

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE
Lactobacillus helveticus ISOLADOS DE SORO-
FERMENTO DE LATICÍNIOS BRASILEIROS**

DAISE APARECIDA ROSSI

2001

DAISE APARECIDA ROSSI

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE
Lactobacillus helveticus ISOLADOS DE SORO-
FERMENTO DE LATICÍNIOS BRASILEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos, para obtenção do título de
"Doutor"

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Rossi, Daise Aparecida

Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros / Daise Aparecida

Rossi. -- Lavras : UFLA, 2001.

99 p. : il.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Lactobacillus helveticus*. 2. Diversidade. 3. RAPD. 4. Identificação. 5. Perfil de fermentação. 6. Hidrolase de peptidoglicanos. 7. Autólise. 8. Bactéria láctica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.3

-664.07

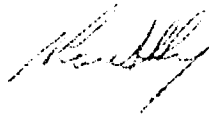
DAISE APARECIDA ROSSI

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE
Lactobacillus helveticus ISOLADOS DE SORO-
FERMENTO DE LATICÍNIOS BRASILEIROS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Curso de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos, para obtenção do título de
"Doutor".

APROVADA em 30 de julho de 2001

Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho	ILCT/EPAMIG
Profª. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho	UFLA
Prof. Dr. Nilson Penha Silva	UFU
Prof. Dr. Laerte P. de Almeida	UFU



Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**Às minhas amigas Jpsy e Valdirene,
Pelo auxílio constante e amizade,**

OFEREÇO

**A meu marido, Edson, pelo incentivo,
amor, apoio e capacidade de entender
minha necessidade em aprender**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradecer é uma das atitudes mais prazerosas a que temos direito quando chegamos ao final de um trabalho e, observamos em volta, tantas pessoas que contribuíram para que ele fosse realizado. Provavelmente, os agradecimentos que deixarei aqui não conseguirão exprimir a todos vocês o quanto sou grata.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, representado por seus professores e funcionários, pela oportunidade e pela agradável convivência.

A meu orientador, Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pela amizade e incentivo à finalização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho, pelo carinho e atenção na orientação, demonstrados por deixar tantas vezes seus afazeres, para me emprestar seus conhecimentos e conselhos, encontrando sempre uma palavra de incentivo na hora certa.

Ao Prof. Dr. Nilson Penha Silva, pelo auxílio e orientação segura, me dando a oportunidade não só de melhorar meus conhecimentos técnicos, como também conviver com um ser humano admirável, preocupado com a coletividade e com os idosos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, que permitiu a utilização de seu laboratório, esclareceu dúvidas e acrescentou idéias, e sobretudo, encontrou tempo entre seus inúmeros compromissos para me atender.

Ao Prof. Dr. Laerte Pereira de Almeida, pelas idéias, auxílio na correção e pelas enriquecedoras discussões filosóficas sobre estatística, obrigada pela ajuda e pela presença.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti que, além do auxílio técnico indispensável nas técnicas microscópicas, sugeriu estudos futuros e auxiliou na correção. Também ao Elgio, técnico em microscopia, pela boa vontade em ensinar.

Ao Dr. Múcio Mansur Furtado, pela idéia original e competência, pois apesar de não ter participado diretamente na execução desse trabalho, sempre que solicitado sugeriu de forma clara e precisa, caminhos a serem seguidos.

À Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, pela atenção e ajuda na correção. Sempre que precisei, pude contar com seus conhecimentos e amizade.

Também, à Profa. Dra. Ednéia de Carvalho, que me despertou a curiosidade pelas técnicas eletroforéticas utilizadas, assim como, pela valiosa contribuição na montagem do projeto.

Ao competente profissional Dr. Gismar Silva Vieira, pela ajuda na execução dos protocolos moleculares, correções, opiniões e, sobretudo, pela capacidade em apontar soluções.

Ao biólogo Gilvan, por empregar seu tempo e seus conhecimentos em eletroforese de proteínas e contribuir com este trabalho. Sua ajuda foi essencial.

Aos meus amigos da UFU, Adélia, Célia, Francesca, Cléa, Helena, Fernanda, Beth, Sonia, Liana e Profa. Sueli, que sempre me incentivaram, ajudaram e apoiaram.

À Profa. Dra. Vânia Déa de Carvalho, pelo carinho sincero e à secretária Gicelda, pela amizade, disponibilidade e incentivo.

A todos companheiros de pós graduação, em particular ao Celso, amigo de todas as horas, Fernando Magalhães, Maria de Lourdes “Imaculada” e Sandra Maria. Tenho certeza que posso contar com vocês.

À minha amiga Gaby que, além do incentivo, me hospedou, foi procuradora, despachante e tudo o mais que necessitei. Sua amizade e cooperação foram essenciais.

Às orientadas, estagiárias e amigas, Jpsy e Valdirene. Vocês não contribuíram para este projeto, mas sim trabalharam com o mesmo afinho que teriam se ele fosse de vocês. Obrigada pelos fins de semana e noites no laboratório, pela dedicação e pela amizade. Agradeço também às estagiárias Renata, Franciele, Cláudia, Fabiana e Luciana, pela ajuda e amizade.

À minha amiga Adriana, sempre presente nas minhas vitórias e apuros na UFLA. Obrigada por seu carinho e cooperação.

Aos laticínios Tânia, Central, Cruzília, Serrabela e Skala, por fornecerem as amostras e responderem ao questionário.

A Deus, sem Ele, nada seria possível.

À minha família, Dr. Paulo, Sônia e minha mãe querida, vocês sempre me incentivaram.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com a elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 O gênero <i>Lactobacillus</i>	5
2.2 <i>Lactobacillus helveticus</i>	7
2.2.1 Isolamento e caracterização.....	8
2.2.2 Diversidade	13
2.2.3 Comportamento na fermentação.....	16
2.2.4 Atividade proteolítica e autólise.....	18
2.3 Soro-fermento natural.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Obtenção das amostras de soro-fermento.....	24
3.2 Análises do soro-fermento e isolamento dos lactobacilos termófilos.....	24
3.3 Identificação dos isolados.....	26
3.4 Correlação entre unidades formadoras de colônias e densidade óptica.....	28
3.5 Padrão de peptidoglicanos em gel de eletroforese SDS-PAGE	28
3.6 Análise molecular.....	30
3.6.1 Extração do DNA genômico.....	30
3.6.2 Seleção dos <i>primers</i>	31
3.6.3 Análise RAPD.....	32

3.7 Características tecnológicas.....	32
3.7.1 Produção de lactato	32
3.7.2 Tolerância ao sal e resistência ao calor.....	33
3.8 Determinação de cepas autolíticas.....	34
3.8.1 Microscopia.....	35
4.3 Variação no pH dos queijos Parmesão	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Sôro-fermento.....	37
4.2 Características gerais.....	37
4.1.2 Seleção de lactobacilos termófilos.....	40
4.1.3 Caracterização dos microrganismos isolados.....	42
4.2 Correlação entre unidades formadoras de colônias e densidade óptica.....	49
4.3 Padrão de hidrolases de peptidoglicanos em gel SDS-PAGE.....	51
4.4 Análise molecular.....	55
4.4.1 Extração do DNA.....	55
4.4.2 Seleção dos <i>primers</i>	55
4.4.3 Análise dos padrões de amplificação com os <i>primers</i> selecionados.....	56
4.5 Características tecnológicas.....	64
4.5.1 Produção de ácido láctico.....	64
4.5.2 Decaimento do pH em meio MRS.....	67
4.5.3 Tolerância ao sal	74
4.5.4 Resistência ao tratamento por 55 ° C e 65 ° C por 30 minutos....	76
4.5.5 Autólise celular.....	78
5 CONCLUSÕES.....	89
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CNRZ	<i>Centre National de Recherches Zootechniques</i>
NCDO	<i>National Collection of Dairy Organisms</i>
CRL	Centro de Referência em Lactobacilos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
PCR	Reação da polimerase em cadeia
RAPD	Padrão de amplificação ao acaso de fragmentos de DNA
RNA	Ácido ribonucléico
UPGMA	<i>Unweighted pair-group method arithmetic averages</i>
sp.	Indica que a bactéria pertence a um gênero (que o nome precede essa abreviação), mas não a uma espécie identificada
spp.	Utilizado depois de um nome genérico, se refere a várias espécies do gênero citadas anteriormente
µg	Micrograma
µL	Microlitro
DO	Densidade óptica
EDTA	Sal dissódico do ácido etileno diamino tetra acético
kDa	Quilodaltons
pb	Pares de base
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
rpm	Rotações por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

ROSSI, Daise Aparecida. Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros. LAVRAS : UFLA, 2001. 99p. (Tese – Doutorado em Ciência dos Alimentos)*

As culturas lácticas utilizadas na produção de queijos são exógenas e selecionadas por sua adaptação a diferentes ecossistemas. Culturas endógenas, como as que fermentam o soro fermento natural, se isoladas e caracterizadas, podem ser utilizadas pelas indústrias se apresentarem perfis tecnológicos de interesse, como produção de ácido, autólise, tolerância ao sal e resistência às temperaturas a que são submetidas na fabricação dos queijos, além de preservar a biodiversidade. Vinte e nove lactobacilos termófilos isolados de cinco laticínios diferentes e duas cepas comerciais de *Lactobacillus helveticus* foram identificados por meio do perfil de fermentação utilizando galerias API CH50. As cepas comerciais e quinze isolados endógenos puderam ser classificados fenotipicamente como *Lactobacillus helveticus*. Nas demais cepas, os perfis indicaram: 2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 4 *Lactobacillus fermentum* e 7 *Lactobacillus* sp. No padrão de hidrolases de peptidoglicanos em SDS-PAGE, todas as cepas de *L. helveticus* mostraram perfil típico, apresentando bandas líticas características de 42 e 30 kDa. Porém, na caracterização das outras cepas isoladas, mostrou bandas de difícil visualização, não permitindo a identificação segura. O estudo da diversidade genética pela técnica RAPD de onze cepas de *L. helveticus* endógenos e as duas cepas comerciais permitiu verificar que cepas procedentes do mesmo ecossistema tenderam a se manter em grupos, com exceção de uma cepa. As cepas que apresentaram maior similaridade (90%), foram as duas comerciais. Os demais isolados formaram grupos com distância genética de 18%, 25% e 43% entre si. Todas as cepas foram capazes de crescer em meio de cultura MRS suplementado com 2% (p/v) de cloreto de sódio. Porém, somente três cepas apresentaram crescimento efetivo em meio suplementado com 3%, o crescimento em 4% foi inexpressivo e nenhuma das cepas estudadas foi capaz de crescer em concentrações de 5% e 6% de cloreto de sódio. Todos os isolados resistiram ao tratamento térmico por 30 minutos a 55°C, porém, a 65°C, três

*Comitê Orientador: Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador), Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho – ILCT/EPAMIG, Prof. Dr. Nilson Penha Silva (UFU), Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU).

cepas não apresentaram crescimento. A tolerância ao sal e à temperatura não demonstrou nenhuma correlação com as associações apontadas pela análise RAPD. A produção de ácido láctico em leite desnatado foi diferente para as cepas estudadas ($p < 0,05$), variando de 0,73% a 1,78%, após 24 horas de incubação a 37°C, e 0,99% a 2,35%, após 48 horas. Apesar da variabilidade na produção de lactato, todas as cepas foram hábeis em coagular o leite após 24 horas, já que o pH determinado foi $\leq 4,6$. A produção de ácido láctico em leite desnatado não mostrou correlação com a similaridade genética apontada pelo padrão de amplificação de fragmentos do DNA-RAPD. O abaixamento do pH foi acompanhado por até 52 horas em meio MRS e analisado através de gráficos, demonstrando um comportamento de decaimento exponencial. O agrupamento dos gráficos das cepas que mostraram similaridade pela análise RAPD, indicaram um comportamento similar, porém, a metodologia empregada não permitiu estabelecer correlação significativa. O abaixamento do pH do meio MRS até o valor 4,0 em função do tempo em horas, avaliado pelo paralelismo das retas de regressão, demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos de *L. helveticus*.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Lactobacillus helveticus*, diversidade, fermentação, RAPD, soro-fermento, caracterização fenotípica, ácido láctico.

ABSTRACT

ROSSI, Daise Aparecida. Isolation, identification and characterization of biodiversity of de *Lactobacillus helveticus* isolated from fermented whey of Brazilian dairy plants. LAVRAS : UFLA, 2001. 99p. (Thesis - Doctorate in Food Science)*

Starter cultures usually utilized in cheese production are exogenous and selected by their adaptation in different ecosystems. Endogenous cultures, such as those which ferment natural whey, when isolated and characterized, can be utilized in cheese manufacturing if they possess technological interest, like acid production, autolysis, salt tolerance and resistance to temperatures utilized in cheese manufacturing, as well as the capacity to preserve the biodiversity. Twenty nine lactobacilos thermophilus, isolated from 5 different dairy plants and 2 commercial strains of *Lactobacillus helveticus* were identified by their fermentation profile utilizing the API 50 CH. The commercial strains and 15 endogenous isolates could be phenotypically classified as being *Lactobacillus helveticus*. The other strains, the profiles indicated: 2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 1 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 4 *Lactobacillus fermentum* e 7 *Lactobacillus* sp. In the peptidoglycans hydrolases pattern in SDS-PAGE all strains of *L. helveticus* showed a typical profile, presenting characteristic lytic bands of 42 e 30 kDa, however in the characterization of other isolated strains, appeared bands of difficult visualization, impairing a definite identification. The genetic diversity study using RAPD technique of 11 strains of endogenous *L. helveticus* and the two commercial strains, allowed to verify that strains from the same ecosystem, had a trend to maintain in groups, with exception of single studied strains. The two commercial strains presented the higher similarity (90%). The other isolates formed groups with genetic distance of 18%, 25% e 43% among them. All strains were able to grow in MRS medium supplemented with 2% of salt, however, only 3 strains presented effective growth with 3%, being the growth with 4% inexpressive and none of the studied strains was capable to grow in Sodium Chloride concentrations of 5% and 6%. All isolates resisted heat treatment of 55°C for 30 minutes, however at 65°C, 3 strains did not grow. The tolerance to salt and temperature did not demonstrate strains any correlation

*Guidance Committee: Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu - UFLA (Orientador), Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho - ILCT/EPAMIG, Prof. Dr. Nilson Penha Silva (UFU), Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU).

with the associations indicated by the RAPD analysis. The acid lactic production in skim milk was different for the studied strains ($p < 0.05$), varying from 0,73% to 1,78% after 24 hours of incubation at 37°C and 0,99% at 2,35% after 48 hours. Despite of the variability in lactate production, all strains were able in coagulate the milk after 24 hours, once the pH was $\leq 4,6$. The acid lactic production in skim milk did not show correlation with the genetic similarity demonstrated by the pattern of fragment amplification of the DNA-RAPD. The pH decreasing was followed until 52 hours in MRS medium and plotted in a graph, displaying a exponential decaying behavior. The grouping of graphs, of the strains that showed similarity in the RAPD analysis, indicated a similar behavior, but the utilized methodology did not allow to stablish a significant correlation. The pH lowering of MRS medium up to 4,0 value in function of time in hours, evaluated through the parallelism of regression lines, showed significant differences ($p < 0,05$) among the groups of *L. helveticus*.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Lactobacillus helveticus*, diversity, fermentation, RAPD, natural whey starters, phenotypic characterization, lactic acid.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é dependente da importação das culturas lácticas utilizadas como fermento na produção de queijos e outros alimentos. Essas culturas são exógenas e selecionadas por sua capacidade de adaptação nos diferentes ecossistemas. Atualmente, observa-se interesse de alguns pesquisadores em isolar culturas endógenas de produtos de laticínios ou do próprio leite, resultantes da seleção natural a que são submetidas em seu ecossistema de origem.

Pesquisas visando o isolamento de bactérias lácticas mesófilas têm sido realizadas com sucesso em algumas regiões de Minas Gerais, como do Serro, São Roque de Minas e Campo das Vertentes, principalmente, com espécies de *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Furtado, 1990b; Chaves et al., 1991; Oliveira et al., 1998) e com bactérias propiônicas (Netto, 1997; Neves et al., 1998). Porém, isolamento de bactérias termófilas endógenas de interesse industrial não tem sido até o presente momento objeto de pesquisas no Brasil.

Várias bactérias lácticas termófilas são de interesse da indústria de alimentos, em geral, e a de laticínios, em particular. Dentre elas, destaca-se o *Lactobacillus helveticus*, o qual apresenta capacidade de produzir grandes quantidades de ácido láctico a partir da lactose e, ainda, atividade lipolítica e proteolítica (Arnaud e Giraud, 1985). Esse microrganismo, em mistura com outros ou isoladamente é utilizado na produção de diferentes variedades de queijos de massa cozida ou semi-cozida, devido às suas características de resistência térmica aos processos de cozimento da massa (Furtado, 1990a).

O *L. helveticus* pode ser isolado em diferentes ecossistemas, como de soro fermento natural, de leites fermentados ou de queijos fabricados com leite não pasteurizado (Pescic, 1991; Bosi et al., 1991; Bottazzi et al., 1992; Neviani e Carini, 1994), sendo a utilização do soro fermento comum em alguns laticínios

brasileiros. Além disso, algumas cepas de *L. helveticus* ainda apresentam uma característica adicional, a de sintetizar compostos inibidores específicos (bacteriocinas), que podem dificultar o desenvolvimento de alguns microrganismos patogênicos ou não desejáveis. Essa característica, somada à capacidade de produzir grande quantidade de ácido láctico, pode inibir o crescimento da microbiota indesejável acompanhante (Torriani et al., 1994). Por serem altamente acidúricos e termorresistentes, *L. helveticus* predominam no soro fermento obtido da fabricação de queijos em que a massa é submetida a altas temperaturas e o soro não é conservado sob refrigeração.

Atualmente, cepas de *Lactobacillus helveticus* estão sendo selecionadas e estudadas para utilização em colunas de fermentação, produção de ácido láctico, como aceleradores de maturação em queijos, produção de bacteriocinas e também para uso em combinação com outros microrganismos para fabricação de mussarela com baixo efeito *browning* (Mukherjee e Hutkins, 1994; Matzdorf et al., 1994). Nesses estudos, são observadas para seleção, a resistência a fagos (Carminati et al., 1993), resistência ao calor, temperatura de crescimento, atividade proteolítica e lipolítica (Ling et al., 1994; Ardo e Jonsson, 1994, Kim et al., 1997), produção de ácido (Bouton et al., 1993; Norton et al., 1994a), autólise (Ammar et al., 1994), produção de bacteriocinas (Yamamoto et al., 1994), capacidade de metabolizar a galactose (Mukherjee e Hutkins, 1994; Matzdorf et al., 1994) e outras características desejáveis.

Diversos estudos têm comprovado que o soro fermento é composto por uma mistura de bactérias termófilas, com predominância de *Lactobacillus helveticus* (Neviani e Carini, 1994; Torriani et al., 1994; Giraffa et al., 1998). Soro fermento é tradicionalmente empregado na Itália na fabricação de queijos grana padano e parmigiano reggiano e, no Brasil, é utilizado em alguns laticínios, na produção de queijos como parmesão, provolone e queijos regionais. Muitas vezes, queijos fabricados com soro fermento apresentam

características desejáveis superiores aos que utilizam fermentos lácticos comerciais, provavelmente, pela presença de microrganismos endógenos, melhor adaptados, por serem naturais do ecossistema.

O isolamento e conhecimento da microbiota termófila predominante nos fermentos naturais, como o soro fermento, seu comportamento na produção de ácido láctico, resistência à temperatura e frente a outras condições a que são submetidos na tecnologia de fabricação, tornarão possível o desenvolvimento de estudos no sentido de controlar os fenômenos bioquímicos que ocorrem durante a maturação dos queijos. *L. helveticus* endógenos, isolados e caracterizados, poderão ser utilizados na fabricação de queijos de massa cozida, como o provolone e parmesão, em indústrias onde hoje é utilizado o soro fermento, mantendo suas características desejáveis de produção de ácido e lipólise, porém, permitindo a padronização do produto. Além disso, o isolamento desses microrganismos preserva a biodiversidade já que com a introdução de culturas exógenas comerciais, há tendência de desaparecimento dos microrganismos selvagens ou endógenos. A detecção da diversidade, intra e infra populações, é uma das maiores contribuições que os geneticistas conservacionistas podem dar para a avaliação da variabilidade genética, permitindo prever consequências de fluxo e perda de genes em populações fragmentadas (Campos, 1999).

Devido às possíveis utilizações de culturas isoladas de *L. helveticus* na indústria de laticínios e aptidão tecnológica para fabricação de queijos e, ainda, da preservação da biodiversidade, este estudo possui como objetivos:

- isolar cepas de *Lactobacillus helveticus* de soro fermento natural, provenientes de diferentes ecossistemas;
- realizar sua identificação por meio de características fenotípicas como perfil de carboidratos e padrão eletroforético de hidrolases de peptidoglicanos de parede celular em SDS-PAGE;

- **estimar a biodiversidade entre as diferentes culturas de *L. helveticus* isoladas utilizando o padrão de amplificação de fragmentos de DNA-RAPD;**
- **mensurar características de interesse tecnológico, como tolerância a diferentes concentrações de cloreto de sódio, produção de ácido lático e resistência ao calor;**
- **verificar a presença de cepas autolíticas.**

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Lactobacillus*

De acordo com o Bergey's Manual of Determinate Bacteriology, o gênero *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram positivos, regulares e não esporulados. Possuem morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos (Kandler e Weiss, 1986). Também é freqüente a forma de cocobacilos, sendo comum a formação de cadeias. A motilidade não é usual, e quando presente, dá-se por meio de flagelos peritríquicos. Algumas cepas exibem corpo bipolar, granulações internas ou aparência de baga, com reação à coloração de Gram ou azul de metileno. Os grandes corpos bipolares provavelmente contêm polifosfato e aparecem muito densos quando observados por meio de microscópio eletrônico. O tamanho dos bacilos e o grau de curvatura é dependente da idade da cultura. Formas irregulares são observadas em crescimento simbiótico ou sobre alta concentrações de glicina, D-aminoácidos ou antibióticos com ação na parede celular. A porcentagem de G+C do DNA é 32-53.

O metabolismo fermentativo dos lactobacilos produz como produto final do carbono, o lactato, que usualmente não é fermentado. Produtos adicionais são acetato, etanol, CO₂, formato ou succinato. Não são produzidos ácidos voláteis com mais de dois átomos de carbono (Sneath et al., 1994).

Os *Lactobacillus* são microaerófilos e, quando em crescimento na superfície em meios sólidos, geralmente o desenvolvimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzido e 5% a 10% de CO₂; alguns são anaeróbios em isolamento. Nos meios usuais de crescimento, os lactobacilos raramente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo. Crescem em temperaturas que variam de 2°C a

53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2; o crescimento ocorre a 5,0 ou menos. A taxa de crescimento é freqüentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos. Nas diversas espécies, a redução do nitrato não é usual, podendo acontecer porém, quando o pH terminal é estabilizado acima de 6,0 (Kandler e Weiss, 1986)

Normalmente, lactobacilos não possuem capacidade de liquefazer a gelatina ou digerir a caseína, mas pequena quantidade de nitrogênio solúvel é produzida por muitas espécies. Indol e H₂S não são produzidos e as provas de catalase e o citocromo são negativos, devido à ausência de porfirina. Todavia, algumas cepas decompõem peróxidos por uma pseudo-catalase e a reação da benzidina é negativa. São encontrados em derivados do leite, grãos, produtos de carne e peixe, água, esgoto, cerveja, vinho, frutas e suco de frutas, conservas de vegetais, silagem, chucrute e massas fermentadas. Fazem parte da microbiota normal da boca, trato intestinal e vagina de alguns animais homotérmicos, incluindo o homem, sendo a patogenicidade rara (Sneath *et al.*, 1986).

