02	0,05
	Queijo	0,14	0,04	0,08	0,00	0,02	0,09	0,05	0,03
<i>Lb. paracasei</i> 6	Leite	0,07	0,07	0,04	0,12	0,09	0,05	0,15	0,02
	Soro	0,04	0,00	0,18	0,09	0,01	0,13	0,03	0,01
	Queijo	0,06	0,03	0,00	0,11	0,11	0,05	0,09	0,04

**Tabela A 3** - Diferença de pH do leite após o crescimento das culturas lácticas inoculadas com e sem a adição do filtrado tratado termicamente (FTT) e do filtrado não tratado termicamente (FNNT) após 6 horas de incubação (continuação)

Micro-organismo	Amostra	FTT				FNNT			
		UP <sub>1</sub>	UP <sub>2</sub>						
<i>Lb. paracasei</i> 7	Leite	0,19	0,06	0,07	0,01	0,10	0,12	0,13	0,03
	Soro	0,12	0,17	0,05	0,14	0,02	0,03	0,01	0,07
	Queijo	0,08	0,13	0,11	0,03	0,04	0,08	0,02	0,09
<i>Lb. paracasei</i> 8	Leite	0,09	0,19	0,04	0,04	0,06	0,05	0,01	0,01
	Soro	0,04	0,00	0,00	0,05	0,02	0,01	0,12	0,00
	Queijo	0,11	0,04	0,17	0,08	0,10	0,13	0,07	0,06
<i>Lb. paracasei</i> 9	Leite	0,08	0,10	0,05	0,00	0,07	0,08	0,18	0,04
	Soro	0,02	0,09	0,02	0,03	0,06	0,07	0,11	0,12
	Queijo	0,06	0,14	0,03	0,05	0,05	0,01	0,07	0,14
<i>Lb. paracasei</i> 10	Leite	0,12	0,12	0,08	0,07	0,15	0,11	0,05	0,06
	Soro	0,17	0,04	0,13	0,12	0,12	0,06	0,03	0,15
	Queijo	0,19	0,05	0,14	0,15	0,13	0,04	0,01	0,10
<i>Lb. paracasei</i> 11	Leite	0,02	0,07	0,13	0,01	0,09	0,10	0,00	0,13
	Soro	0,14	0,08	0,07	0,02	0,03	0,19	0,04	0,09
	Queijo	0,11	0,00	0,09	0,06	0,10	0,00	0,10	0,07
<i>S. termophilus</i> ATCC 19258	Leite	0,00	0,00	0,08	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00
	Soro	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	Queijo	0,00	0,00	0,03	0,11	0,01	0,02	0,02	0,01
<i>L. paracasei</i> ATCC BAA 52	Leite	0,02	0,06	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,02
	Soro	0,00	0,11	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	0,02
	Queijo	0,04	0,03	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>L. latis</i> ATCC 1996	Leite	0,12	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
	Soro	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01
	Queijo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,04	0,00	0,01