Os lactobacilos são organismos extremamente fastidiosos e adaptados a complexos substratos orgânicos. Eles não só requerem carboidratos como energia e fonte de carbono, mas também nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas. O requerimento de ácido fólico, riboflavina, fosfato de piridoxina e ácido p-aminobenzóico é difundido entre várias espécies, sendo a riboflavina o composto mais freqüentemente requerido. Biotina e vitamina B₁₂ são essenciais somente para algumas espécies. Cepas vitamina-dependentes são comumente utilizadas em bioensaios de vitaminas e são listadas em catálogos de muitas coleções de culturas. Os padrões de aminoácidos também diferem entre espécies e até entre cepas (Kandler e Weiss, 1986).

Na formulação de meios de cultura para o gênero, deve-se observar que a carne é um nutriente essencial quando o meio contém carboidratos fermentáveis, peptona, extrato de levedura e extrato de carne. A suplementação

dos meios com suco de tomate, manganês, acetato e ésteres de ácido oléico, especialmente Tween 80 é estimulante ou até essencial para muitas espécies. Estes compostos estão incluídos no meio extensamente utilizado para crescimento e isolamento formulado por Man, Rogosa e Sharp (1960), o meio MRS.

A dificuldade na classificação é discutida por diversos autores, já que o gênero *Lactobacillus* comporta mais de 50 espécies, sendo algumas, muito distantes geneticamente umas das outras e outras altamente relacionadas, variando somente na extensão da fermentação de alguns carboidratos (Lortal et al., 1997; Torriani et al., 1994; Kandler e Weiss, 1986). Rearranjamento da taxonomia do gênero são esperados (Taillez et al., 1996; Torriani et al., 1994; Stackebrandt e Teuber, 1987; Gasser, 1970).

2.2 *Lactobacillus helveticus*

Os *L. helveticus* apresentam bom crescimento de 40°C a 45°C com máximo a 50°C a 52°C, mas não se desenvolvem em temperaturas inferiores a 15°C. Geralmente resistem a temperaturas de 60°C por 90 minutos (Furtado, 1990). Os fatores essenciais para crescimento são cálcio, pirodoxal ou piridoxamina, sendo que ácido fólico, vitamina B₁₂ e tiamina não são requeridos (Kandler e Weiss, 1996).

L. helveticus utilizam, para fermentar a lactose, a via glicolítica ou Embden-Meyerhof-Parnas, sendo a redução do ácido pirúvico a ácido láctico catalisada pela enzima lactato desidrogenase (Arnaud e Guiraud, 1985). São homofermentativos e fortes produtores de ácido láctico, fermentando a lactose até concentrações de aproximadamente 2,7% (Furtado, 1990a). Torriani et al. (1994) consideram que esses microrganismos produzem ácido láctico em concentrações maiores que 2%. De fato, Fortina et al. (1998) verificaram que há diferenças na capacidade de acidificação em cepas de *L. helveticus* e

recomendam que essa característica deve ser utilizada para seleção de culturas para perfis biotecnológicos de interesse.

Na caracterização fenotípica, o *L. helveticus* é geralmente imóvel e quanto ao perfil de fermentação de carboidratos, pertence ao grupo I das espécies obrigatoriamente homofermentativas. Não fermentam amigdalina, arabinose, celobiose, esculina, gluconato, manitol, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, salicina, sorbitol, sacarose e xilose (90% ou mais das cepas negativas). Fermentam a galactose, glicose e lactose (90% ou mais cepas positivas), 11 a 89% das cepas positivas para frutose, maltose, manose e trealose e fermentação variável do N-acetil-glicosamina (Torriani et al., 1994).

Na homologia DNA/DNA, *L. helveticus* formam um estreito grupo homólogo genomicamente, junto com cepas antigamente denominadas "*L. jugurti*", mas não próxima a cepas *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. gasseri*. A filogenia relacionada entre *L. helveticus* e *L. acidophilus* é indicada pela porcentagem de homologia de DNA de 20% a 30% entre as duas espécies. Para confirmar essa proximidade, sondas de DNA espécie-específicas para detecção de *L. helveticus* foram construídas, e os autores, observaram fraca hibridação com o DNA de algumas estirpes de *L. acidophilus*, confirmando a fechada relação filogenética entre essas duas espécies de lactobacilos (Pilloud e Mallet, 1990).

2.2.1 Isolamento e caracterização

L. helveticus podem ser obtidos de leite fermentado, soro-fermento, fermentos lácticos e queijos como emmental, gruyère, parmesão e provolone. Estudos recentes demonstram, que apesar de *L. helveticus* apresentarem baixa resistência a bile *in vitro*, pode sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de humanos. Essa constatação pode representar inúmeras novas aplicações potenciais para essa espécie (Shinoda et al., 2001). Várias outras características

têm sido estudadas em *L. helveticus*, inclusive a capacidade de algumas cepas produzirem na fermentação do leite ou soro, peptídios com capacidade hipotensora semelhante à enzima conversora de angiotensina, característica confirmada em testes realizados em ratos (Yamamoto et al., 1994).

O isolamento dos lactobacilos termófilos não apresenta dificuldade, podendo ser utilizado, para esse fim, o meio MRS com pH ajustado em 5,4, incubado em anaerobiose a 43°C por 24 a 48 horas. Esse meio atende às exigências nutricionais da maioria dos lactobacilos e não contém nenhum agente inibidor. Quando utilizado na temperatura e pH indicados, realmente seleciona somente os lactobacilos termófilos acidúricos (Kandler e Weiss, 1986; Lortal et al., 1992)

A diferenciação do *L. helveticus* de outros lactobacilos termofílicos, porém, tem sido considerada uma etapa complexa. Para diferenciação é comum a observação dos fenótipos apresentados em provas de fermentação de açúcares que, associadas à temperatura mínima de crescimento, podem ser utilizadas em chaves de identificação, como as organizadas por Hammes et al., (1992).

O Bergey's Manual of Systematic Bacteriology coloca o *L. helveticus* no grupo de espécies obrigatoriamente homofermentativas, fermentando hexoses quase completamente a ácido láctico, seguindo a via glicolítica e não utilizando as pentoses (Kandler e Weiss, 1986). A habilidade do *L. helveticus* (galactose positiva) de utilizar a galactose pode ser utilizada para sua diferenciação de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* (galactose negativa). Porém, deve-se levar em consideração que cerca de 10% ou mais das cepas de *L. helveticus* podem ser inábeis em fermentar completamente a galactose (Torriani et al., 1994). Além da diferenciação, esse fato é considerado muito importante, já que a acumulação e subsequente metabolismo da galactose por bactérias não lácticas indesejáveis podem conduzir a uma maturação atípica ou defeitos em queijos,

como o escurecimento da mussarela (Jonhson e Olson, 1985; Mukherjee et al., 1994; Matzdorf et al., 1994; Furtado, 1997).

Somente a utilização de perfis de fermentação para identificação de *L. helveticus* pode conduzir a erros e deve ser associada a outras técnicas. Mudanças em termos de fermentação da frutose, maltose e trealose foram encontradas após estudos contínuos em cepas de *L. helveticus* isolados de fermentos naturais (Fortina et al., 1998). Os autores observaram que as alterações no perfil de fermentação foram associadas à alterações na atividade proteolítica e de resistência a antibióticos e à lisozima. Também Reinheimer et al., (1995) estudando *L. helveticus* ATCC 15807 observaram que durante o crescimento dentro de condições ótimas, são espontaneamente produzidas variantes com habilidade para fermentar manose (0,01% da população total) e frutose (0,004%), que permanecem estáveis então por várias subculturas e que não reverteram durante todo o experimento. Hébert et al., (2000) estudaram cepas de *L. helveticus* da coleção CRL (provenientes de culturas de referência ATCC, NCDO, CNRZ e queijo grana italiano) e observaram que todas as cepas foram capazes de fermentar a glicose, manose, lactose e N-acetil glucosamina, todas inábeis na utilização da amigdalina, manitol, arabinose, celobiose, melizitose, melibiose, ramnose, ribose, sorbitol e xilose. Porém, a fermentação da galactose, frutose e trealose foi cepa dependente. Essas variações no perfil fermentativo devem ser analisadas com cuidado pois podem levar a erros na identificação.

Atualmente, a diferenciação de lactobacilos termófilos pode ser realizada por meio de perfil de enzimas de parede celular em gel de proteína SDS-PAGE modificado. Em estudos realizados por Lortal et al. (1992) na cepa de *L. helveticus* ATCC 12046, os autores encontraram três estruturas protéicas em camadas (*layer*), na parede celular. Para extração eficiente e seletiva da proteína, foi realizado tratamento com LiCl 5 mol.L⁻¹. O componente externo foi

identificado como uma capa não glicosilada de uma proteína de 53 kDa (*S-layer*). Quando foi preparado um extrato de células intactas (através de congelamento), ficou demonstrado que *S-layer* é uma proteína oblíqua em engradado ($a= 4,5 \text{ nm}$, $b= 9,5\text{nm}$, $\text{gama}= 75^\circ$), que cobre completamente a superfície da célula. Os autores observaram, ainda, que a viabilidade das estirpes não diminuiu significativamente após a extração e, além disso, que a proteína *S-layer* reapareceu quando se permitiu que as células tratadas crescessem novamente. Quando purificaram a proteína *S-layer*, foi determinado um alto conteúdo (44%) de aminoácidos hidrofóbicos, com a seqüência N-terminal composta principalmente por alanina, treonina, asparagina e ácido aspartico. *S-layer* é uma enzima hidrolase, com diferentes funções, localizada na parte externa da bactéria e pode ser determinada por SDS-PAGE.

Outros métodos de identificação de *Lactobacillus* sp. foram utilizadas em organismos isolados de fermento láctico e de leites fermentados e comparados a resultados obtidos por SDS-PAGE. Utilizando determinação de rRNA-23S por sondas de nucleotídeos alvo e por análise numérica de perfil eletroforético de proteínas, os genes rRNA-23S de vários lactobacilos foram parcialmente seqüenciados e provas complementares de oligonucleotídeos específicos foram sintetizados. Sondas espécie específicas de *L. delbrueckii*, *L. helveticus* e *L. paracasei* e sondas grupo específicas para *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus* foram determinadas. Proteínas de conjunto de células extraídas de cepas cultivadas também foram examinadas usando SDS-PAGE. A comparação numérica dos resultados com os padrões eletroforéticos de proteínas revelou grupos definitivos, com boa correlação com diferentes espécies (Hertel et al., 1993).

Gatti et al. (1997) realizaram SDS-PAGE *fingerprinting* de proteínas de parede celular extraídas de 38 estirpes de *L. helveticus*, 27 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 18 de *L. acidophilus*, 7 de *L. fermentum*, 8 de *Streptococcus*

thermophilus, 4 de *Enterococcus faecium* (*Streptococcus faecium*) e 9 de *E. faecalis* (*S. faecalis*), isolados de soro-fermento natural e queijos. Os autores encontraram uma proteína de aproximadamente 50 kDa (S-layer), que foi característica de todas as cepas de *L. helveticus* e duas proteínas de parede celular de aproximadamente 20 e 30 kDa foram típicas da espécie de *L. delbrueckii*. A diferenciação entre as subespécies *lactis* e *bulgaricus* não foi possível com a utilização da técnica eletroforética usada, porém, as outras espécies termofílicas estudadas apresentaram padrões de proteína de parede celular que permitiram a diferenciação de *L. helveticus* e *L. delbrueckii*. Os autores consideraram a determinação da estrutura S-layer como um método fidedigno de identificar *L. helveticus*.

Lortal et al. (1997) utilizaram o padrão de hidrolases de peptoglicanos de parede celular para obter características de interesse na identificação de lactobacilos após observarem que essas enzimas eram estruturas altamente conservadas. A técnica utilizada avaliava o peso molecular e a forma típica de bandas líticas, formadas graças à introdução de um microrganismo no gel (*M. luteus*) e permitiu separar, com pequenas variações de intensidade, dez espécies diferentes de 94 estirpes de lactobacilos. Além disso, espécies íntimas filogeneticamente, como *L. sake* e *L. curvatus* ou *L. acidophilus* e *L. helveticus* foram identificadas com sucesso.

Em 1998, Callegari et al. estudaram a estrutura de superfície (S-layer) de *L. helveticus* CNRZ 892 e determinaram que era composta de monômeros de proteínas de 43 kDa organizados em fileiras ordenadas. Para este estudo, o gene que codifica esta proteína (slpH) foi clonado em *E. coli* e sequenciado. SlpH consiste de 440 códons e é precedido por um sítio que liga o ribossoma (RBS) e seguido por um suposto terminador rho-independente. Análises de Northern-Bloth (técnica molecular que utiliza hibridização) revelaram que esta slpH é um gene monocistrônico e a seqüência de aminoácidos deduzida de SlpH mostra um

peptídio líder de 30 aminoácidos. O gene *slpH* foi amplificado por uma reação de polimerase em cadeia e o fragmento, transportando o gene completo de RBS para o códon de parada, foi clonado em um gene de expressão do vetor *Lactococcus*. *Lactococcus lactis* MG1363, transportando o plasmídeo resultante, secretou um monômero S-layer com a mesma massa molecular autêntica do *L. helveticus* CNRZ 892 SlpH, como comprovado por SDS-PAGE. Esse trabalho caracterizou a proteína S-layer como espécie-específica, podendo ser utilizada como ferramenta taxonômica. Microscópio imunoeletrônico revelou que SlpH foi ligado à parede celular do *Lactococcus* em pequenos aglomerados e acumulado no meio de crescimento como pequenas folhas.

Hébert et al. (2000) utilizaram o perfil de proteínas em SDS-PAGE, padrão de fermentação e seqüência do rRNA 16S, para identificar cepas de *L. helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Os autores concluíram que o perfil de proteínas SDS-PAGE confirmou com sucesso a caracterização taxonômica dessas cepas, sendo equivalente ao método rRNA 16S. O perfil de fermentação foi hábil na caracterização da maioria das cepas, porém a não fermentação da sacarose por uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* o caracterizou erroneamente como *L. helveticus*. A classificação equivocada pelo perfil de fermentação foi confirmada pelo SDS-PAGE e seqüência do rRNA 16S.

2.2.2 Diversidade

Informações sobre parentesco ou similaridade genética possuem aplicações importantes em diferentes áreas da ciência, permitindo identificar linhagens ou populações que devem ser mantidas para preservar a máxima diversidade genética (Thormann e Osborn, 1992). Os procedimentos clássicos de caracterização de linhagens bacterianas, tal como características bioquímicas ou nutricionais, análise de proteínas totais ou a composição da proteínas de

membrana, reações imunológicas e do conteúdo plasmático não permitem, em geral, distinguir linhagens aparentemente da mesma espécie (Le Borgeois et al., 1993).

Os métodos que permitem medir a diversidade entre linhagens aparentadas podem ser baseados na comparação da sequência dos seus genomas ou da sequência do rRNA ribossomal 16S e a medida da homologia DNA/DNA. Dois métodos são suficientemente rápidos para analisar as numerosas linhagens e podem revelar as diferenças entre linhagens de uma mesma espécie: a eletroforese de grandes fragmentos de DNA em campos pulsados e o *randomly amplified polymorphic* DNA-RAPD (Welsh e McClelland, 1990; Willians et al., 1990; Tailliez et al., 1996).

O RAPD é uma técnica que foi desenvolvida independentemente por Welsh e McClelland e Willians et al. (1990). O método é baseado na amplificação ao acaso do DNA alvo, usando como iniciador (*primer*) um oligonucleotídeo com cerca de 10 bases de sequência arbitrária, sob condições de baixa estrigência. O *primer* encontra várias seqüências complementares ao longo do genoma e quando essas seqüências estão a poucas centenas de pares de bases de distância umas das outras e em fitas opostas, a região inclusa pode ser amplificada pela polimerase. A ausência deste produto amplificado em outro indivíduo, pode ser pela perda do sítio no DNA devido a mutação, deleção ou inserção (Muralidharan e Wakeland, 1993). De acordo com os produtos amplificados, polimorfismos são revelados. Estes marcadores são fáceis de serem detectados, pois não requerem informações sobre a sequência de DNA a ser amplificado ou a síntese de *primers* específicos. Duas outras vantagens são a automatização do processo e a pequena quantidade de DNA requerida (Thormann e Osborn, 1992).

Apesar das vantagens enumeradas, a técnica RAPD apresenta algumas limitações. Mudanças mínimas nas condições da reação podem afetar

significativamente os produtos da amplificação, sendo a reprodutibilidade dos padrões a maior preocupação de muitos pesquisadores. A procedência da polimerase, do termociclador, a temperatura de anelamento e o *primer* são fatores importantes na obtenção de bons rendimentos e padrões de fragmentos de DNA (Wolf et al., 1993).

Na utilização do RAPD para caracterizar 78 culturas de lactobacilos com dois *primers* diferentes, Tailliez et al. (1996) concluíram que este era um bom método para identificação e tipagem de microrganismos. Ele apresentou importantes aplicações potenciais, não só para a constituição e enriquecimento dirigido a coleções, mas, igualmente, para a microbiologia fundamental, que, se combinada a outras técnicas, facilitou a identificação de novas espécies bacterianas.

Cocconcelli et al. (1997) utilizaram para estudo da microbiota do soro-fermento proveniente da fabricação de queijos parmigiano reggiano, técnicas moleculares de RAPD e rRNA-16S. Análises de RAPD facilitaram a identificação das cepas de *Lactobacillus* envolvidos em associação microbiológica, permitindo também o estudo da dinâmica da população durante dois ciclos da fermentação em soro fermento. As amostras de soro-fermento foram coletadas a 0, 6, 12, 18 e 24 horas de fermentação. Análises de RAPD *fingerprint* revelaram a presença de quatro biotipos que dominaram o processo de fermentação do soro. Análise da seqüência de rRNA-16S demonstrou que estas cepas isoladas de soro correspondiam a *L. helveticus* e *L. delbrueckii* subsp. *lactis*.

Giraffa et al. (1998) caracterizaram 23 cepas de *L. helveticus* isoladas de soro-fermento e queijos italianos através da ribotipagem, perfil de plasmídios e RAPD. Diferenças entre as cepas foram detectadas pelas três técnicas utilizadas, porém, os autores constataram que, em alguns casos, o RAPD foi capaz de demonstrar diferenças não detectadas pelas outras duas técnicas e que a

heterogeneidade encontrada entre as cepas era dependente do seu local de origem.

Diferenças substanciais em várias características tecnológicas importantes foram observadas entre *L. helveticus* isolados de fermentos naturais por Giraffa et al. (2000). Os autores utilizaram análise estatística multivariada para analisar os dados obtidos na ribotipagem (rRNA 16S) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). Os resultados permitiram a compreensão com bases mais sólidas, da associação de características genéticas e tecnológicas observadas nas cepas com o tipo de queijo em que foram isoladas, demonstrando o significado funcional e ecológico de biotipos de *L. helveticus* em culturas naturais associadas ao seu local de origem .

2.2.3 Comportamento na fermentação

Cepas de *L. helveticus* podem ser utilizadas em biorreatores para produção de ácido láctico em vários substratos que representam agressão ao meio ambiente, em particular o soro de queijo. O estudo da cinética da produção ácido e da atividade proteolítica e lipolítica do microrganismo pode fornecer importantes informações sobre seu comportamento nos reatores, na produção de fermentos lácticos e nos processos de maturação de queijos.

Utilizando gradientes de pH 4,3 a 6,3 e células imobilizadas de *L. helveticus*, em fermentação contínua tendo como substrato soro, Norton et al. (1993) observaram em microscópio de fase, diminuição da cadeia de lactobacilos. Quando, porém, utilizaram extrato livre de células do mesmo microrganismo, houve alongamento progressivo da cadeia em pH de 5,1 a 6,3, sendo que, na fermentação contínua, as células foram menos dependentes do pH. Os autores atribuíram este fenômeno ao tempo longo de resposta das células às mudanças constantes do pH do substrato.

Norton et al. (1994b) utilizaram *L. helveticus* imobilizados em suporte de carragena para fermentar substrato com permeado de soro suplementado com 33% de caldo de feijão em diferentes níveis de pH. No estudo cinético da fermentação contínua, foi observada uma taxa máxima de ácido láctico de 28,5g/L⁻¹/h em pH 5,5. Os autores determinaram que as células que permaneceram ligadas ao suporte de carragena foram responsáveis por 75% e 85% da produção de ácido e biomassa, em pH variando de 4,7 a 6,3, e de aproximadamente 90%, quando o pH foi controlado e fixado em 4,3.

Vários fatores podem interferir na quantidade de ácido produzida pelos *L. helveticus*, como a formulação do meio para pré-cultura ou cultura e o substrato utilizado. Na produção de ácido láctico, quando foi utilizado soro clarificado e ultrafiltrado como substrato, a produção foi de 4,4g/L⁻¹/h, enquanto que o uso de hidrolisados de soro produziu até 5,5g/L⁻¹/h (Amrane e Prigen, 1993).

Também a alimentação do gado, que modifica a composição do leite exerce, conseqüentemente, influência na produção de ácido. Num experimento conduzido por Ibrahim (1991), foram alimentados três grupos de búfalas com diferentes níveis de extrato de levedura e utilizou o leite para cultivar diferentes cepas de *L. helveticus* por diferentes períodos de incubação. Os resultados das análises de variância indicaram que o comportamento das culturas investigadas (número de microrganismos, acidez) foi significativamente afetado pelo período de incubação, leite obtido dos diferentes grupos de animais e sua interação, indicando que as diferenças no comportamento não são independentes. O tipo de leite também influenciou na produção de ácido por *L. helveticus* em um experimento utilizando leite de cabra e vaca e diferentes períodos de incubação (Ibrahim et al., 1990). Os autores observaram maior produção de ácido em leite de cabra em todas as repetições.

Estudando cepas variantes de *L. helveticus* CRL 1062 que coagulavam o leite lentamente, Hébert et al. (2000) verificaram que as cepas possuíam todos os componentes essenciais conhecidos necessários para utilizar caseína como fonte de carbono, incluindo atividades funcionais de proteinase e peptidase. Os requerimentos nutricionais nesses variantes foram similares a de cepas parentais, porém, os autores encontraram um defeito na habilidade de síntese da guanidina monofosfato (GMP).

A temperatura e o pH também influenciaram a produção de lactato por cepas de *L. helveticus* modificadas geneticamente, alterando a expressão da enzima lactato desidrogenase. As estirpes geneticamente modificadas apresentaram atividade de acidificação 53% a 93% maior que as cepas selvagens a 41°C e pH 5,9 (Kyla-Nikkila et al., 2000).

2.2.4 Atividade proteolítica e autólise

A atividade proteolítica do *L. helveticus* é geralmente reconhecida como forte entre as bactérias do ácido lático. Devido às suas características e sua potencial aplicação em várias alimentos industriais e, em particular, na maturação de queijos, o interesse nesse tópico tem sido aumentado nos últimos anos.

Os requerimentos nutricionais de *L. helveticus* são extensos e dependem da suplementação por aminoácidos exógenos. Sistemas proteolíticos representam papel determinante no crescimento ótimo das espécies no leite, onde as caseínas são hidrolisadas por proteinases associadas à parede celular e peptídeos são liberados devido a diversas atividades de peptidase (Torriani et al., 1994).

Num estudo da atividade de peptidase de lactobacilos, *L. helveticus* YB1 resultou como a mais proteolítica entre as espécies consideradas. Essa espécie hidrolizava tanto α -caseína quanto β -caseína e era dotado de altos níveis de

aminopeptidases gerais (AP) e prolina iminopeptidase. Atividades de carboxipeptidase foram ausentes nas cepas testadas (Hickey et al., 1983).

Experimentos estudando a hidrólise da caseína C₁₄ por proteinases aderidas à parede celular de muitas cepas de *L. helveticus* confirmaram a degradação de α e β -caseínas (Ezzat et al., 1985). A maioria das cepas de *L. helveticus* é capaz de quebrar tanto α -caseína quanto a β -caseína, possuindo alta atividade de aminopeptidase em substratos de lisina e leucina (Ginzinger e Sebastiani, 1993).

Além do uso na maturação de queijos, outras aplicações têm sido encontradas para produtos do metabolismo protéico de *L. helveticus*. Peptídios derivados de α _{s1} e β -caseína, isolados da atividade proteolítica de *L. helveticus* CP790, foram testados para diminuição da pressão arterial. O efeito obtido foi comparado à enzima conversora da angiotensina (capaz de diminuir a pressão sanguínea). O efeito anti-hipertensivo dos peptídeos foi efetivo em ratos por administração oral de 5mg/kg, quantidade contida em 5mL de leite inoculado contendo 0,3% de peptídios (Yamamoto et al., 1994). Os autores também utilizaram variantes defeituosos para atividade de proteinase para cultivar leite e este não mostrou efeito anti-hipertensivo nos ratos, comprovando sua ação *in vivo*.

Em estudo da localização citológica das enzimas proteolíticas de *L. helveticus*, Vescovo e Bottazzi (1979) demonstraram que estas peptidases e aminopeptidases estavam localizadas na maior parte no citoplasma e atividade de iminopeptidase na parede celular.

Fermentos autolíticos de muitos microrganismos podem ser usados em substituição a culturas tradicionais ou como aceleradores da maturação de queijos. Na lise, o conteúdo intracelular e, conseqüentemente, as enzimas ficam livres no meio e podem realizar mais rapidamente suas atividades sem necessitar do crescimento dos microrganismos (Fox e Law, 1991).

Alguns autores utilizaram o fermento previamente autolisado em algumas variedades de queijos, justificando que, quando se utilizam células ativas, além de enzimas, os microrganismos podem fermentar a lactose e produzir ácido láctico e outros metabólitos de forma não controlada ou não desejável. Este fato não acontece quando somente o extrato de células não viáveis e os complexos enzimáticos são adicionados. Enquanto estirpes autolíticas não são isoladas, caracterizadas e utilizadas na produção de fermentos comerciais, alguns pesquisadores têm estudado sua atuação, através de lise por choque térmico na maturação de queijos.

Visando acelerar a maturação de queijos “ras”, foram realizados testes com adição de 0% (controle), 1% e 2% de fermento autolisado preparado com a incubação de *L. helveticus* em leite desnatado por 10 dias a 38 °C. As análises dos queijos não mostraram diferenças nos conteúdos de umidade e componentes químicos, porém, o aumento nos ácidos voláteis C:6-C:12, nitrogênio solúvel, tirosina e triptofano foi maior e proporcional à quantidade de fermento autolisado utilizado durante toda a maturação. Estudos eletroforéticos indicaram que a proteólise foi mais pronunciada nos queijos tratados que nos controle e que a taxa de hidrólise foi proporcional à quantidade de fermento autolisado adicionado (Gomaa et al., 1992).

Ainda em queijos “ras”, Ammar et al. (1994) testaram a influência na umidade, acidez, frações de nitrogênio solúvel e ácidos graxos voláteis pelo uso de fermento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (controle) e 1% e 2% de fermento de *L. helveticus* autolisado. Os autores não encontraram diferenças significativas nos conteúdos de umidade, sal no extrato seco, gordura e nitrogênio total. Porém, o uso do fermento autolisado aumentou os níveis de ácidos graxos voláteis e nitrogênio solúvel após maturação por dois meses. Na análise sensorial realizada após três meses de maturação, os escores alcançados pelos queijos tratados com 1% e 2% de fermento autolisado foi de 94 e 95

pontos, enquanto que os queijos controle receberam nota 84. Valence et al. (2000) também verificaram uma maior atividade proteolítica com a utilização de *L. helveticus* autolíticos na fabricação de queijos suíços. Os resultados obtidos com o uso das cepas autolíticas, quando comparados aos queijos controle, mostraram que esses microrganismos podem ser utilizados para abreviar a maturação de queijos.

Estudando a autólise espontânea de cepas de bactérias propiônicas em meio de cultura, Carvalho (1994) observou que a autólise dessas cepas acontecia após a observação do crescimento máximo (por meio da leitura espectrofotométrica a 650nm), seguida de uma fase de declínio relacionada à perda de viabilidade. A autólise foi confirmada pela microscopia eletrônica, em que o autor observou diferenças morfológicas nas culturas na fase exponencial de crescimento e fase de declínio. No decorrer da fase de autólise espontânea, vários estados de degradação foram observados. O autor relacionou hipóteses à autólise espontânea em meio de cultura, entre elas a carência nutritiva associada à acidificação e temperatura adaptada à atividade do sistema autolítico.

Estudos conduzidos em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* demonstraram que a vida celular depende sobretudo do pH intracelular (poder tamponante e força iônica do citoplasma) e da pressão de turgescência, diretamente ligada ao pH extracelular e à composição do meio (Ingraham, 1987). Kemper e Doyle (1993) sugeriram que a autólise celular é provocada por perturbações iônicas e de pH dentro da parede, incentivando a atividade do sistema autolítico em uma célula e tornando-a incapaz de regular estas mudanças com o meio exterior, sendo este enfraquecimento diretamente ligado à privação de nutrientes.

2.3 Soro-fermento natural

Culturas endógenas de fermento láctico podem ser definidas como aquelas que se formam sob o controle de fatores tecnológicos em um

determinado ambiente, sem sofrer a influência de microrganismos de outra procedência trazidos pelo homem. A mais antiga cultura natural em soro é a empregada na produção do queijo Grana, sendo hoje, o soro-fermento considerado uma cultura estabilizada sobre a microbiota termófila (Botazzi, 1977).

No Brasil, segundo Guimarães (1991), o soro-fermento é preparado aquecendo a 70 °C qualquer soro proveniente de queijo minas, prato, parmesão ou mussarela. Esse soro é mantido em temperatura ambiente até o próximo dia, quando é adicionado a outro soro fresco, aquecido a 60 °C e estocado novamente em temperatura ambiente. Esta operação é repetida por mais dois ou três dias, até que a acidez atinja 85 °D a 90 °D e apresente sabor e odor agradáveis. Furtado (1997) descreve obtenção similar, porém, mais simples, do soro fermento em laticínios brasileiros. Inicialmente é retirado soro fresco da fabricação do dia, sendo este inoculado com soro já fermentado de outra fabricação até que sua acidez atinja 100 °D a 130 °D. Quando se trabalha com leite cru, o cozimento da massa é geralmente mais elevado, cerca de 44 °C e é nessa temperatura que o soro é retirado no final da fabricação. O soro fermento resultante é composto de uma microbiota variável, relacionada à região onde foi obtido, qualidade do leite e forma de propagação, tendo predominância de microrganismos termófilos. Ainda de acordo com Furtado (1997), quanto mais alta a acidez no soro fermento, maior a predominância de *L. helveticus*.

Na Itália, o soro-fermento é largamente utilizado na fabricação de queijos parmigiano reggiano, grana padano e outros queijos duros. No preparo inicial, o leite após a ordenha é filtrado e vertido em compartimentos pequenos para a subida do creme, onde permanecem por 6 a 12 horas. Após este processo de “*affioramento*”, parte do creme naturalmente separado é desnatado e, junto com o creme, são carreadas bactérias não lácticas, particularmente as formadoras de esporos. O resultado é uma parcial seletividade na aglutinação dos

microrganismos, que sobem com os glóbulos de gordura. Variações físico-químicas durante este processo também afetam o *flavor* juntamente com o aumento da população de bactérias lácticas. Soro-fermento natural é preparado para a fabricação prevista dos queijos do dia e, muito frequentemente, contém um misto de *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e alguns lactococos (Neviani e Carini, 1994).

Diversos trabalhos têm comprovado que a microbiota no soro-fermento é composta principalmente de lactobacilos termófilos, com predominância de *L. helveticus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Botazzi, 1977; Neviani e Carini, 1994, Furtado, 1997; Giraffa et al., 1998).

Durante o primeiro estágio do processo de fabricação dos queijos, lactobacilos termófilos provenientes do soro-fermento prevalecem e representam um importante papel na acidificação da massa, durante o qual coliformes e clostrídios são inibidos (Neviani e Carini, 1994).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de soro-fermento

As amostras de soro fermento foram procedentes de cinco laticínios de diferentes regiões, produtores de queijos parmesão, mussarela ou provolone, que não utilizavam fermento láctico comercial para fabricação dos queijos. As amostras foram coletadas diretamente nas indústrias ou remetidas em caixa de isopor contendo gelo reciclável ao laboratório, onde eram imediatamente analisadas. As análises foram realizadas em laboratórios da Universidade Federal de Lavras e Universidade Federal de Uberlândia. Um diagrama das etapas realizadas durante o experimento pode ser observado na Figura 1.

Para caracterizar a forma de obtenção do soro-fermento e outras informações sobre a produção, foi solicitado à empresa responder a um questionário. As perguntas respondidas foram: 1) De que forma o soro-fermento é inicialmente obtido? 2) Há trocas de soro-fermento com outras fábricas? 3) Que tipos de controle físico-químico ou microbiológico são realizados? 4) O soro-fermento é armazenado? A que temperatura? 5) Quando detectam problemas ou falta de atividade, qual o procedimento da indústria? 6) Quais os tipos de queijo fabricados com soro-fermento e qual a quantidade de leite destinada a cada um? 7) Outras informações que julgar importante.

3.2 Análises do soro-fermento e isolamento dos lactobacilos termófilos

Inicialmente foram determinados, no soro-fermento, a acidez (°D), pH, porcentagem de gordura, sólidos totais, densidade e cloreto de sódio, conforme metodologia proposta por Brasil (1981).

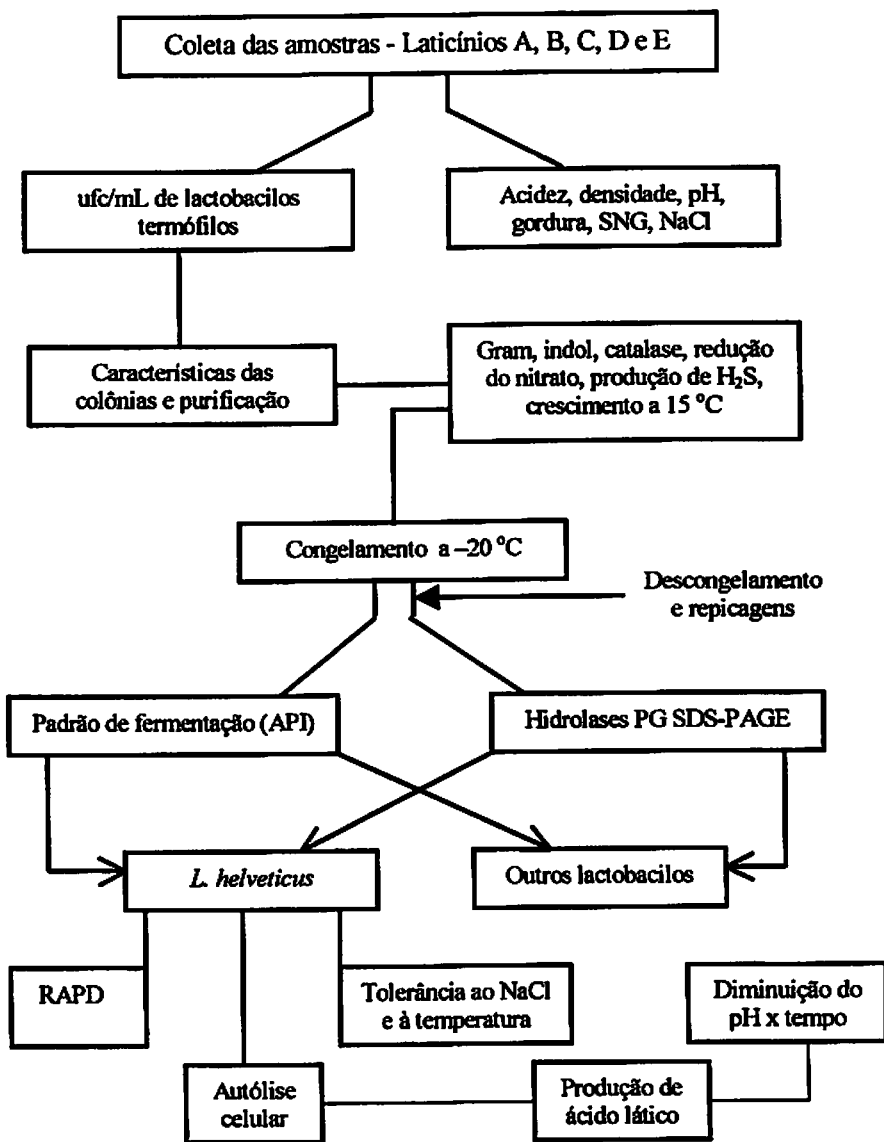


FIGURA 1 Diagrama representando a sucessão de etapas realizadas durante a execução do experimento.

A análise microbiológica para isolamento e enumeração dos lactobacilos termófilos constou, inicialmente, de diluições decimais do soro-fermento em água peptonada tamponada estéril (APT). Um mililitro de cada diluição foi inoculado em ágar MRS (Man et al., 1960) com pH ajustado com ácido clorídrico até 5,4 e incubados a 43 °C em anaerobiose, por 48 horas. As colônias foram contadas e multiplicadas pela recíproca da diluição utilizada e o resultado registrado como unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) de lactobacilos termófilos (Lortal et al., 1992).

Após contagem, as características fenotípicas como cor, opacidade ou brilho e tamanho foram anotadas. Colônias de cada grupo (características diferentes) foram purificadas por esgotamento em ágar MRS e submetidas a coloração diferencial de Gram. As bactérias representantes de cada grupo, que apresentaram morfologia característica de lactobacilos ao microscópio óptico (bacilos Gram positivos), foram repicadas em caldo MRS, incubadas por 24 horas a 43 °C e, após crescimento, adicionados de 15% (v/v) de glicerol estéril. O glicerol foi utilizado como crioprotetor e os cultivos foram, então, congelados a -20 °C até o momento da identificação.

3.3 Identificação dos isolados

Para identificar os microrganismos como lactobacilos termófilos foram realizadas, nos isolados provas da redução do nitrato, liquefação da gelatina, produção de H₂S, indol, catalase e crescimento a 15 °C (Kandler e Weiss, 1986). As técnicas microbiológicas foram realizadas conforme a recomendação de Silva et al. (1997).

Os isolados que apresentaram resultados negativos na redução de nitratos, liquefação da gelatina, produção de H₂S, indol, catalase e não cresceram a 15°C, foram novamente repicados em 10 mL de caldo MRS e, após crescimento, adicionados de 15% de glicerol estéril e congeladas a -20 °C.

Para identificação, os isolados foram descongelados, repicados em caldo MRS e incubados a 43 °C/24 horas, sendo este procedimento repetido por três vezes. Os isolados foram caracterizados pela utilização das galerias API CH 50 (bioMérieux). A galeria API CH 50 permite o estudo do metabolismo de microrganismos e consiste de 50 microtubos que contêm uma zona anaeróbica para o estudo da fermentação e uma zona aeróbica para o estudo da oxidação e assimilação. Para utilização, 10 mL da cultura previamente repicada em caldo MRS foram acondicionados em tubos de poliuretano estéreis e centrifugadas a 5000xg durante 15 minutos a 4 °C. As células foram lavadas com tampão fosfato estéril, centrifugadas novamente e a matéria sólida resultante, ressuspensa em 10 mL de tampão fosfato estéril. Para o uso nas galerias, 0,2 mL dessa suspensão foram misturados a 10 mL do meio API 50 CHL (polipeptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; tween 80 1mL/L; fosfato dipotássio 2g/L; acetato de sódio 3H₂O 5g/L; citrato de amônio 2g/L; sulfato de magnésio 7H₂O 0,20g/L; sulfato de manganês 4H₂O 0,05g/L; púrpura de bromocresol 0,17g/L). A suspensão de microrganismos em meio API 50 CHL foi distribuída nas 50 cúpulas, cobertas com óleo mineral estéril e incubadas a 37 °C e a leitura realizada após 12, 24, 36, 48 e 60 horas. Dois parâmetros foram considerados na leitura: a intensidade do crescimento pela mudança de coloração no indicador púrpura de bromocresol (púrpura para amarelo) e a velocidade da mudança, sendo considerado resultado positivo para esculina, a mudança da cor púrpura para a cor preta.

Os resultados obtidos foram anotados e comparados a tabelas de classificação disponíveis na literatura (Kandler e Weiss, 1986; Torriani et al., 1994; Hébert et al., 2000). Em paralelo à identificação dos isolados do sorofermento, foram realizados os mesmos procedimentos com duas culturas comerciais de *L. helveticus*, a Lh-B02, da Chr. Hansen e Lb. helv.7 da Wiesby, identificadas como Cc1 e Cc2, respectivamente.

3.4 Correlação entre unidades formadoras de colônias e densidade óptica

A correlação entre a densidade óptica e a ufc/mL foi determinada para cada um dos isolados caracterizados como *L. helveticus*, selecionados para estudo e para as cepas comerciais.

Para obtenção da equação e curva de regressão, as culturas foram descongeladas e repicadas (2%) por pelo menos três vezes em caldo MRS. Após reativação, as culturas foram repicadas em 10 mL de caldo MRS, incubadas a 37°C/24 horas, centrifugadas e submetidas a diluições decimais em caldo MRS estéril. Cada diluição obtida foi inoculada em profundidade em ágar MRS e incubadas a 37 °C/24-48 horas. Paralelamente, de cada diluição, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro FEMTO 700, em comprimento de onda de 650 nanômetros e o resultado registrado como densidade óptica a 650 nanômetros (DO_{650nm}). As contagens em ufc/mL e a DO_{650nm} de cada diluição foram submetidas a uma análise de regressão e a equação resultante, utilizada para prever e padronizar a concentração do número de células por mililitro do inóculo. A obtenção da equação de regressão foi realizada com a utilização do programa ORIGIN 3.0.

3.5 Padrão de peptidoglicanos em gel de eletroforese SDS-PAGE

O protocolo utilizado para obtenção do padrão de hidrolases de peptidoglicanos foi o recomendado por Lortal et al. (1997). Para análise, foram centrifugados 8 mL da cultura em MRS na fase exponencial de crescimento (DO_{650nm} aproximadamente 1) a 8000xg por 15 minutos a 4 °C. O *pellet* foi lavado uma vez em água destilada estéril, novamente centrifugado nas mesmas condições e ressuspendido em 80µL de tampão de extração, composto de 62,5mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 6,6 contendo 10% de glicerol, 2% de SDS e 5% de

2-mercaptoetanol (Laemmli, 1970). Após homogeneização com o tampão, a mistura foi centrifugada novamente a 10000xg por 10 minutos, e então aplicado 15µL do sobrenadante em gel de poliacrilamida com SDS. Em todo gel foi aplicado 10µl de marcador de peso molecular LMW Market kit da Pharmacia Biotec.

O gel separador SDS-PAGE foi preparado conforme recomendações de Leclerc e Asselin (1989) utilizando mini sistema Bio-rad, dentro das seguintes condições: 4,7 mL de 2M Tris HCl pH 8,8; 250 µL de SDS 10%; 250 µL de EDTA 200mmol.L⁻¹; 11,7 mL de Bis acrilamida 30%; 7,8 mL de água deionizada; 30 µL de TEMED; 140 µL de persulfato de amônio 10% e 0,2% de células de *Micrococcus luteus* liofilizado e congelado (Sigma). Para facilitar a aplicação foi utilizado gel de empilhamento.

Após eletroforese (1 hora, 180 V, temperatura ambiente), o gel foi submerso por 30 minutos em água destilada em temperatura ambiente e depois transferido para um tampão de renaturação (50mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0 contendo 1% (v/v) de Triton X-100) e levemente agitados por 2 horas a 37°C, para renaturação das enzimas. O contraste foi observado com a coloração do gel com 0,1% de azul de metileno em 0,01% (v/v) de hidróxido de potássio, terminando em água destilada sob agitação por uma noite a 4°C. O marcador de peso molecular foi colorido em comassie brillant blue.

Os padrões obtidos e o peso molecular de cada banda foram comparados aos padrões descritos por Lortal et al. (1997) e utilizados para classificação dos microrganismos isolados. As cepas comerciais Cc1 e Cc2 foram analisadas em paralelo.

3.6 Análise molecular

3.6.1 Extração do DNA genômico

As culturas comerciais e os *L. helveticus* selecionadas para análise RAPD foram repicadas em caldo MRS, incubadas a 37 °C e o crescimento monitorado por meio da leitura da absorbância até DO_{650nm} de 0,8-1,0. A cultura foi distribuída em 4 *ependorfs* de 2 mL e centrifugadas a 13.000 rpm por 1 minuto, a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* congelado a -20 °C. No momento da análise, o *pellet* era descongelado e a extração do DNA realizada de acordo com o protocolo que utilizava NaCl saturado e proteinase K (*salting out*), proposto por Miller (1988), com pequenas modificações, conforme descrito a seguir:

1. adição de 500 µL de tampão de lise de núcleo (Tris 10m mol.L⁻¹, EDTA-NaCl 400m mol.L⁻¹) sobre o *pellet* das bactérias, seguido de 15 µL de SDS 10% e 10 µL de Proteinase K (Gibco BRL) a 20 mg/mL;
2. homogeneização em *vortex* e incubação em banho-maria a 60 °C por no mínimo, 8 horas;
3. para precipitação das proteínas, foram adicionados 180 µL de NaCl saturado e as amostras congeladas a -20 °C/15minutos; após, foram centrifugadas a 10.000g/10minutos;
4. o sobrenadante (aproximadamente 600 µL) foi pipetado para um novo tubo *ependorff* e adicionado de 1,2 mL de álcool em temperatura ambiente. Para precipitação do DNA, as amostras permaneceram em repouso por 10 minutos e foram centrifugadas a 10.000xg/10 minutos;
5. o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA lavado com álcool 70% gelado e centrifugado novamente nas condições anteriores;
6. o sobrenadante foi mais uma vez descartado e, após secagem do *pellet* resultante, adicionado de 50 a 100 µL de água ultrapura estéril.

Em paralelo, foi utilizado o método do fenol-clorofórmio para extração do DNA. O protocolo utilizado foi o proposto por Sambrook et al. (1989). Esse segundo protocolo é similar ao proposto por Miller (1988), possuindo como única diferença a forma de precipitação das proteínas, que substitui o NaCl saturado por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 v/v).

3.6.2 Seleção dos *primers*

Para seleção dos *primers* que foram utilizados na análise RAPD, foi inicialmente realizado um pré-experimento testando 40 seqüências de dez pares de bases da Operon Technologies E.U.A, série OPX e OPS. Os testes foram realizados utilizando o DNA procedente de uma cultura comercial e de uma das cepas isoladas, sendo selecionados para a análise RAPD os *primers* que apresentavam maior número de bandas polimórficas. Foi utilizado para monitorar o tamanho das bandas um marcador de peso molecular de 100 pb da Gibco BRL, com sensibilidade de 100 a 1800 pb.

As condições previamente otimizadas das reações constaram de um volume total de 25 μL , com os seguintes componentes: 0,5 μL do DNA total, 1,0 U de Taq polimerase da Phocentria, 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do conjunto de dNTPs (Gibco BRL), 1,5 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 10 pmol.L^{-1} de *primer* e o volume completado com água ultrapura. As reações foram amplificadas em termociclador PTC-100 da Gibco BRL. Os passos consistiram de três ciclos iniciais de 94 °C/1 minuto, 35 °C/1 minuto e 72 °C/1 minuto, seguidos de 34 ciclos de 94 °C/ 10 segundos, 40 °C/ 20 segundos, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos e 4 °C por 10 minutos.

Quinze microlitros dos fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,2%, nas dimensões de 12 x 14 x 0,6 cm a 150 V por 2 horas, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x, conforme Sambrook et al. (1989). As bandas polimórficas foram coloridas com brometo de etídio na concentração

final de 0,5 µL/mL de gel. após coloração, os géis foram visualizados em transluminador UV e fotografados em Polaroid 667.

3.6.3 Análise RAPD


Os microrganismos puros, previamente isolados e caracterizados por meio de provas bioquímicas e padrão de hidrolases de peptidoglicanos como *L. helveticus*, foram testados com os *primers* selecionados. As duas cepas comerciais foram analisadas em paralelo. A extração do DNA, condições da reação, ciclos no termociclador e outros procedimentos adotados foram os mesmos já descritos na seleção dos *primers*.

Os padrões de bandas obtidas nos géis foram utilizados para análise e construção de uma matriz binária, de acordo com a presença (2) e ausência (1) de bandas reproduzíveis e mais intensas. O programa STATISTICA foi utilizado para calcular as porcentagens de desacordo e agrupar os genótipos pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) e construção de um dendrograma.

3.7 Características tecnológicas

3.7.1 Produção de lactato

As culturas selecionadas de *L. helveticus* e as cepas comerciais foram inoculadas (1%) em caldo MRS e incubadas a 37 °C. O pH foi mensurado no tempo 0 (momento da inoculação) e após intervalos de 2 horas, por um período de até 52 horas. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção de um gráfico do tempo em horas x pH. O programa ORIGIN 3.0 foi utilizado para traçar uma linha de tendência entre os pontos obtidos e determinar o modelo que melhor descrevia o comportamento dos isolados na diminuição do pH. Os gráficos obtidos foram sobrepostos nas culturas que apresentavam maior similaridade pela análise RAPD e seu comportamento discutido.




O decaimento do pH do meio MRS até 4,0 em função do tempo foi analisado após cálculo da equação de regressão linear. As equações foram obtidas com o uso do programa ORIGIN 3.0, que correlacionou as leituras do tempo em horas e as determinações do pH até o ponto do gráfico onde o pH 4,0 foi observado. As retas obtidas para as diferentes culturas foram analisadas por meio de um teste de comparação múltipla do paralelismo da inclinação das retas (valores de b), utilizando o teste de F (Lark et al., 1968).

A produção de ácido láctico e o pH foi monitorado em leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos, previamente esterilizado (LDR). As culturas foram inoculadas (2%) em 50 mL de LDR e incubadas a 37 °C, sendo as análises realizadas após 24 e 48 horas. O pH foi determinado em pH-metro previamente calibrado e a produção de acidez determinada pela titulação com hidróxido de sódio 0,11N (solução Dornic), utilizando como indicador, solução alcóolica de fenolftaleína a 1%. A produção de ácido láctico foi calculada pela relação $1^{\circ}D = 0,01 \text{ g de ácido láctico } \%$, sendo a produção de cada cepa registrada após reduzir, dos resultados obtidos, a porcentagem de ácido láctico inicial do LDR (BRASIL, 1981). As médias obtidas para as diferentes cepas foram comparados pelo teste de F (Sampaio, 1998), utilizando o programa SANEST.

3.7.2 Tolerância ao sal e resistência ao calor

As culturas selecionadas de *L. helveticus* foram inoculadas (2%) em caldo MRS estéril suplementado com diferentes concentrações (2%, 3%, 4%, 5% e 6%) de cloreto de sódio. O caldo inoculado foi incubado a 37 °C por 24 horas e, após este período, o crescimento dos microrganismos foi avaliado pela mensuração da absorbância em espectrofotômetro (DO_{650nm}). Foram registradas as medidas de DO_{650nm} maiores que 0,1, sendo as leituras inferiores a este valor consideradas como consequência da cultura previamente inoculada.



Para determinação da resistência ao calor, caldos MRS foram inoculados, em duplicata, com as culturas (2%) e incubados a 37 °C por 24 horas. Após crescimento, as culturas foram divididas em dois grupos. O grupo 1 foi submetido a tratamento térmico, sob temperatura de 55 °C por 30 minutos e o grupo 2, a 65 °C por 30 minutos. O tratamento térmico foi realizado em banho-maria, previamente regulado, contendo água em quantidade suficiente para cobrir a amostra. Foi utilizado um tubo controle (auxiliar) contendo a mesma quantidade da amostra, no qual foi inserido um termômetro, sendo o tempo contado a partir do momento em que o tubo controle atingiu a temperatura predeterminada. Após permanecer nas duas temperaturas por 30 minutos, as amostras foram imediatamente resfriadas por submersão em água em temperatura ambiente. O monitoramento da ação do tratamento sobre as culturas foi realizado pela adição em profundidade de 1 mL (da cultura após resfriamento) em ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 horas. Em paralelo, foram inoculados 2,5% da cultura em caldo MRS, seguidos de incubação a 37°C por 24 horas e o crescimento monitorado por absorbância em espectrofotômetro (DO_{650nm}).

3.8 Determinação de cepas autolíticas

Para a determinação da presença de estirpes autolíticas, as cepas comerciais e os isolados confirmados como *L. helveticus* tiveram seu crescimento monitorado por meio da densidade óptica a 650nm e pH. As culturas foram inoculadas (1%) em 100 mL de caldo MRS e monitoradas de 2 em 2 horas, até que fosse observado o decaimento da DO_{650nm}. Em paralelo, o pH foi mensurado no caldo retirado para leitura espectrofotométrica.

Os resultados foram analisados após construção de um gráfico DO_{650nm} x tempo em horas x pH, que descrevia o comportamento das culturas. Foram consideradas como possivelmente autolíticas as estirpes que passaram da fase

exponencial à de declínio, sem passar pela fase estacionária (Carvalho, 1994; Cappa e Botazzi, 1996). Alterações nas células foram monitoradas através da observação ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão, sendo comparadas as culturas na fase exponencial de crescimento e na fase de declínio, determinada pela observação da diminuição da DO_{650nm} e estabilização ou aumento no pH.

3.8.1 Microscopia

A microscopia óptica foi realizada com objetiva de imersão (x1000), optovar 1,25 em microscópio Reichert-Jung. Para serem adicionadas às lâminas, 5 mL das culturas crescidas em caldo MRS (fase exponencial e após declínio da DO_{650nm}) foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o *pellet* resultante lavado uma vez com tampão fosfato estéril, centrifugada nas mesmas condições anteriores, e novamente, ressuspensas em 5 mL de tampão fosfato estéril. As lâminas com os cultivos foram submetidas à coloração diferencial de Gram (Pelczar et al., 1996).

Para microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada a metodologia descrita em (Técnicas..., 1982). Dez mililitros das culturas foram centrifugadas a 3.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e no *pellet*, adicionados 2 mL de fixador (tampão fosfato com 8% de glutaraldeído). Após homogeneização, a mistura foi mantida, por pelo menos 24 horas, a 8 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra lavada duas vezes com tampão fosfato pH 7,2, estéril. Os microrganismos e o tampão foram centrifugados e o *pellet* ressuspensado em ágar a 4% estéril em *eppendorf* de 2 mL e rapidamente centrifugados. Após solidificação, o ágar foi fracionado e fixado em tetróxido de ósmio a 1% durante 30 minutos e adicionado de ferrocianeto de potássio. Os fragmentos foram desidratados com álcool em diferentes concentrações e óxido de propileno e fixados em blocos com resina. Após ultramicrotomia e inclusão

sobre grades, foram corados por meio da técnica de contrastação positiva com acetato de uranila e citrato de chumbo. As microfotografias foram realizadas após observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM 109.

Todos os procedimentos foram também realizados nas duas culturas comerciais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Soro-fermento

4.1.1 Características gerais

Os questionários respondidos pelos responsáveis técnicos das indústrias que forneceram o soro fermento mostraram que há algumas variações nos procedimentos adotados nos laticínios onde foi realizada a coleta. A principal diferença observada foi na obtenção inicial.

O laticínio A somente armazena o soro final da fabricação do queijo provolone, fabricado com leite cru, em temperatura ambiente, até fermentação. O laticínio D recolhe o soro que drena dos blocos de mussarela deixados para fermentar, fabricada com leite pasteurizado e o utiliza diretamente em outras fabricações, enquanto as outras indústrias adotam cuidados mais específicos.

No laticínio E, a produção é iniciada com a seleção do leite, realizada por meio das provas de lactofermentação e acidez (máxima de 17 °D) de 50 litros de leite. Nesse leite são adicionados coalho e 1 litro de soro fermentado, obtido previamente da dessora do queijo provolone. Após coagulação e corte, o soro é recolhido e adicionado de mais 2% de soro fermento. A mistura é aquecida a 50 °C e mantida sob temperatura ambiente até o próximo dia ou até que atinja acidez Dornic em torno de 130 °D. O laticínio C adota procedimento similar ao da indústria E, porém, após conseguir o soro inicial da coagulação de 50 litros de leite cru de um queijo de massa cozida, o utiliza diretamente em outra fabricação (observa que a acidez atinge em torno de 70 °D). Esse soro é novamente utilizado em outra fabricação e, segundo a indústria, atinge, então, em torno de 105 °D a 110 °D, estando pronto para uso como soro fermento. A indústria B retira soro da fabricação de qualquer queijo, aquece a 80°C por 15

minutos e resfria a 42 °C. A esse soro é adicionado fermento láctico obtido de outras indústrias, que inicialmente já utilizaram fermento industrial. A mistura é mantida em caixa de isopor até que a acidez atinja de 100 °D a 120 °D e é considerada soro fermento pronto para utilização.

Na Itália, onde o soro fermento é tradicionalmente utilizado na fabricação de queijos duros, o procedimento na obtenção é mais padronizado que no Brasil. No preparo inicial, há filtração do leite e desnate natural em pequenos compartimentos por 6 a 12 horas, o que carrega ao creme bactérias não lácticas, particularmente as formadoras de esporos, resultando em uma parcial seletividade dos microrganismos, conhecida como “*affioramento*”. Somente após esse procedimento, o leite é coagulado naturalmente e o soro resultante do processo utilizado como soro fermento natural. A posterior seleção dos microrganismos predominantes e sua aptidão tecnológica é realizada naturalmente, dependentes de condições como temperatura e tempo a que são submetidos durante a fabricação dos queijos (Neviani e Carini, 1994).

Outras características na produção de soro fermento mencionadas pelos responsáveis das cinco indústrias estudadas, estão ilustradas na Tabela 1. As diferenças observadas na produção de soro fermento eram esperadas, já que as amostras eram procedentes de ecossistemas distintos e de laticínios com realidades de higiene e estruturas físicas diferentes. A obtenção de soro fermento no Brasil é bastante diversificada e, geralmente, adaptada à características regionais. Nenhuma das indústrias que responderam o questionário utilizavam exatamente os procedimentos descritos por Guimarães (1991) ou Furtado (1997). Porém, as formas de obtenção nos laticínios B, C e E podem ser consideradas como variações dos processos descritos pelos autores. Os queijos fabricados com soro fermento pelos laticínios são provolone, mussarela e parmesão, sendo este último o mais citado pelos entrevistados. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas do soro fermento estão registradas na Tabela 2.

TABELA 1 Características na produção de soro fermento em cinco laticínios brasileiros.

	Identificação dos laticínios				
	A	B	C	D	E
Procedência	Norte do PR	Sul de MG	Oeste de SP	Triângulo MG	Sul de MG
Manutenção	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente	Ambiente
Conservação do soro	Ambiente	Isopor no Ambiente	Ambiente	Ambiente	Frio após 130 °D
Rodízio	Não	Sim	Não	Não	Sim
Controle	Acidez, coliforme	Acidez	Acidez	Acidez	Acidez
Produção Litros/dia	Provolone 18000	Provolone 500	Provolone 9000 Parmesão 4000	Mussarela 75000 Parmesão 55000	Provolone 300

TABELA 2 Análises físico-químicas de soro fermento obtidos de cinco diferentes laticínios¹.

	Local da coleta				
	A	B	C	D	E
Acidez (°D)	88	112	150	138	137
PH	3,72	3,20	3,14	3,16	3,15
Gordura (%)	0,9	0,3	0,5	0,4	0,7
Densidade (g/l)	1024,2	1022,2	1023,4	1021,8	1022,5
NaCl (%)	0,4	0,6	0,9	0,3	0,3
SNG ² (%)	5,91	5,16	5,41	5,36	5,34

¹ Média de duas repetições da mesma amostra.

² SNG – sólidos não gordurosos.

Dois laticínios destacaram observações quando responderam o questionário. Foram as indústrias B e E, que relataram utilizar “isca” de outras fábricas quando detectam falta de atividade ou outros problemas com o soro fermento.

Os resultados obtidos na análise físico-química indicam diferenças na composição do soro dependente da procedência. Porém, como somente uma amostra foi coletada, não foi possível o tratamento estatístico dos dados, nem correlacionar as características físico-químicas com o número e tipo de lactobacilos termófilos isolados.

4.1.2 Seleção dos lactobacilos termófilos

Foram considerados lactobacilos termófilos todos os microrganismos capazes de crescer em ágar MRS pH 5,4 após incubação, em anaerobiose a 43°C por 48 horas. A contagem de lactobacilos termófilos, as características das colônias encontradas e a morfologia ao microscópio óptico podem ser observadas na Tabela 3. Foram selecionados, para estudos posteriores, grupos de microrganismos, sendo o critério utilizado baseado nas diferenças das características das colônias e morfologia ao microscópio óptico, totalizando o isolamento de 35 cepas, que foram purificadas e congeladas após adição de 15% de glicerol estéril.

As contagens de lactobacilos termófilos de todos os laticínios foram superiores a 10^7 ufc/mL, com exceção do soro procedente do laticínio C, que apresentou contagem de $9,3 \times 10^5$ ufc/mL. Esse laticínio está localizado no oeste do estado de São Paulo, na divisa com o Mato Grosso do Sul e o soro fermento foi remetido via serviço de correios em caixa de isopor, chegando ao laboratório cerca de 48 horas após a remessa. Como essa amostra apresentou o maior índice de acidez observado (150 °D), provavelmente a menor contagem de lactobacilos

deve-se ao fato de os microrganismos já se encontrarem na fase de declínio de crescimento ou autolisados, devido ao esgotamento dos nutrientes no soro e baixo pH (3,4). Este não é o número de microrganismos normalmente inoculados via soro fermento, pelo laticínio, na fabricação dos queijos.

As colônias isoladas foram submetidas às provas de catalase, indol, H₂S, redução do nitrato e crescimento a 15 °C. Os microrganismos isolados apresentaram resultados negativos em todas as provas, sendo então, considerados como do gênero *Lactobacillus* (Kandler e Weiss, 1986).

TABELA 3 Contagem de lactobacilos termófilos (ufc/mL) e características das colônias.

Laticínio	Contagem (ufc/mL)	Características das colônias	Morfologia ao microscópio óptico
A	$9,3 \times 10^7$	Geométrica, fundo do ágar Branca, redonda, meio do ágar Branca, superfície do ágar	Bacilos longos, Gram+ Bacilo longo, cadeia, Gram+ Bacilo médio, cadeia, Gram+
B	$2,8 \times 10^8$	Branca, brilhante, todo o ágar Geométrica, superfície Branca, grande, fundo do ágar	Bacilo médio, Gram + Bacilo médio-curto, Gram+ Bacilo médio, Gram+
C	$9,3 \times 10^5$	Geométrica, fundo-meio do ágar Branca, grande, borda irregular Branca, brilhante, superfície	Bacilo longo-médio, Gram + Bacilo curto, cadeia, Gram+ Bacilo médio, Gram+
D	$3,3 \times 10^7$	Geométrica, bege, centro definido Branca, grande, centro escuro Branca, brilhante, superfície Branca, escura, irregular, granulosa	Bacilo curto-médio, Gram+ Bacilo curto, cadeia, Gram+ Bacilo curto, cadeia, Gram+ Bacilo curto-médio, Gram+
E	$6,8 \times 10^7$	Branca, superfície, brilhante Geométrica, meio-fundo do ágar Média, meio do ágar, bege	Bacilos médios, Gram+ Bacilo médio-longo, Gram+ Bacilo médio-longos, Gram+

4.1.3 Caracterização dos microrganismos isolados

Das 35 culturas congeladas, seis não apresentaram crescimento após descongelamento ou não cresceram nas repicagens sucessivas. Kandler e Weiss (1986) também descreveram lactobacilos que morriam ou desapareciam rapidamente quando submetidos a congelamento ou repicagens. Duas cepas comerciais, identificadas como Cc1 (Lh-B02 - Chr. Hansen) e Cc2 (Lb. helv.7 - Wiesby) e os 29 isolados restantes foram submetidos à caracterização por meio da fermentação de carboidratos, utilizando as galerias API CH50 (Tabela 4a 4b), juntamente com as duas cepas comerciais. Antes da inoculação nas galerias API, as culturas foram repicadas três vezes em caldo MRS e, neste momento, foi observada a produção de gás por seis cepas (A2, B3, B4, C3, D7 e D8). Essa característica descaracterizou estes microrganismos como *L. helveticus*, que são obrigatoriamente homofermentativos (Torriani *et al.*, 1994). Os microrganismos produtores de gás isolados também foram caracterizados por meio do perfil de fermentação de carboidratos e comparados às tabelas de classificação disponíveis na literatura.

A utilização das características da colônias em ágar MRS e da morfologia ao microscópio óptico como critério na seleção de lactobacilos termófilos deve ser realizada com reservas. Foi observado no presente trabalho, que a coloração, intensidade de brilho e presença de pontos escuros centrais, entre outras características, variaram com o tempo de incubação e local de crescimento da colônia no ágar. Colônias puras isoladas apresentaram mudanças nestas características quando estriadas ou crescidas na superfície e, ainda, após sucessivas repicagens. Apesar da manutenção da forma bacilar típica, o tamanho e outras características morfológicas das células foram dependentes do tempo de incubação. Ainda, colônias com características idênticas mostraram diferenças no perfil de fermentação e outras, com aparência distinta, perfil de fermentação idêntico. Uma das cepas isoladas mostrou, particularmente, variação

morfológica atípica após período de incubação superior a 48 horas: a cepa D2. Na comparação das características morfológicas dessa cepa em cultivo de 20 horas em caldo MRS, com a morfologia da cultura no mesmo cultivo após 48 horas de incubação, foi possível verificar alterações no tamanho e coloração do microrganismo (Figura 2). A diferença de coloração apresentada era previsível, já que a técnica empregada, coloração diferencial de Gram, é adequada para culturas jovens (Pelczar et al., 1996).

A utilização da galeria API (Tabela 4a e 4b) não permitiu verificar a espécie de todos os lactobacilos isolados, que foram, então, classificados como *Lactobacillus* sp. A dificuldade na classificação é discutida por diversos autores, já que o gênero *Lactobacillus* comporta mais de 50 espécies, sendo algumas muito distantes geneticamente e outras altamente relacionadas, variando somente na extensão da fermentação de alguns carboidratos (Lortal et al., 1997; Torriani et al., 1994; Klander e Weiss, 1986). Rearranjos da taxonomia desse gênero são esperados (Tailliez et al., 1996; Torriani et al., 1994; Stackebrandt e Teuber, 1987; Gasser, 1970).



FIGURA 2 Microfotografia em microscópio óptico (x1000) da cepa D2 após 20 horas de cultivo em MRS a 37 °C (a) e após 50 horas de incubação nas mesmas condições (b).

TABELA 4a Perfil bioquímico de lactobacilos isolados de soro fermento.

	Ce1	Ce2	A	A1	A2	A3	A4	B	B1	B2	B3	B4	C	C1	C2	C3
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -metil-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	f	+	+	+	+
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -metil-D-manose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -metil-D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nacetil glicosamina	+	-	+	+	-	-	+	f	-	+	-	-	-	+	+	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Sacarose	-	-	-	-	+	-	-	-	+	f	+	+	-	-	+	+
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	f	-	-	+	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinose	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-lixose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-	f	-	-	-	-	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

f – viragem incompleta do indicador ou fermentação após 48 horas de incubação.

TABELA 4b Perfil bioquímico de lactobacilos isolados de soro fermento.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	f	f	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	f	f	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-metil-xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	f	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	f	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	-	+	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-manose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nacetil glicosamina	+	f	-	+	-	-	-	-	+	+	f	+	+	+	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-rafinose	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-lixose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

f – viragem incompleta do indicador ou fermentação após 48 horas de incubação.

As duas cepas comerciais e quinze das 29 cepas isoladas do soro fermento apresentaram perfil de fermentação típico, considerando as variações citadas na literatura, e puderam ser fenotipicamente classificadas como *L. helveticus*.

As cepas Cc1 e Cc2 só apresentaram diferença na fermentação do N-acetil-glicosamina, que foi fermentado por Cc1. Torriani et al. (1994), consideram a fermentação do N-acetil-glicosamina variável entre diferentes espécies de *L. helveticus*, assim como a fermentação da manose e frutose. As duas cepas comerciais foram hábeis na fermentação desses dois últimos carboidratos.

Cinco cepas provenientes do laticínio A foram caracterizadas. Três cepas, A, A1 e A4 apresentaram perfis idênticos e foram classificadas como *L. helveticus*, capazes de fermentar a galactose e inábeis na fermentação da frutose, trealose e maltose. O perfil de fermentação não permitiu a identificação da cepa A2, que apresentou algumas características típicas de *L. fermentum*, obrigatoriamente heterofermentativa, como a produção de gás, fermentação da ribose, maltose, sacarose e lactose. Porém, não apresentou a capacidade de fermentar a frutose, galactose e manose, consideradas como habilidade típica da espécie, sendo então classificada como *Lactobacillus* sp. (Kandler e Weiss, 1986). A cepa A3 foi capaz de fermentar somente a glicose, frutose e a lactose, sendo identificada como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Das cinco cepas isoladas do laticínio B, somente uma pôde ser classificada como *L. helveticus*, a cepa B, que foi capaz de fermentar a galactose, frutose e trealose, porém não a manose. A cepa B1 apresentou comportamento atípico, sendo capaz de fermentar a ribose. Nenhum lactobacilo obrigatoriamente homofermentativo é capaz de fermentar esse carboidrato (Kandler e Weiss, 1986). Como essa cepa não possuía a capacidade de produzir gás em leite desnatado ou caldo MRS e possuía a capacidade de crescer a 45 °C, foi

classificada como *Lactobacillus* sp. A cepa B2 não pôde ser classificada como *L. helveticus*, por apresentar capacidade de fermentar a sacarose. A fermentação da sacarose só aconteceu após 48 horas de incubação e não houve viragem completa do indicador de pH do meio para o amarelo, como aconteceu na fermentação dos outros carboidratos. Kandler e Weiss (1986) e Torriani et al. (1994) consideram que, obrigatoriamente, *L. helveticus* não é capaz de fermentar a sacarose. Hérbert et al. (2000), estudando cepas de lactobacilos termófilos provenientes de queijos italianos e argentinos, verificaram, por meio do seqüenciamento de regiões do rRNA 16S, mutantes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* incapazes de fermentar a sacarose. Esses microrganismos são considerados, obrigatoriamente, fermentadores desse carboidrato. A cepa B2 foi classificada como *Lactobacillus* sp. As cepas B3 e B4, produtoras de gás, foram classificadas como *L. fermentum*, apesar de B4 fermentar fraca e tardiamente a manose, que é considerado negativo para essa espécie.

As cepas C e C1 apresentaram comportamentos fermentativos idênticos e foram identificadas como *L. helveticus*, porém, as duas cepas foram incapazes de fermentar a galactose. A cepa C2 apresentou comportamento típico de *L. helveticus* na maioria dos carboidratos testados, porém mostrou capacidade de fermentar a sacarose, sendo classificada como *Lactobacillus* sp. O perfil de fermentação da cepa C3 caracterizou a espécie obrigatoriamente heterofermentiva e produtora de gás, *L. fermentum*.

As cepas provenientes dos laticínios D foram as que mais apresentaram variabilidade no perfil de fermentação. Três cepas D1, D2 e D3 foram classificadas como *L. helveticus*, apresentando diferenças somente na fermentação dos carboidratos galactose e N-acetil-glicosamina. A cepa D4 foi classificada como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, apesar de ser fracamente positiva na fermentação da manose, carboidrato considerado negativo para a espécie. As cepas D5 e D6 mostraram características de *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus*, porém fermentaram a manose rapidamente (primeiras 12 horas) e foram classificados como *Lactobacillus* sp. A cepa D7 foi classificada como *L. fermentum*, que pertence ao grupo II, obrigatoriamente heterofermentativa (Kander e Weiss, 1986). O perfil de D8 não permitiu sua identificação, sendo a cepa classificada como *Lactobacillus* sp.

O laticínio E foi o que apresentou maior número de isolados caracterizados como *L. helveticus* (E1 a E6), que variaram somente na habilidade em fermentar a galactose ou na intensidade da fermentação. As cepas E2 e E3 fermentaram a galactose rapidamente e a cepa E5 apresentou fermentação lenta e incompleta após 48 horas de incubação. A cepa E6 apresentou perfil idêntico a E1. Todas as cepas foram hábeis na fermentação da frutose, manose e N-acetil-glicosamina, porém a cepa E3 só fermentou o N-acetil-glicosamina após 48 horas de incubação. A cepa E7 foi classificada como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Esse laticínio foi o único, onde não foi isolado nenhum lactobacilo produtor de gás, coincidindo com o fato de ser o único a utilizar a lactofermentação na seleção do leite.

Pesquisas contínuas em *L. helveticus* isolados de fermentos naturais de queijo também mostraram diferenças em termos da fermentação de vários carboidratos, atividade de acidificação, proteólise e resistência a antibióticos e à lisozima (Fortina et al., 1998). Variações na fermentação da frutose e trealose também foram detectadas em cepas de *L. helveticus* da coleção CRL (provenientes de culturas de referência ATCC, NCDO, CNRZ e queijo Grana italiano) em estudos realizados por Hébert et al. (2000).

Das dezessete cepas, identificadas fenotipicamente como *L. helveticus*, 13 (76,5%) fermentavam a frutose, incluindo as duas cepas comerciais. Dessas, a cepa B foi capaz de fermentar também a maltose e trealose. Torriani et al. (1994) consideram que 11% a 89% das cepas de *L. helveticus* são positivas para frutose, maltose, manose e trealose, concordando com os resultados obtidos.

Somando as duas cepas comerciais e as quinze cepas endógenas classificadas como *L. helveticus*, 11 (65%) apresentaram capacidade de fermentar a galactose, sendo que 2 (12%) fermentaram fracamente esse carboidrato, apresentando fermentação incompleta após 48 horas de incubação. A fermentação completa da galactose é considerada desejável na produção de mussarela com baixo efeito *browning* (Furtado, 1997; Mukherjee et al., 1994; Matzdorf et al., 1994; Jonhson e Olson, 1985).

4.2 Correlação entre unidades formadoras de colônias e densidade óptica

A relação ufc/mL x DO_{650nm} foi determinada para padronizar o número de microrganismos nos diferentes protocolos utilizados. Como a maioria dos protocolos recomendavam a utilização das culturas na fase exponencial, com densidade óptica de aproximadamente 1,0 (Lortal et al., 1997), os cálculos do número de bactérias foram realizadas para esse valor. Os cálculos foram realizados para as duas cepas comerciais e para os onze isolados classificados como *L. helveticus*, que apresentavam, dentro da origem (laticínio), diferenças na caracterização fenotípica, observadas no padrão de fermentação. Esses isolados foram selecionados para a análise RAPD.

Cepa Cc1

Coeficiente de correlação = 0,83

 $\log \text{ ufc/mL} = 6,1656 + 1,1218 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,28$ antilog = $1,9 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa Cc2**

Coeficiente de correlação = 0,86

 $\log \text{ ufc/mL} = 5,9802 + 1,4047 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,38$ antilog = $2,4 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa A**

Coeficiente de correlação = 0,93

 $\log \text{ ufc/mL} = 6,62682 + 0,3086 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 6,94$ antilog = $8,6 \times 10^6 \text{ ufc/mL}$ **Cepa B**

Coeficiente de correlação = 0,89

 $\log \text{ ufc/mL} = 6,53398 + 0,971 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,50$ antilog = $3,2 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa C**

Coeficiente de correlação = 0,86

 $\log \text{ ufc/mL} = 7,14853 + 0,3912 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,54$ antilog = $3,5 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa D1**

Coeficiente de correlação = 0,85

 $\log \text{ ufc/mL} = 6,666497 + 0,6878 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,35$ antilog = $2,3 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa D2**

Coeficiente de correlação = 0,92

 $\log \text{ ufc/mL} = 5,313109 + 1,0354 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 6,34$ antilog = $2,2 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa D3**

Coeficiente de correlação = 0,88

 $\log \text{ ufc/mL} = 5,97555 + 1,0702 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,04$ antilog = $1,1 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$ **Cepa E1**

Coeficiente de correlação = 0,91

 $\log \text{ ufc/mL} = 5,68541 + 0,6794 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 6,36$ antilog = $2,3 \times 10^6 \text{ ufc/mL}$ **Cepa E2**

Coeficiente de correlação = 0,84

 $\log \text{ ufc/mL} = 6,59548 + 0,4167 \times \text{DO}$ $\log \text{ ufc/mL} = 7,01$ antilog = $1,0 \times 10^7 \text{ ufc/mL}$

Cepa E3

Coeficiente de correlação = 0,80

Log ufc/mL = 6,58101 + 0,2718xDO

Log ufc/mL = 6,85

Antilog = $7,1 \times 10^6$ ufc/mL

Cepa E4

Coeficiente de correlação = 0,88

log ufc/mL = 6,38047 + 0,7944xDO

log ufc/mL = 7,17

antilog = $1,5 \times 10^7$ ufc/mL

Cepa E5

Coeficiente de correlação = 0,84

Log ufc/mL = 6,51704 + 0,2959x DO

Log ufc/mL = 6,81

Antilog = $6,5 \times 10^7$ ufc/mL

4.3 Padrões de hidrolases de peptidoglicanos em gel SDS-PAGE

O padrão de hidrolases de peptidoglicanos determinados para as cepas endógenas de *L. helveticus* isoladas e para as duas cepas comerciais confirma a utilização dessa técnica como uma ferramenta na identificação dessa espécie (Figura 3a). Todas as cepas estudadas apresentaram uma banda ligeiramente encurvada de cerca de 42 kDa, seguidas de uma a duas bandas finas e uma espessa banda de aproximadamente 30 kDa (Lortal et al., 1997; Hertel et al., 1993). Lortal et al. (1997) afirmam que essas enzimas são estruturas altamente conservadas que podem ser utilizadas como ferramenta taxonômica se forem avaliados o peso molecular e a forma típica de bandas. Os autores afirmam que conseguiram com o método separar com pequenas variações de intensidade, dez espécies diferentes de 94 estirpes de lactobacilos.

Apesar da identificação eficiente dos *L. helveticus*, um problema observado com o uso da técnica foi que, para os outros lactobacilos termófilos, o padrão observado após a coloração do gel não foi nítido. Mesmo com iluminação

especial ou do *scanner* com um analisador de imagens, capaz de determinar o tamanho das bandas líticas, a variabilidade na intensidade e largura das bandas dificultou uma avaliação segura. Outra dificuldade verificada foi que o marcador de peso molecular não era corado pelo azul de metileno, corante indicado para coloração do gel com as bandas líticas. Para coloração, fato não mencionado na literatura consultada, foi necessária, após a eletroforese, a separação do marcador e a coloração efetuada com *comassie brilliant blue*. Por esse motivo, para avaliação do tamanho das bandas líticas foi preciso efetuar cálculos matemáticos ou usar um analisador computadorizado.

Para somente mais uma espécie, *Lactobacillus delbrueckii*, o perfil eletroforético de hidrolases foi razoavelmente eficiente na identificação, dentro das condições descritas no protocolo consultado (Lortal et al., 1997). Apesar do perfil apresentado para essa espécie não ser tão regular quanto o perfil de *L. helveticus*, a técnica foi capaz de demonstrar as características da espécie, que são: a presença de duas bandas de aproximadamente 41 kDa, duas bandas difusas intermediárias e outras duas de aproximadamente 29 kDa (Lortal et al., 1997). O método permitiu a identificação das espécies da cepa D5 e D6, que não puderam ser caracterizadas fenotipicamente pelo perfil de fermentação como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, por fermentar a manose, característica não típica dessa espécie. A utilização conjunta do padrão de hidrolases e perfil fermentativo permitiu a identificação das cepas como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. O perfil em SDS-PAGE, porém, não permitiu a identificação das subespécies dos *L. delbrueckii* em *delbrueckii* ou *lactis*. Gatti et al. (1997) utilizaram padrão de peptidoglicanos em SDS-PAGE para identificação de lactobacilos e concluíram que o método foi fidedigno e rápido para caracterizar espécies de lactobacilos termófilos e separar *L. helveticus* de *L. delbrueckii*, porém não permitia a diferenciação entre as subespécies. A Figura 3, ilustra o padrão em SDS-PAGE para cepas de *L. helveticus* e *L. delbrueckii*.

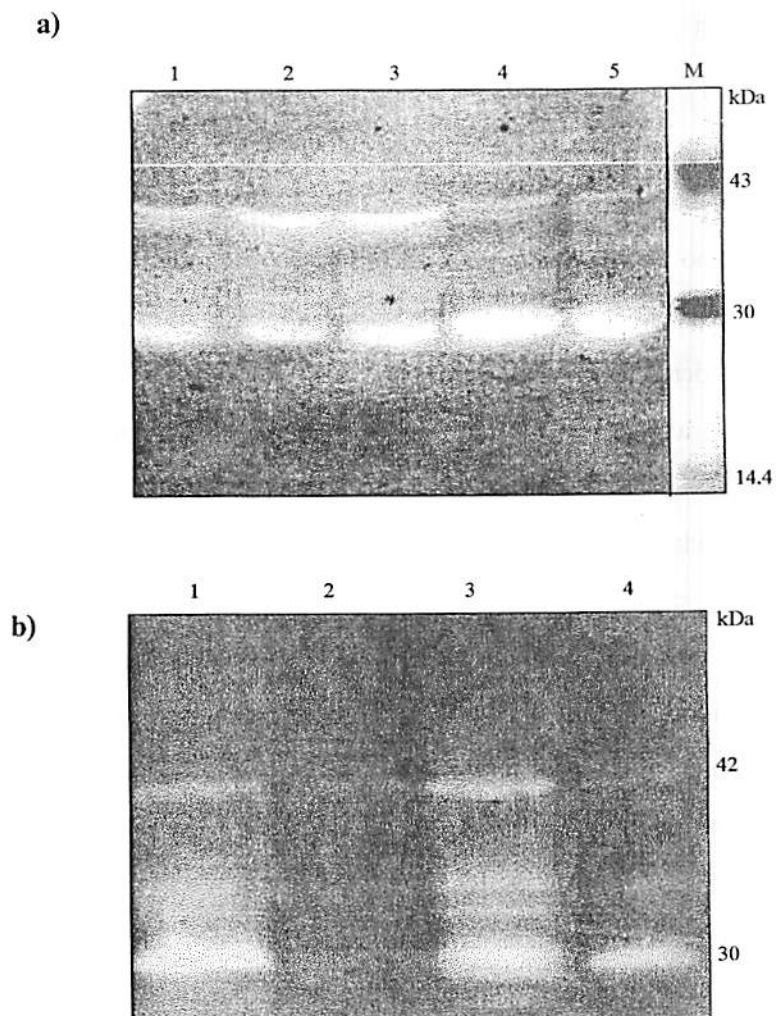


FIGURA 3 Padrão de hidrolases de peptidoglicanos em gel SDS-PAGE. a) *L. helveticus*: M- marcador de peso molecular; 1= cepa B, 2= cepa A, 3 = cepa D1, 4 = cepa C, 5 = cepa E3. b) *L. delbrueckii*: 1= D5, 2= D6, 3= E7, 4= D4.

A Figura 3 permite observar a regularidade na intensidade das bandas líticas, apresentada pelas cepas de *L. helveticus* e as variações de intensidade nas bandas produzidas pelas cepas de *Lactobacillus delbrueckii*.

Nos outros lactobacilos termófilos isolados do soro fermento, que foram caracterizados como *Lactobacillus* sp., a identificação pelo perfil de hidrolases não foi possível. Repetições do método para a mesma cepa apresentaram pouca repetibilidade nos perfis apresentados, não permitindo a utilização dos resultados.

Mesmo para as cepas em que a técnica apresentou regularidade nos resultados, para uso como ferramenta taxonômica, é aconselhável a utilização de uma cepa conhecida como marcadora da espécie. O uso do método como complementação à caracterização pelo perfil de fermentação de carboidratos, pode auxiliar na identificação de cepas de *L. helveticus* e *L. delbrueckii*, permitindo a identificação correta, considerando as variabilidades na fermentação de carboidratos apresentadas pelo gênero.

Apesar das dificuldades apontadas na avaliação do padrão de bandas líticas em SDS-PAGE para identificação dos lactobacilos, a técnica foi eficiente e apresentou repetibilidade na caracterização de *L. helveticus*. O uso conjunto do perfil fermentativo de carboidratos é eficiente na caracterização de cepas de *Lactobacillus delbrueckii*. Essas afirmativas concordam com resultados descritos por Lortal et al. (1997) e Gatti et al. (1997).

4.4 Análise molecular

4.4.1 Extração do DNA

Os produtos obtidos da extração do DNA pelas duas técnicas utilizadas podem ser observados na Figura 4. Para uma quantidade de células padronizadas, uma maior concentração de DNA foi visualizada no gel em forma de bandas mais nítidas quando foi utilizado o método do fenol-clorofórmio. Isto ocorreu devido a uma maior fixação pelo brometo de etídio (colônias 1 a 12), quando comparada ao método *salting out* com proteinase K (colônias 13 a 17). Porém, os resultados obtidos com esse último método nas colônias 18 e 19, aparentemente não apresentaram diferenças quantitativas, indicando que o método *salting out*, se adaptado às condições de lise das células e purificação do DNA, pode ser utilizado. O método *salting out* é mais barato e mais fácil de ser realizado, apresentando a vantagem adicional de não utilizar reagentes tóxicos.

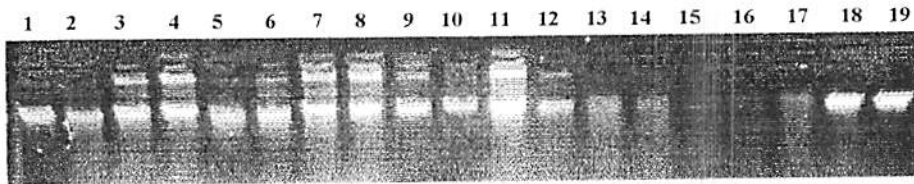


FIGURA 4 Extração do DNA por dois métodos, fenol-clorofórmio e *salting out* com proteinase K.

4.4.2 Seleção dos primers

Dos *primers* testados (série OPX e OPS da Operon Technologies, EUA), foram selecionados, para a análise da diversidade genética existente entre as cepas de *Lactobacillus helveticus*, aqueles que apresentaram maior número de

bandas polimórficas e repetibilidade nos padrões de amplificação com as duas cepas inicialmente testadas. O método utilizado para avaliar a distância genética foi a técnica RAPD. Dos 40 *primers* testados, foram selecionados sete e utilizadas apenas as bandas mais intensas e bem definidas na construção da matriz da distância genética, para evitar erros advindos de interpretação incorreta dos produtos amplificados.

As amplificações resultaram em um total de 45 bandas. O número de bandas por *primer* variou de três a onze posições de regiões amplificadas (Tabela 5), com tamanho estimado variando entre 400 e 2.200 pb.

TABELA 5 Seqüência dos *primers* selecionados para análise RAPD e número de bandas polimórficas amplificadas.

Primer	Seqüência	Número de bandas polimórficas
OPS01	CTA CTG CGC T	3
OPS07	TCC GAT GCT G	4
OPS09	TCC TGC TCC C	7
OPS17	TGG GGA CCA C	8
OPS19	GAG TCA GCA G	11
OPX01	CTG GGC ACG A	5
OPX02	TTC CGC CAC C	7

4.4.3 Análise dos padrões de amplificação com os primers selecionados

A matriz da distância genética entre o DNA dos *L. helveticus* foi construída com base no resultado das amplificações do polimorfismo genômico existente no produto RAPD, as quais foram agrupados para cálculo pelo método

UPGMA. O dendrograma representando a distância genética estimada entre as 13 cepas estudadas pode ser observado na Figura 5.

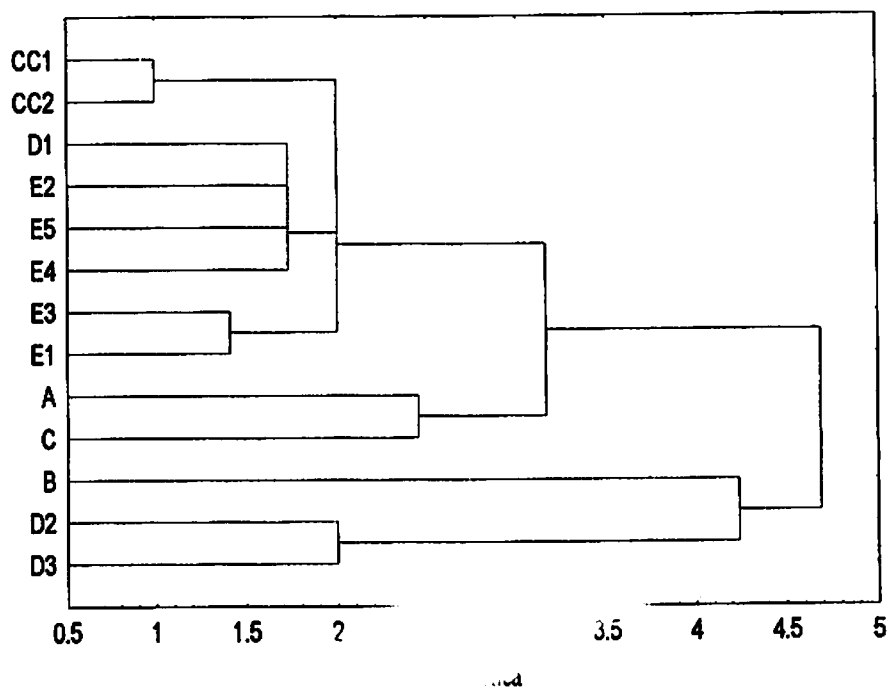


FIGURA 5 Dendrograma representativo das distâncias genéticas pelo método UPGMA de treze cepas de *L. helveticus*, baseado em 45 regiões amplificadas ao acaso pela técnica PCR-RAPD, utilizando 7 primers.

A observação do dendrograma permite a separação, com 48% de distância genética, das treze cepas em dois grupos: o primeiro composto pelas cepas B, D2 e D3 e o segundo abrangendo as demais cepas. A separação desses dois grandes grupos pode ser ilustrada pelo padrão de amplificação do *primer* OPX01 (Figura 6a). Nesse *primer*, o grupo composto pelas cepas B, D2 e D3 não apresenta uma banda de cerca de 800 pb, amplificada pelas outras cepas. Por não apresentar nenhuma região amplificada nesse *primer*, a cepa E3 também pode ser separada de B, D2 e D3. Esse *primer* permite, ainda, verificar diferenças dentro do grupo, que apresenta 43% de distância entre a cepa B e as cepas D2 e D3. Essa diferença pode ser visualizada por bandas de cerca de 900 pb e 1.000 pb, amplificadas por D2 e D3 e não por B e por uma banda de cerca de 1.200 pb, somente amplificada pela cepa B. Essa banda de 1.200 pb pode ser considerada um marcador potencial para a cepa B, que mesmo pertencendo ao grupo de D2 e D3, apresentou a maior diferença detectada em relação às outras cepas estudadas. A separação das cepas B, D2 e D3 também pode ser observada na Figura 6b, devido a uma região de cerca de 400 pb, que só não foi amplificada por essas três cepas.

O segundo grupo, composto pelas cepas Cc1, Cc2, D1, E2, E5, E4, E3, E1, A e C, apresenta uma primeira divisão com 32% de distância genética, que separa as cepas A e C das demais. O padrão de amplificação da PCR obtido com o *primer* OPS19 é capaz de ilustrar a separação das cepas A e C das demais, pela amplificação de uma banda de cerca de 2.200 pb. A distância genética de 25% entre essas cepas A e C também pode ser ilustrada pelo *primer* OPS19, que apresenta uma banda de cerca de 1.200 pb amplificada por C e não por A e três bandas com peso molecular entre 700 pb e 800 pb amplificadas pela cepa A e não amplificadas por C (Figura 6b).

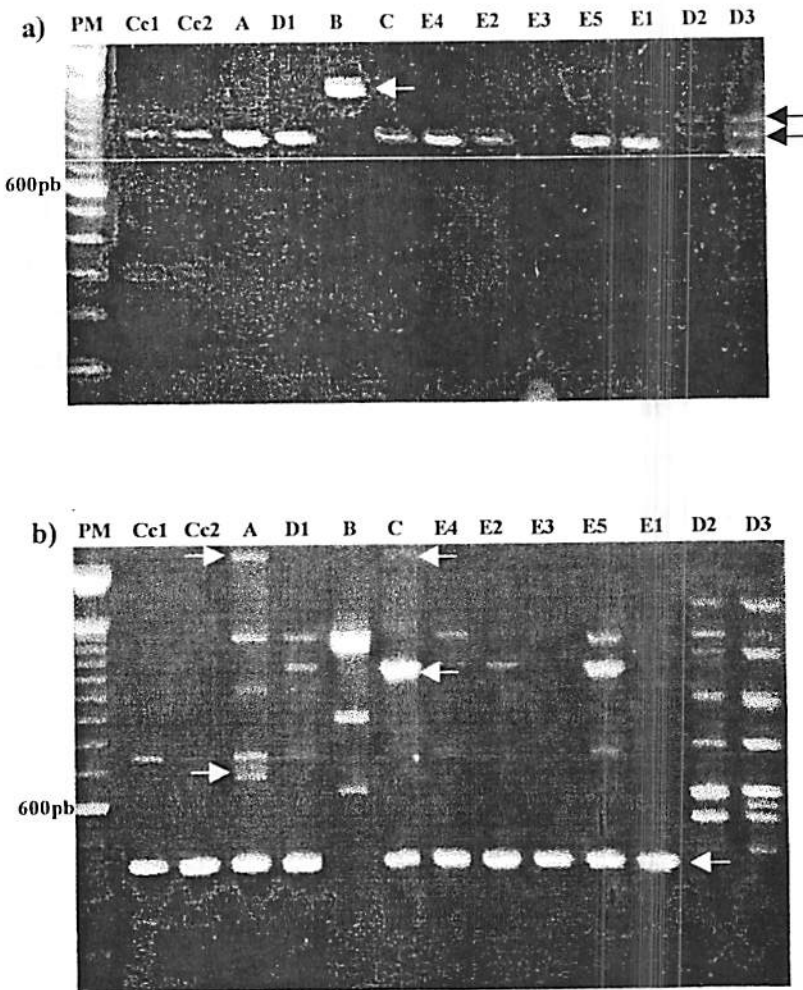


FIGURA 6 Padrão de amplificação de fragmentos de DNA-RAPDs obtidos para treze genótipos de *Lactobacillus helveticus*. PM – marcador de peso molecular. As setas destacam as bandas amplificadas comentadas no texto: a) *primer* OPX01 b) *primer* OPS19.

O primer OPS19 é capaz de demonstrar a homologia genética das cepas Cc1 e Cc2 e das cepas D2 e D3 em várias regiões amplificadas.

As cepas Cc1, Cc2, D1, E2, E5, E4, E3 e E1 apresentaram distância genética de 20%. Dentro desse grupo, as cepas comerciais Cc1 e Cc2 apresentaram a menor diferença detectada, 10%, revelando padrões idênticos na amplificação de vários *primers*. O padrão de amplificação do primer OPS17 permite visualizar uma banda de cerca de 700 pb que separa essas duas cepas das demais (Figura 7a).

As cepas provenientes do laticínio E mantiveram-se no mesmo grupo, apresentando distância genética máxima de 20%. Porém, a cepa D1, proveniente de outro laticínio, apresentou características que a incluíram neste grupo. As cepas E3 e E1 apresentaram distância genética de 14% e as cepas D1, E2, E5 e E4, 18%. A diferenciação entre a cepa D1 e as provenientes do laticínio E, com exceção da cepa E4, pode ser realizada pelo *primer* OPS09, devido à presença de uma banda de aproximadamente 450 pb amplificada pelas cepas E1, E2, E3 e E5 e ausente na cepa D1 (Figura 7b). A diferenciação das cepas D1 e E4 pode ser observada na amplificação do *primer* OPX02, onde pode ser visualizada uma banda adicional de cerca de 500 pb na amplificação do DNA da cepa E4, mas não em D1 (Figura 8).

Entre as várias regiões amplificadas pelos diferentes *primers* utilizados foi possível observar a grande homologia das cepas D2 e D3. O primer OPX02 foi um dos poucos a detectar diferenças na amplificação das duas cepas. A diferença entre as duas cepas pode ser visualizada pela amplificação pela cepa D3, de uma banda de aproximadamente 450 pb e ausente em D2. Esse resultado demonstra a capacidade e a sensibilidade que a técnica PCR-RAPD possui para estudos de filogenia.

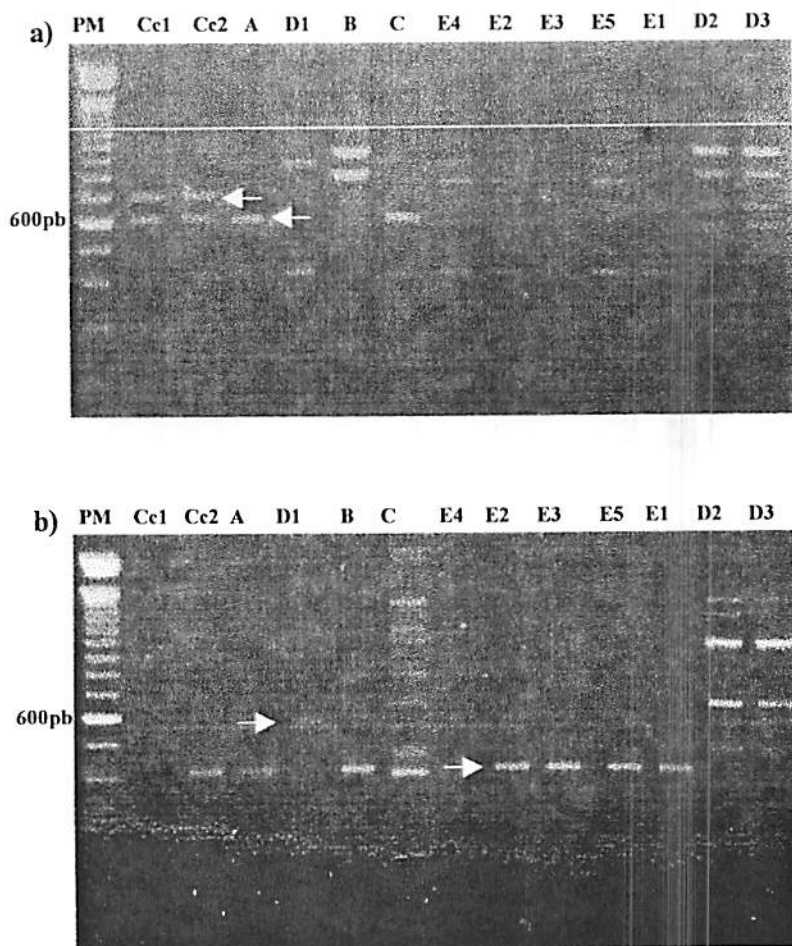


FIGURA 7 Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) para treze genótipos de *Lactobacillus helveticus*: a) *primer* OPS17 b) *primer* OPS09. PM – marcador de peso molecular. As setas destacam as bandas amplificadas comentadas no texto.

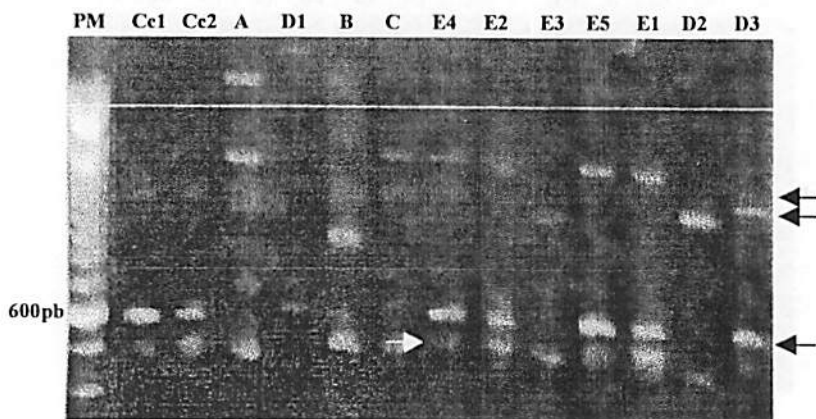


FIGURA 8 Padrão de amplificação de fragmentos de DNA (RAPDs) para 13 genótipos de *Lactobacillus helveticus* com o *primer* OPX02. PM – marcador de peso molecular. As setas destacam as bandas amplificadas comentadas no texto.

No padrão de amplificação do DNA pelo *primer* OPX02 é possível observar a homologia genética entre as cepas Cc1 e Cc2 e as cepas A e C.

O perfil da diversidade genômica, realizado utilizando a técnica RAPD também foi utilizado na diferenciação e reclassificação de grupos de lactobacilos por Tailliez et al. (1996). Os autores concluíram que esse era um bom método para tipagem do gênero, principalmente, quando associado a outras técnicas. Os autores utilizaram dois *primers* de dez pares de bases para reclassificar 78 lactobacilos. Concluíram que, apesar de provas bioquímicas serem úteis na caracterização, não são satisfatórias na taxonomia, se essas forem usadas como

único critério. Também Coconcelli et al. (1997) utilizaram a técnica RAPD para estudar o desenvolvimento de comunidades de microbiota termofílica em soro fermento. A técnica facilitou a identificação de cepas de lactobacilos de um ecossistema que coexistiam em associação microbiológica e permitiu o estudo da dinâmica da população durante dois ciclos de 24 horas de fermentação. Foi revelada a presença de quatro espécies que dominavam o processo de fermentação do soro.

De forma geral, as cepas de *L. helveticus* tenderam a se manter em grupos representativos do seu ecossistema de origem, com exceção da cepa D1, que apresentou maior similaridade com as demais cepas provenientes do laticínio E, do que com as outras isoladas no laticínio D. Os dois laticínios D e E estão localizados em Minas Gerais, porém, em regiões distintas, Triângulo Mineiro e Sul de Minas. As cepas comerciais Cc1 e Cc2, de origem europeia, apresentaram a maior similaridade registrada pelos *primers* testados, com 90% de semelhança. Giraffa et al. (2000) também observaram a presença de genótipos específicos de *Lactobacillus helveticus*, associados a ecossistemas leiteiros italianos. Os autores basearam essa afirmativa na utilização de análise estatística multivariada para avaliar resultados de estudos de ribotipagem e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

Provavelmente, os ecossistemas de origem das cepas e as diferentes tecnologias de fabricação empregadas nos laticínios selecionaram estirpes com características genotípicas que expressam fenótipos adaptados às condições locais. Porém, a metodologia empregada nesse estudo não permite associar as diferenças detectadas no genótipo à sua expressão.

4.5 Características tecnológicas

4.5.1 Produção de ácido láctico

L. helveticus utiliza a via glicolítica para fermentação da lactose, sendo a redução do ácido pirúvico a ácido láctico catalisada pela enzima lactato desidrogenase (Arnaud e Guiraud, 1985). As cepas de *L. helveticus* selecionadas divergiram na capacidade de produzir lactato em leite desnatado reconstituído (LRD), após 24 e 48 horas de incubação a 37 °C (Tabela 6). Todas as cepas após 24 horas foram capazes de reduzir o pH até valores menores ou iguais a 4,6 (dados não mostrados) e, portanto, capazes de coagular o leite (Fox e Law, 1991).

As porcentagens de lactato produzidas pelas diferentes cepas variaram de 0,73% a 1,78%, após 24 horas de incubação e de 0,99% a 2,35%, após 48 horas de incubação a 37 °C. As cepas apresentaram diferenças quanto à produção de ácido após 24 e 48 horas. Essa diferença pode ser exemplificada pela cepa A. Após 24 horas, essa cepa produziu mais lactato que as cepas E2 e E3, porém, após 48 horas, foi mais eficiente que as cepas E2 e E3 e também D1, D2 e B. Fortina et al. (1998) também verificaram diferenças na atividade de acidificação em cepas de *L. helveticus* e recomendaram que essa característica deve ser utilizada para seleção de culturas para perfis biotecnológicos de interesse.

Torriani et al. (1994) afirmam que *L. helveticus* são homofermentativas e fortes produtoras de lactato, com capacidade de produzir concentrações maiores que 2%. Furtado (1990a) descreve fermentação da lactose por esses microrganismos até concentrações de aproximadamente 2,7%. Os resultados contidos na Tabela 6 demonstram que somente a cepa comercial Cc2 e as cepas E1, E4 e E5 foram capazes de produzir lactato em LDR em concentrações maiores que 2%. Porém, Torriani et al. (1994) e Furtado (1990a) não

descreveram o tipo de meio ou temperatura em que essa concentração de ácido é obtida.


TABELA 6 Produção de lactato (%) por cepas de *L. helveticus* isoladas de soro fermento natural e por duas culturas comerciais, após inoculação em LRD por 24 e 48 horas a 37°C¹.

CEPA	% de lactato	
	24 horas	48 horas
CC2	1,77 ± 0,01 ^a	2,35 ± 0,03 ^a
E4	1,78 ± 0,01 ^a	2,11 ± 0,13 ^{ab}
E5	1,52 ± 0,02 ^b	2,01 ± 0,02 ^b
E1	1,43 ± 0,03 ^{bc}	2,01 ± 0,03 ^b
C	1,35 ± 0,05 ^{cd}	1,86 ± 0,03 ^{bc}
D3	1,24 ± 0,02 ^d	1,72 ± 0,04 ^c
D2	1,09 ± 0,02 ^e	1,23 ± 0,01 ^{de}
B	1,02 ± 0,02 ^{ef}	1,20 ± 0,18 ^{de}
Cc1	1,00 ± 0,01 ^{ef}	1,91 ± 0,03 ^{bc}
D1	0,93 ± 0,01 ^{fg}	1,11 ± 0,00 ^{de}
A	0,81 ± 0,01 ^{gh}	1,35 ± 0,02 ^d
E3	0,78 ± 0,04 ^h	0,99 ± 0,02 ^e
E2	0,73 ± 0,02 ^h	1,02 ± 0,00 ^e

¹ Média de duas repetições.

a, b... Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$).
LRD – Leite desnatado reconstituído (12%), estéril.

A composição do meio de inoculação e a temperatura de incubação influenciam na produção de ácido. Norton et al. (1994a) verificaram aumento na produção de ácido em biorreatores com a suplementação de extrato de levedura ao soro. Amrane et al. (1993) também verificaram a influência da composição do meio na produção de ácido por *L. helveticus*. Em 1991, Ibrahim constatou que, além do tipo de microrganismo e do período de incubação, a suplementação



da alimentação de búfalas com extrato de levedura aumentava a atividade proteolítica e de produção de ácido. Ibrahim et al. (1990) verificaram influência do tipo e da composição do leite, tipo de cultura e período de incubação em várias atividades bioquímicas, como produção de ácido e proteólise, mostrando uma interação significativa de todos esses fatores.

A produção de lactato pode ser também útil como ferramenta na caracterização de *L. helveticus* e utilizada em análises multivariadas para identificação da origem de cepas. Gatti et al. (1999) verificaram maior habilidade na produção de lactato por cepas utilizadas para fabricação de queijo grana (32 cepas de sete laticínios diferentes) quando comparadas a cepas provenientes do soro fermento usado na fabricação de queijos provolone (42 cepas de dez laticínios diferentes). Os autores concluíram que as diferentes tecnologias de fabricação próprias de cada variedade provavelmente selecionaram microrganismos com características distintas.

Comparando as porcentagens de lactato produzidas em LRD, não foi possível correlacionar essa característica com o tipo de queijo produzido, já que nas indústrias estudadas, o soro fermento é comum quando a indústria o utiliza na fabricação de mais de uma variedade. Nos laticínios que só produzem provolone (A, B e E), somente o E teve mais de uma cepa estudada. As cepas E1, E2, E3, E4 e E5 mostraram resultados heterogêneos na produção de lactato em leite desnatado. Porém, há semelhança no comportamento das cepas E2-E3, que mostraram baixa produção e E1-E4-E5, com produção expressiva de lactato em LDR. Provavelmente, as pressões do ambiente selecionaram cepas com diferentes habilidades que, em associação, dominam o processo de fermentação no soro fermento. A produção de lactato em LDR por 24 e 48 horas a 37°C não mostrou correlação com a similaridade ou distância genética determinada pelo padrão de amplificação de fragmentos do DNA-RAPD.

4.5.2 Decaimento do pH em meio MRS

A capacidade das cepas em acidificar o meio de cultura MRS foi monitorada por meio de medidas de pH, por até 50 horas de incubação a 37 °C. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção de um gráfico de tendência. A análise dos gráficos indicou que o decaimento do pH obedeceu a um modelo exponencial. Os gráficos demonstrando a evolução do pH em função do tempo foram sobrepostos nas cepas que mostraram similaridade genética baseada no método RAPD (Figuras 9, 10 e 11). Foram sobrepostos os gráficos das cepas Cc1 e Cc2 (90% de similaridade); cepas D1, E2, E5 e E4 (similaridade de 82%); cepas E3 e E1 (86% de similaridade); cepas A e C (75% de similaridade) e as cepas B, D2 e D3 (67% de similaridade).

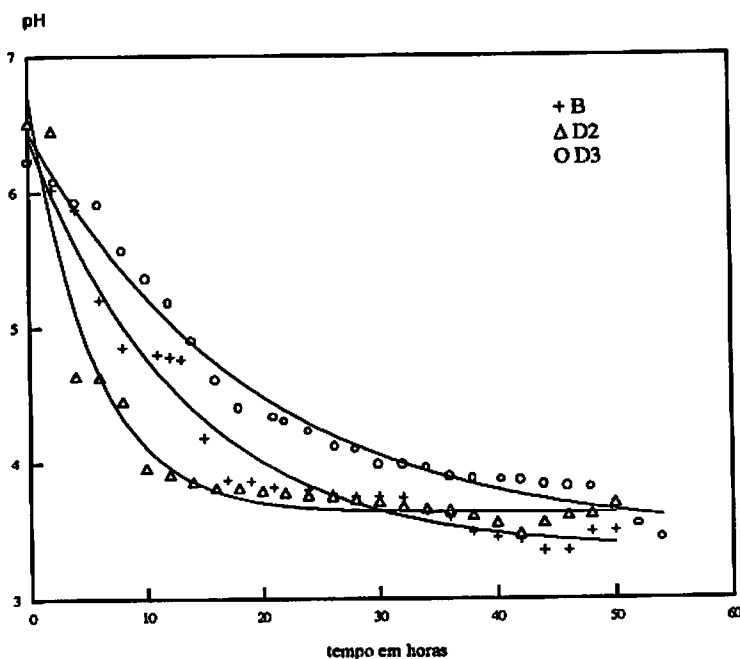


FIGURA 9 Decaimento do pH em função do tempo em horas das cepas de *Lactobacillus helveticus* B, D2 e D3.

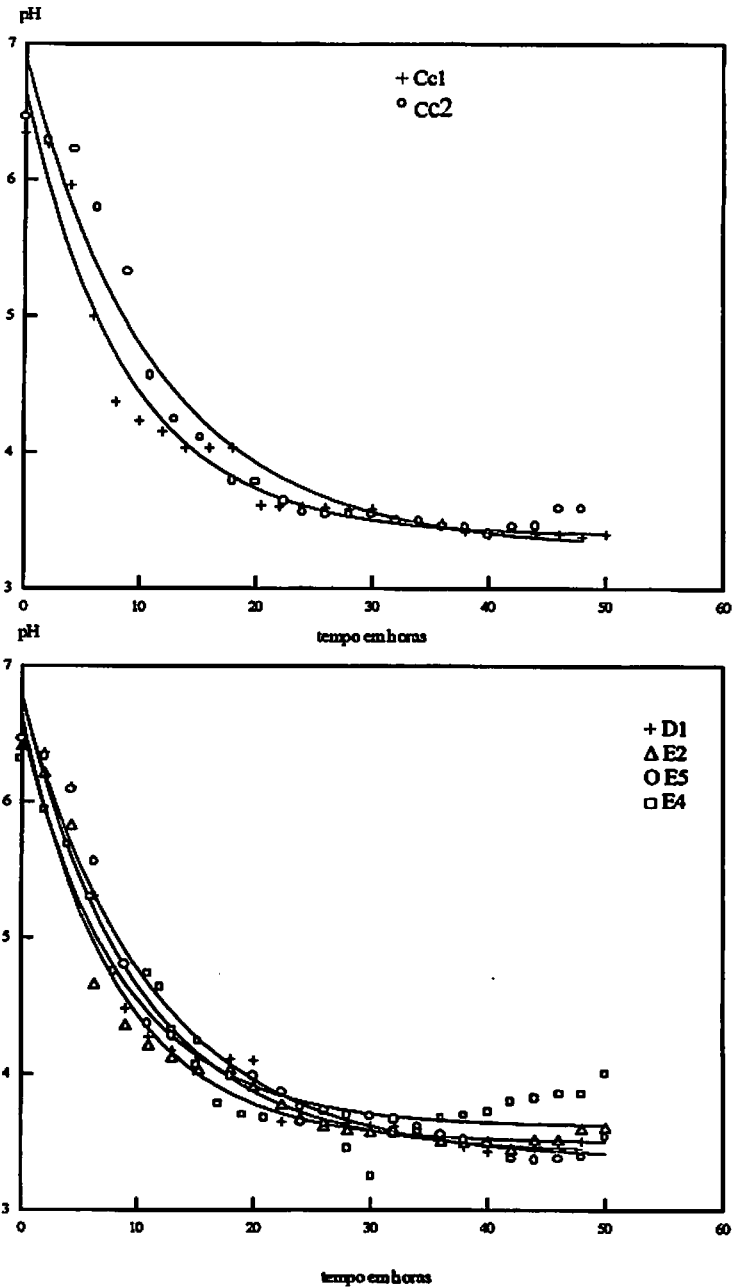


FIGURA 10 Decaimento do pH em função do tempo em horas das cepas de *Lactobacillus helveticus* Cc1 e Cc2 e D1, E2, E4 e E5.

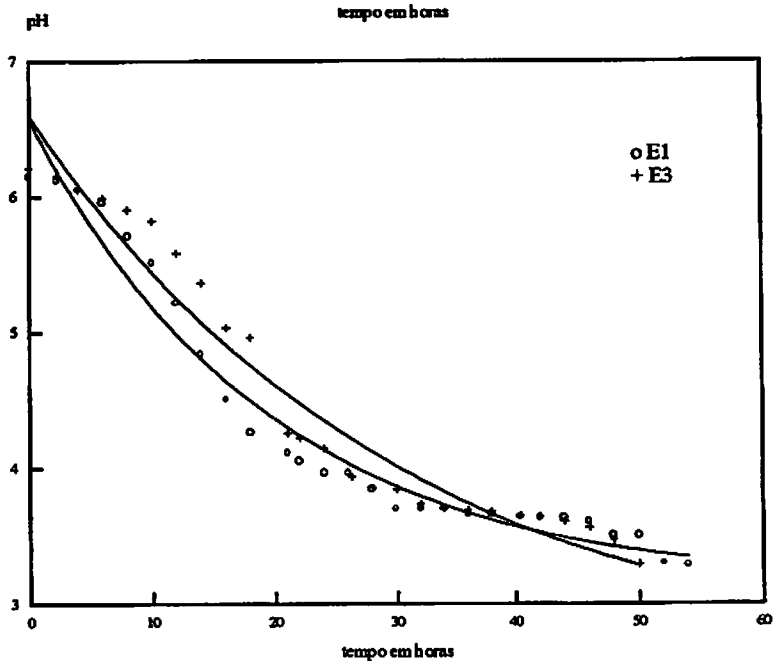
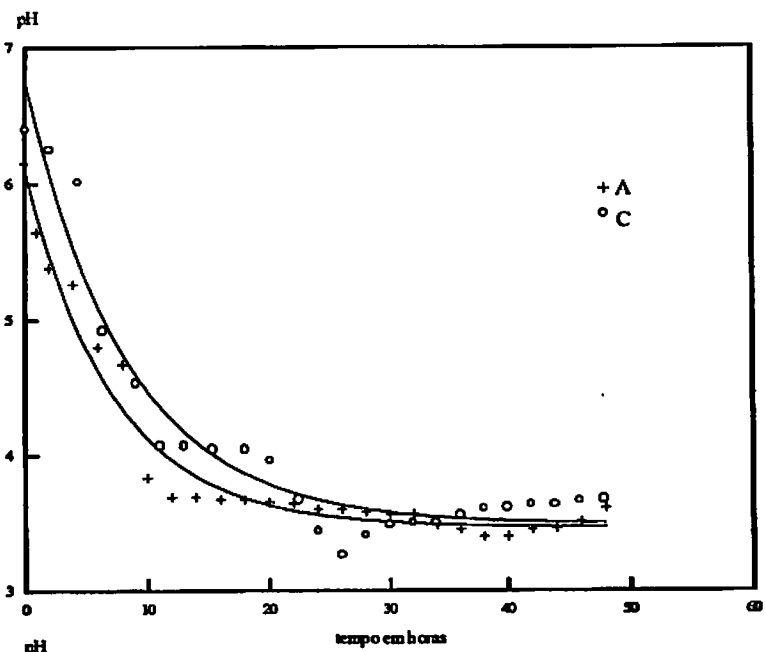


FIGURA 11 Decaimento do pH em função do tempo em horas das cepas de *Lactobacillus helveticus* A e C e E1 e E3.

Apesar das cepas D2 e D3 possuírem distância genética de somente 20% entre si e 43% de distância da cepa B, as cepas D3 e B apresentaram comportamento mais homogêneo quando comparadas à cepa D2. Após 30 horas de incubação, D2 e B, atingiram o mesmo valor de pH, 3,98. A cepa D3 mostrou até 50 horas de incubação, menor habilidade em diminuir o pH do meio e, após esse período, atingiu valores de pH tão baixos quanto as outras.

As cepas Cc1 e Cc2, cepas D1, E2, E5 e E4, E1 e E3 e as cepas A e C apresentaram comportamentos mais homogêneos dentro de seus grupos, indicando habilidade similar de abaixamento do pH em meio MRS a 37 °C. O comportamento gráfico das cepas tendem a mostrar o comportamento dos grupos a que pertenciam pela análise genética. Porém, a metodologia utilizada não permite associar características fenotípicas ao genótipo apresentado.

Todas as cepas foram capazes de produzir ácido em quantidade suficiente para abaixar o pH do meio de cultura até 3,4, sendo as cepas E3, E4 e E1, as que apresentaram os menores valores de pH registrados: 3,26, 3,25 e 3,28, respectivamente. O tempo necessário para abaixamento a esses valores de pH foi diferente para essas cepas procedentes do laticínio E. Enquanto E4 atingiu o pH de 3,4 após 30 horas de cultivo, E1 só apresentou acidificação máxima após 54 horas e a cepa E3, após 50 horas de incubação.

Torriani et al. (1994) afirmam que produção de ácido láctico maior que 2% deve ser um dos critérios para selecionar cepas para utilização como fermento láctico, já que a rápida produção de ácido irá inibir a microbiota indesejável e melhorar a sinérese nos queijos durante as primeiras 24 a 48 horas. Porém, além da produção total de ácido, também deve ser levado em consideração na seleção de cepas, o decaimento do pH em função do tempo. O rápido decaimento do pH é extremamente importante na produção de soro-fermento livre de contaminantes indesejáveis, agindo como um fator limitante

para o crescimento de bactérias do grupo coliforme e butíricas. Bottazzi et al. (1992) verificaram que a utilização de culturas de *L. helveticus* que produzem lactato rapidamente em leite, quando suplementadas com aditivos antiestufamento, foi capaz de inibir a fermentação butírica e propiônica em queijos grana. Os mesmos aditivos antiestufamento utilizados conjuntamente com cepas que produzem acidificação lenta não conseguiram inibir a fermentação indesejável.

O decaimento do pH do meio MRS até pH 4,0 em função do tempo em horas, foi avaliado através da análise do paralelismo das inclinações das retas das equações de regressão. Para cada cepa, foram obtidas equações utilizando o tempo em horas e os valores de pH até o ponto em que o abaixamento atingiu números menores ou iguais a 4,0. A inclinação, demonstrada pelos valores de b, foi analisada e os números obtidos, submetidos ao teste de F (Lark et al., 1968). Os resultados obtidos indicaram que os coeficientes angulares entre as características não foram estatisticamente iguais para todas as retas obtidas ($p < 0,05$). As cepas que apresentaram decaimento linear até pH 4,0 estatisticamente igual podem ser observadas na Tabela 7.

O maior valor absoluto do coeficiente b indica uma maior inclinação da reta e, portanto, maior rapidez na produção de ácido pela cepa. A cepa D2 foi diferente de todas as outras, mostrando grande habilidade em diminuir rapidamente o pH do meio, atingindo pH de 3,95 após 10 horas de incubação. É importante observar que em LDR essa cepa não foi a maior produtora de ácido láctico, indicando a importância de se avaliar tanto a produção de ácido, quanto a rapidez no abaixamento do pH para testar a aptidão tecnológica de cepas.

As retas de algumas cepas que apresentaram inclinações da reta de regressão estatisticamente iguais ($p > 0,05$) foram sobrepostas para exemplificar o comportamento apresentado. A Figura 12 ilustra as sobreposições das retas obtidas para as cepas A e Cc1 e cepas D3 e E3.

TABELA 7 Valores de a e b das equações de decaimento linear do pH até 4,0, em função do tempo em horas, em meio de cultura MRS a 37 °C, de treze cepas de *Lactobacillus helveticus*.

Equação: $\text{pH} = a + b \times t$.

Cepas	Coefficiente a	Coefficiente b	Igualdade entre coeficientes b*	r p>0,01
A	5,96831	-0,16041	E5	-0,97
Cc1	6,39833	-0,18452	A	-0,92
B	6,22856	-0,11850	D1, E1, E2, C	-0,97
E4	6,21999	-0,13280	E2, C, Cc2	-0,99
E2	6,06179	-0,12170	E4, C, B	-0,91
E3	6,51414	-0,97540	E1, D1, D3	-0,97
E5	6,49677	-0,15667	Cc2, A	-0,97
E1	6,41060	-0,10630	E3, D1, B	-0,98
D3	6,17287	-0,86710	E3	-0,98
D2	6,43667	-0,30000	-**	-0,92
D1	6,24894	-0,10590	E3, E1, B	-0,93
C	6,17114	-0,12370	B, E4, E2	-0,91
Cc2	6,66494	-0,14220	E5, E4	-0,98

MRS – Meio Man, Rogosa e Sharp (1960)

* Igualdade entre coeficiente b (p>0.05)

(-)** diferente de todos os outras (p<0.05).

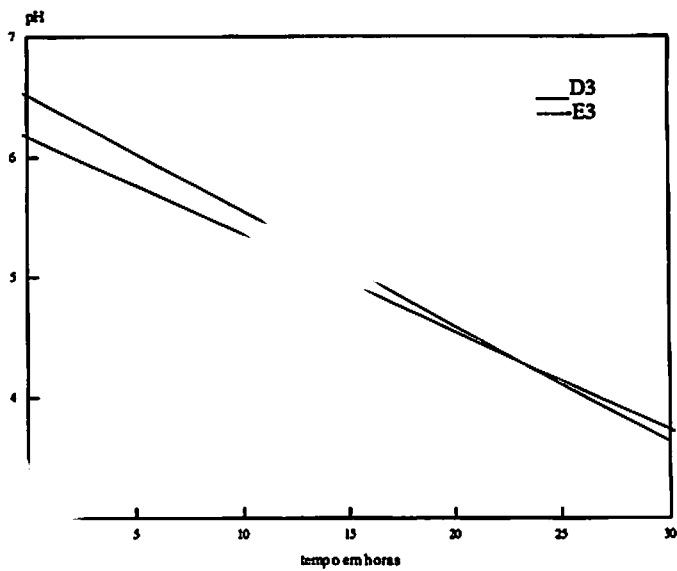
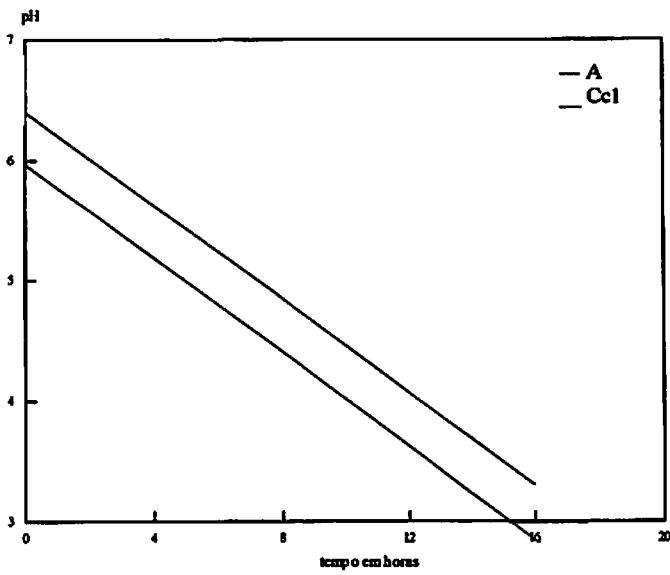


FIGURA 12 Retas de decaimento do pH em função do tempo em horas para algumas cepas de *Lactobacillus helveticus*.

4.5.3 Tolerância ao sal

O crescimento em meio de cultura MRS suplementado com concentrações de 2%, 3%, 4%, 5% e 6% de cloreto de sódio foi avaliado nos isolados selecionados e nas duas cepas comerciais (Tabela 8).

TABELA 8 Densidade óptica a 650nm após inoculação de treze cepas de *Lactobacillus helveticus* em meio de cultura MRS suplementado com diferentes concentrações de cloreto de sódio e incubado por 24 horas¹.

Cepas	Concentrações de cloreto de sódio				
	2%	3%	4%	5%	6%
Cc1	0,460	-	-	-	-
Cc2	1,908	-	-	-	-
A	1,061	-	-	-	-
B	4,710	2,540	0,168	-	-
C	1,714	0,168	0,118	-	-
D1	1,940	-	-	-	-
D2	2,038	0,130	0,124	-	-
D3	1,808	1,773	-	-	-
E1	1,973	-	-	-	-
E2	1,733	-	-	-	-
E3	1,835	-	-	-	-
E4	1,725	-	-	-	-
E5	1,956	1,769	-	-	-

¹ Média de duas repetições.

(-) Densidade óptica menor que 0,1 em 650nm de comprimento de onda.

Todas as cepas foram capazes de crescer em caldo MRS contendo 2% de cloreto de sódio após 24 horas de incubação, porém, somente 3 cepas apresentaram crescimento efetivo em concentração de 3%: as cepas B, D3 e E5. As cepas C e D2 apresentaram DO_{650nm} de 0,168 e 0,130, respectivamente, muito inferior ao desempenho apresentado na concentração de 2% de sal. Apesar das cepas B, C e D2 apresentarem densidade óptica mensurável em MRS com 4% de cloreto de sódio, as leituras foram sempre inferiores a 0,2 de DO_{650nm} . Provavelmente, os crescimentos inibidos apresentados, foram devido à ação bacteriostática do NaCl sobre essas cepas. Torriani et al. (1994) afirmam que *L. helveticus* é capaz de crescer em concentrações de 3% e não a 4%, discordando, em parte, dos resultados obtidos no presente trabalho. Nenhuma das cepas estudadas foi capaz de crescer em meio MRS suplementado com 5% ou 6% de cloreto de sódio.

A seleção de cepas com tolerância ao cloreto de sódio é interessante para a indústria laticinista, apesar da maioria das variedades de queijo não apresentar concentrações maiores que 2% de sal. A preferência por cepas tolerantes é justificada pelo fato de que muitas das variedades de queijos são salgadas em salmoura. Nesse caso, a dispersão do sal acontece lentamente, do exterior para o interior, havendo concentração na periferia do queijo no início da maturação (Furtado, 1997). Além de manter a viabilidade durante a maturação dos queijos, microrganismos componentes do fermento láctico serão melhores competidores com contaminantes como fungos e leveduras, se apresentarem suas características fisiológicas normais na presença deste mineral.

A tolerância ou crescimento nas diferentes concentrações de sal testadas mostrou certa semelhança com as associações entre os microrganismos apontadas pela análise RAPD, com exceção dos resultados obtidos para as cepas comerciais e cepas A e C. Essa observação é apenas visual, já que a metodologia

utilizada e o número de cepas testadas não permitem tratar estatisticamente os dados e garantir a significância da correlação.

4.5.4 Resistência ao tratamento por 55 °C e 65 °C por 30 minutos

Os queijos brasileiros que utilizam soro fermento em sua produção são de massa cozida, como o parmesão, ou submetidos ao calor como etapa normal da sua fabricação, como a filagem da mussarela ou provolone. Para que os microrganismos permaneçam viáveis para desempenhar seus processos fisiológicos e, conseqüentemente, liberem seus produtos metabólicos importantes na maturação, é necessário que resistam ao processo tecnológico a que são submetidos. O comportamento das cepas estudadas após tratamento térmico a 55 °C e 65 °C por 30 minutos está discriminado na Tabela 9.

Todas as cepas estudadas foram capazes de resistir ao tratamento térmico a 55 °C, porém quatro cepas (31%) não apresentaram crescimento após temperatura de 65 °C. As cepas que não cresceram após o tratamento a 65 °C foram C, D1, E4 e a cepa comercial Cc1.

A presença de cepas resistentes a temperatura de 65 °C é mais importante para as indústrias que utilizam a pasteurização lenta, principalmente, se o comportamento fermentativo do microrganismo não apresentar interesse tecnológico nos produtos fabricados. Como esses microrganismos irão sobreviver ao processo, cuidados especiais devem ser tomados na fabricação dos queijos, quando a proteólise e produção excessiva de ácido láctico são indesejáveis, como no caso do queijo minas frescal. Porém, essa variedade não utiliza o soro fermento. Com exceção da mussarela e provolone, onde a temperatura de 65 °C pode ser atingida na filagem, a tecnologia de fabricação empregada na produção das outras variedades de queijo que usam soro fermento, como o parmesão e emental, geralmente não atinge 65 °C. Por outro lado, se o microrganismo apresenta perfil que o torne interessante para a indústria

laticinista, sua manutenção após a pasteurização irá contribuir com os processos tecnológicos empregados pela indústria.

TABELA 9 Crescimento de treze cepas de *Lactobacillus helveticus* após tratamento térmico a 55 °C e 65 °C por 30 minutos.

Cepas	55 °C/30min		65 °C/30min	
	DO	UFC	DO	UFC
Cc1	0,171	-	-	-
Cc2	3,940	+++	0,192	+
A	2,350	+++	0,169	++
B	3,300	+++	1,343	++
C	3,540	+++	0,227	-
D1	0,620	+++	0,187	-
D2	1,692	+++	0,353	++
D3	2,460	+++	0,429	++
E1	1,850	+++	0,415	++
E2	3,550	+++	0,387	++
E3	3,400	+++	0,184	+++
E4	2,820	+++	0,171	-
E5	4,428	+++	3,472	+++

UFC – unidades formadoras de colônias em 1ml da cultura após tratamento térmico.

DO – densidade óptica a 650nm após incubação por 24 horas

+++ crescimento intenso, colônias indiferenciáveis e não sazeis

++ crescimento intenso, colônias diferenciáveis e sazeis

+ crescimento moderado

- ausência de crescimento

4.5.5 Autólise celular

Culturas autolíticas podem ser utilizadas em substituição às culturas tradicionais para agirem como aceleradoras da maturação de queijos. Na lise, o conteúdo intracelular e, conseqüentemente, as enzimas, ficam livres no meio e podem realizar mais rapidamente suas atividades sem necessitar do crescimento dos microrganismos. No estudo da localização citológica das enzimas proteolíticas de *L. helveticus*, foi demonstrado que essas peptidases e aminopeptidases estavam localizadas principalmente no citoplasma (Vescovo e Bottazzi, 1979).

A observação gráfica do crescimento das culturas por meio da DO_{650nm} e do pH em relação ao tempo em horas permitiu distinguir comportamentos diferenciados nos isolados estudados. As cepas B, D2, E1, E2, E3 e E4, após apresentarem crescimento máximo, permaneceram na fase estacionária por algumas horas, antes de ser observado o decaimento da DO_{650nm} (Figura 13). Em contraste, as cepas C, Cc1 e E5, após atingirem densidade óptica máxima, passaram rapidamente à fase de declínio. As cepas D2, Cc2, A e D1 apresentaram comportamento intermediário.

Baseado nos estudos realizados por Kemper e Doyle (1993), Carvalho (1994) e Cappa e Botazzi (1996), as culturas que passaram rapidamente à fase de declínio após alcançarem DO máxima, sem passar pela fase estacionária, foram consideradas potencialmente autolíticas.

As alterações observadas nas células após monitoramento pela observação ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão permitiram a comparação das microfotografias das culturas na fase exponencial de crescimento e de declínio. As microfotografias das culturas B, D3, E1, E2, E3 e E4 indicaram poucas alterações nas células, quando comparadas sua morfologia na fase exponencial de crescimento e após 48 a 50 horas de incubação. As

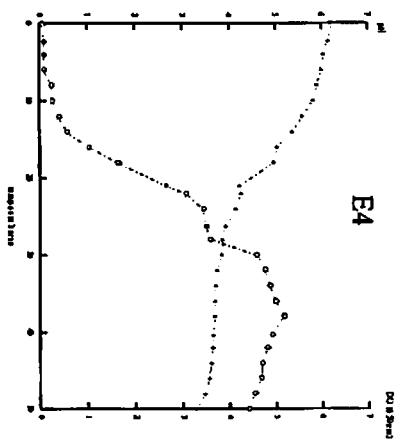
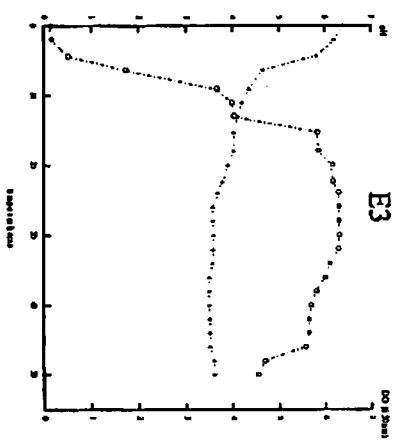
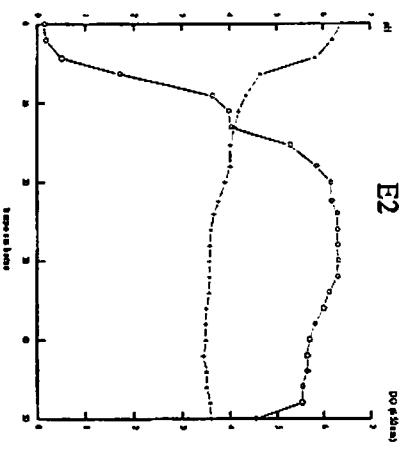
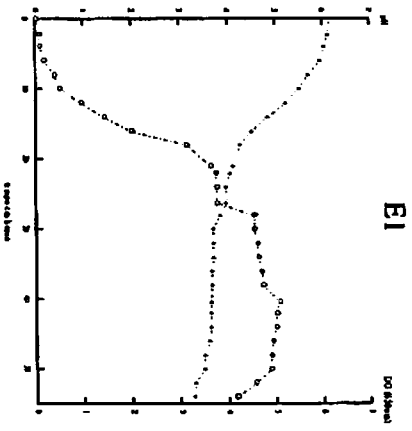
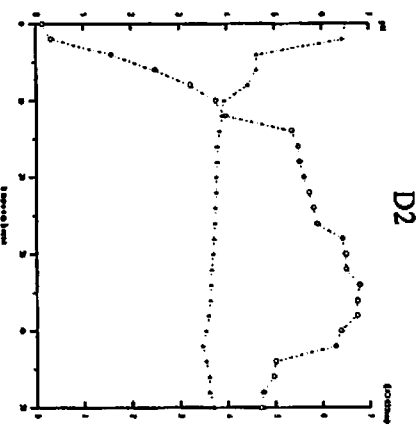
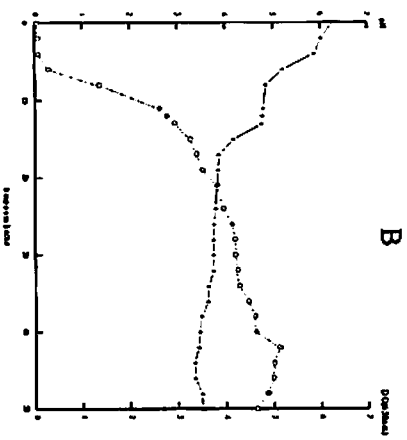


FIGURA 13 Evolução da DO_{650nm} x pH x tempo em horas nas cepas B, D2, E1, E2, E3 e E4.

Figuras 14.a1 e 14.a2 exemplificam essas observações na cepa E2. Nessa figura, pode-se observar poucas modificações na morfologia e coloração das células tanto na microscopia óptica (14.a1,a2) quanto eletrônica (14.a3,a4), indicando que as alterações celulares foram pouco pronunciadas em função do tempo.

Apesar das cepas B, E1, E3 e E4 demonstrarem as mesmas características à microscopia que E2, a cepa D3 mostrou comportamento diferenciado, demonstrando alterações morfológicas e na coloração (Figura 14.b1,b2) nas células após 22 e após 48 horas de incubação. Na microscopia eletrônica de D3, pode ser observada (Figura 15.a1) a presença de uma célula em início de lise ao lado de uma célula íntegra na cultura de 22 horas. Alterações celulares também foram observadas nas microfotografias das células da cepa D3 após declínio da DO_{650nm} . Foram observadas no mesmo campo microscópico, células íntegras, completamente lisadas e com alterações de densidade e interrupção na parede celular (Figura 15.a2), indicando que o conteúdo celular, contendo as endoenzimas, pode ter sido liberado para o meio. A representação gráfica do comportamento dessa cepa não forneceu nenhum esclarecimento adicional, demonstrando que devem ser realizados estudos mais aprofundados para avaliar esse comportamento aparentemente anormal, como o acompanhamento do perfil de proteínas.

A cepa E1, além das alterações semelhantes às observadas nas outras cepas que apresentaram decaimento lento da DO, como poucas modificações na morfologia celular, permitiu a observação de um plasmídeo, (Figura 15b). O plasmídeo aparece no meio da célula, deslocado para o lado esquerdo.

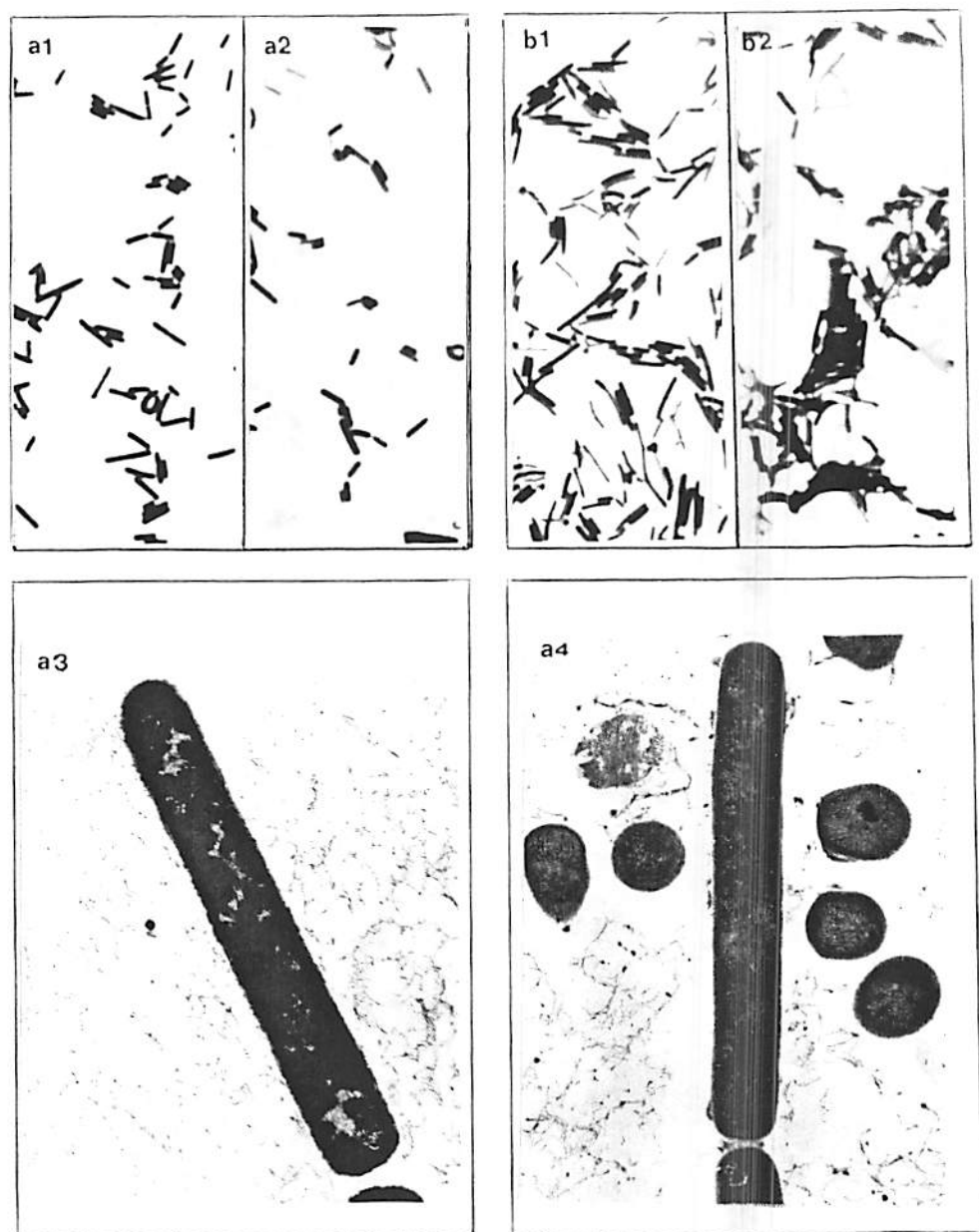


FIGURA 14 Microfotografias das cepas E2 e D3. MO- Microscopia óptica (x1000) e ME- microscopia eletrônica de transmissão (x21000). a1=MO e a3=ME da cepa E2 com 22 horas de incubação. a2=MO e a4=ME da cepa E2 após 48 horas; b1,b2=MO da cepa D3 com 22 e após 48 horas de incubação.

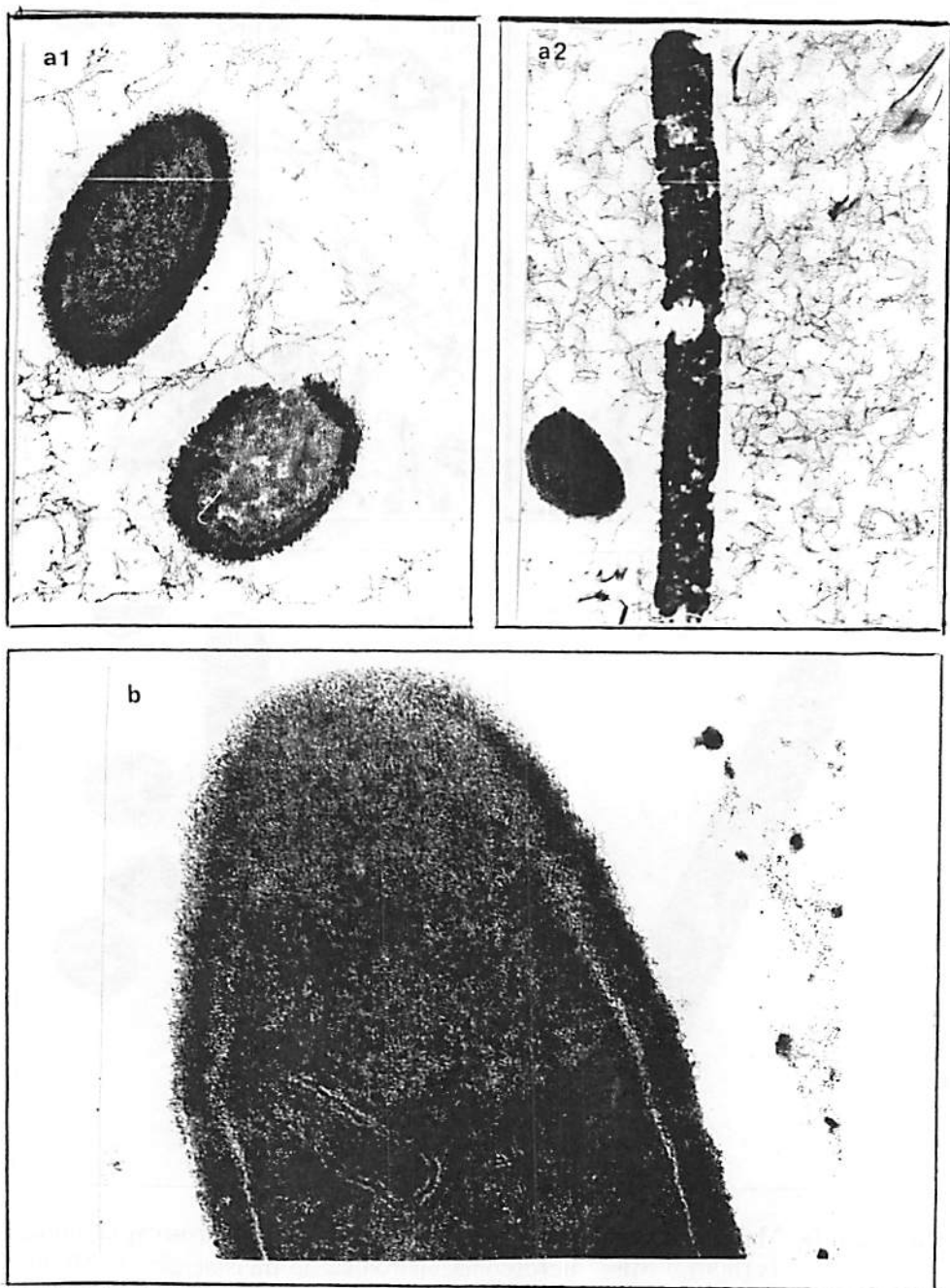


FIGURA 15 Microfotografias das cepas D3 e E1 em microscópio eletrônico de transmissão. a1, a2= D3 com 22 e após 48 horas de incubação (x21000). b= E1 após 48 horas de incubação (x147000).

Plasmídios são objeto de estudo de diversos pesquisadores, pois podem estar relacionados a características tecnológicas de interesse (Torriani et al., 1994; Giraffa et al., 1998; Hébert et al., 2000) como produção de ácido lático, proteólise, resistência à drogas e outras características transmissíveis. As cepas C, Cc1 e E5, apresentaram rápido decaimento da DO após a fase exponencial de crescimento, comportamento típico de cepas autolíticas (Figura 16).

Características de cepas autolíticas foram observadas nas cepas C, Cc1 e E5, através da microscopia de luz e de transmissão. Porém, a cepa C só mostrou alterações na microscopia eletrônica após 48 horas de incubação e apresentou muitas células íntegras entre as lisadas (Figura 17.a1,a2). Na cepa E5, o número de células lisadas em relação às íntegras foi mais pronunciado, inclusive, já apresentando células autolisadas na cultura de 22 horas (Figura 17.b1,b2). A cultura comercial Cc1, na microscopia de luz, já demonstrou alterações com 22 horas de cultura, sendo que, após 48 horas de incubação, as células pareceram ter diminuído de tamanho. Na microscopia eletrônica, as culturas de 22 horas mostraram poucas alterações e as células que pareciam muito longas, quando visualizadas em maior aumento, demonstraram que na realidade, eram cadeias (Figura 17.c1). Após 48 horas, essa cultura mostrou células em diferentes graus de degradação (Figura 17.c2).

O comportamento gráfico das cepas D2, Cc2, D1 e A, que após atingir DO máxima, mostraram comportamento intermediário em relação às outras estudadas, podem ser observados na Figura 18.

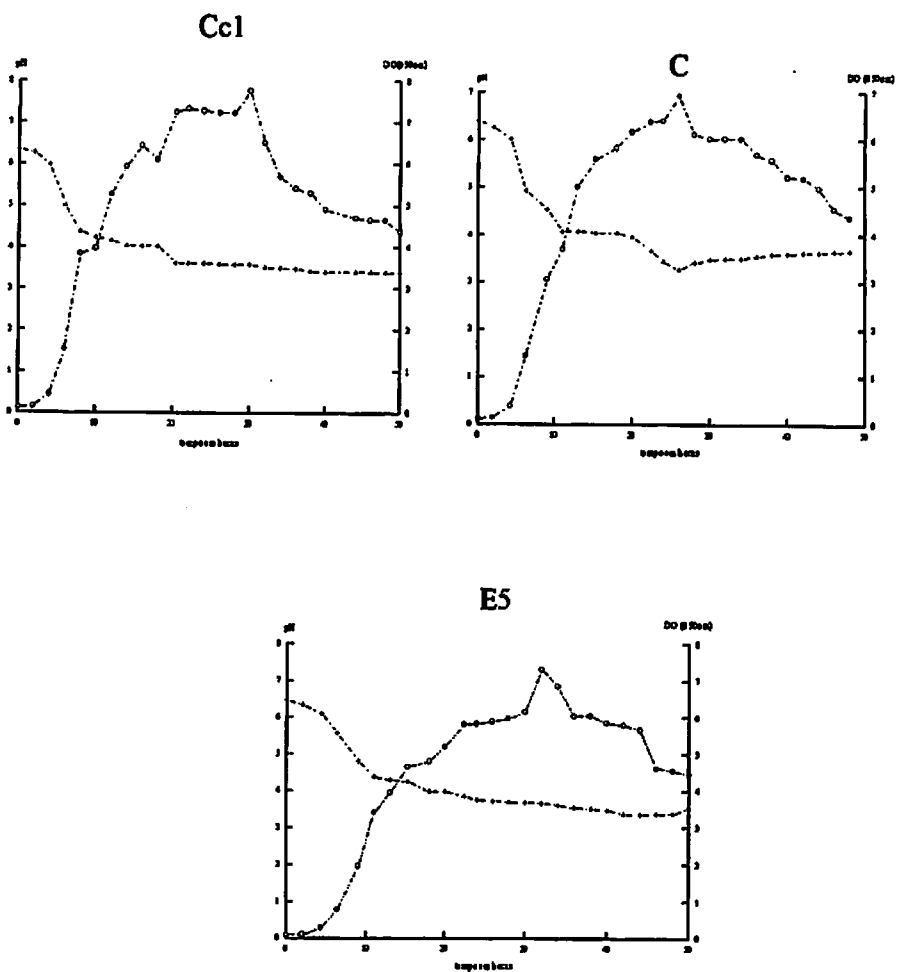


FIGURA 16 Evolução da DO650nm x pH x tempo em horas nas cepas Cc1, E5 e C.

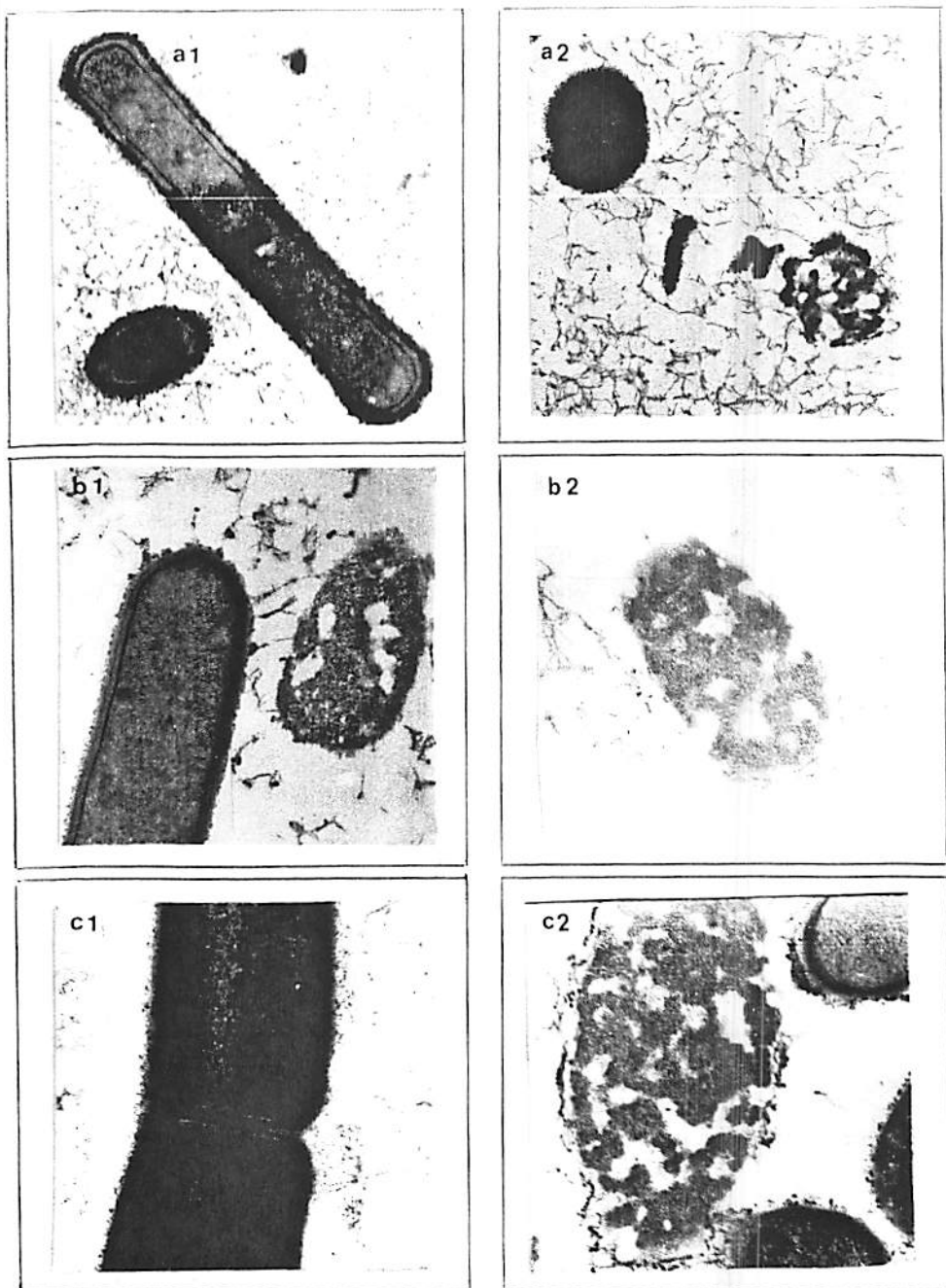


FIGURA 17 Microfotografias das cepas em microscópio eletrônico de transmissão. a1,a2=C (x21000), b1,b2=E5 (x38000), c1,c2= Cc1 (x52000), nas culturas de 22 e após 48 horas de incubação.

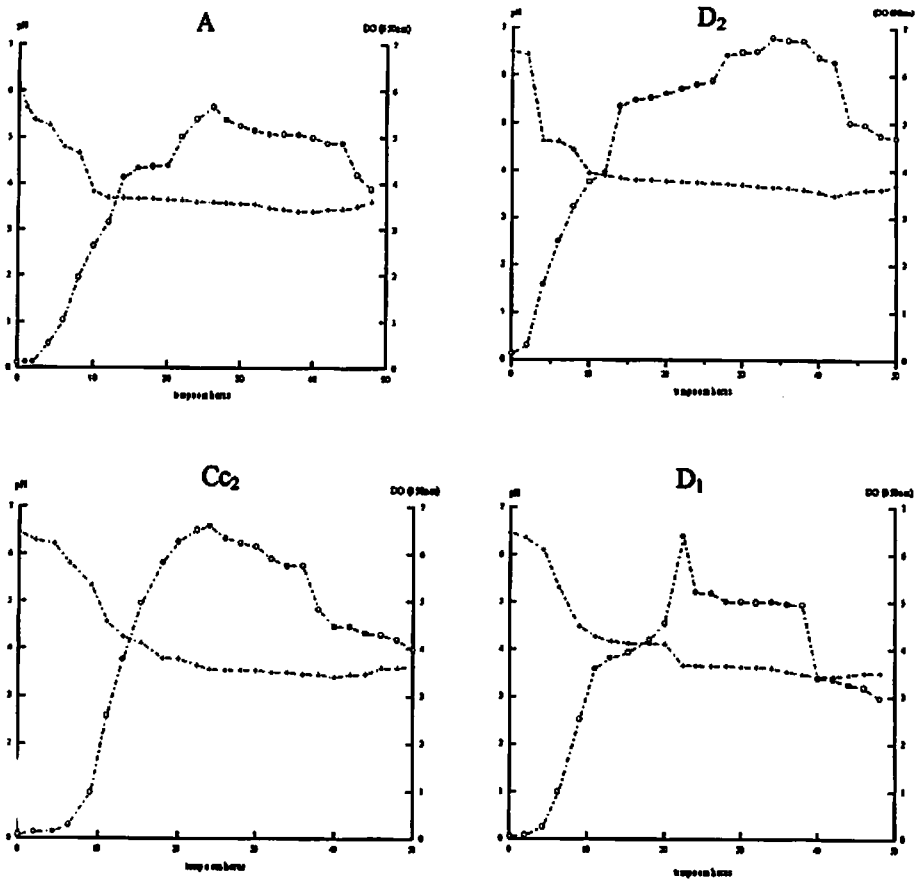


FIGURA 18 Evolução da DO650nm x pH x tempo em horas nas cepas D1, Cc2, D2 e A.

Das cepas que apresentaram comportamento intermediário, D1 foi a que apresentou maiores alterações, tanto na microscopia óptica quanto eletrônica (Figura 19.a1,a2). Porém, o número de células íntegras era maior, se comparadas com as cepas que apresentaram decaimento rápido da DO. A cepa D2 apresentou, na microscopia óptica, diferença em relação ao tamanho observável nas culturas de 22 e 48 horas. Contudo, as alterações na microscopia eletrônica foram pouco evidentes, apresentando células lisadas e íntegras. A cepa comercial Cc2 apresentou poucas alterações na microscopia óptica em culturas de 22 e após 48 horas de incubação, sendo detectada ligeiramente mais pronunciada somente na microscopia eletrônica, após 48 horas. A cepa A mostrou comportamento similar à cepa Cc2 na microscopia eletrônica, porém, as modificações foram mais expressivas na microscopia de luz, onde as células mostraram alterações na coloração e tamanho, nas células fotografadas após 48 horas de incubação.

As mudanças no tamanho das células em culturas, descritas para as cepas Cc1 e D2, também foram observadas por Norton et al. (1993). Os autores observaram que alongamento na cadeia de *L. helveticus* aconteceu progressivamente quando o pH estava fixado entre 5,1 a 6,3, durante a fermentação. O autor justificou esse fenômeno ao tempo de resposta longo de algumas cepas a mudanças do pH. No momento da observação, cerca de 22 horas de cultivo nesse trabalho, o pH estava próximo a 4,0 nas duas cepas, não permitindo correlacionar diretamente as duas observações. Porém, a hipótese dos autores é suficientemente ampla para explicar as duas situações, já que o momento da observação das células coincidiu com algumas horas após o pH atingir decaimento mais expressivo e apresentar resultados quase estacionários.

Carvalho (1994) também confirmou autólise celular em bactérias propiônicas por meio de microscopia eletrônica. O autor discutiu várias hipóteses relacionadas à autólise espontânea em meio de cultura, entre elas, a

carência nutritiva associada à acidificação e temperatura adaptada à atividade do sistema autolítico. Estudos conduzidos em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* demonstraram que a vida celular depende sobretudo do pH intracelular, através do poder tamponante e força iônica do citoplasma, e da pressão de turgescência, diretamente ligada ao pH extracelular e à composição do meio (Ingraham, 1987). Kemper e Doyle (1993) sugerem que a autólise celular é provocada por perturbações iônicas e de pH dentro da parede, incentivando a atividade do sistema autolítico em uma célula e tornando-a incapaz de regular essas mudanças com o meio exterior, sendo esse enfraquecimento diretamente ligado à privação de nutrientes. As maiores alterações observadas nas cepas estudadas coincidiram com os menores valores de pH mensurados no meio de cultura.

O interesse tecnológico que cepas autolíticas despertam por possuírem a capacidade de acelerar a maturação de queijos (Goma et al., 1992, Valence et al., 2000) justifica novas pesquisas. Estudos mais aprofundados utilizando perfil de proteínas (Valence et al., 2000) e análise de imagens, capazes de quantificar a autólise de forma objetiva, devem ser realizados nas cepas que apresentaram potencial autolítico.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas, permitem concluir que:

1. a microbiota do soro fermento natural coletado de cinco laticínios, que representam ecossistemas distintos, é composta predominantemente por lactobacilos termófilos em concentrações próximas a 10^7 ufc/mL;
2. o uso do perfil de fermentação de carboidratos não permitiu a identificação de todas as espécies isoladas, mesmo considerando as variações na fermentação que constam na literatura;
3. o padrão de hidrolases de peptidoglicanos de parede celular foi eficiente na identificação dos *Lactobacillus helveticus*, que apresentou um padrão característico de bandas líticas (1 banda encurvada de cerca 42 kDa, 1 espessa banda de aproximadamente 30 kDa e uma a duas bandas intermediárias pouco definidas). O uso conjunto do perfil de fermentação e padrão de hidrolases de peptidoglicanos é adequado para identificação de *L. helveticus*;
4. o estudo da biodiversidade genética por meio da técnica RAPD, realizada para onze *L. helveticus* endógenos e duas cepas comerciais, separou, com 48% de distância genética, as treze cepas em dois grupos. Divergência genética, dentro dos grupos, em torno de 20%, indicou que as cepas tenderam a se agrupar com outras provenientes do mesmo ecossistema, com exceção de uma das cepas, porém o número de cepas estudadas não permitiu o tratamento estatístico dos dados. As duas cepas comerciais foram as que apresentaram maior homologia, 90%;

5. a produção de lactato em leite desnatado foi diferente ($p < 0.05$) para as 13 cepas estudadas após 24 horas e 48 horas de incubação 37°C. O acompanhamento do pH em meio MRS em função do tempo descreveu um modelo de decaimento exponencial;
6. o abaixamento do pH até 4,0 em função do tempo, avaliado por meio do paralelismo da inclinação das retas de regressão, demonstrou diferenças entre as cepas;
7. todas as 13 cepas foram capazes de crescer em meio MRS suplementado com 2% de cloreto de sódio, porém, só três cepas apresentaram crescimento efetivo em concentrações de 3% e nenhuma das cepas cresceu nas concentrações de 5% e 6% de cloreto de sódio;
8. somente uma cepa não foi capaz de resistir ao tratamento térmico a 55°C por 30 minutos e quatro foram capazes de resistir ao tratamento por 65°C pelo mesmo tempo;
9. três cepas estudadas apresentaram comportamento típico de cepas autolíticas, avaliadas pelo decaimento da densidade óptica em cultura e observação de alterações microscópicas;
10. algumas características tecnológicas estudadas mostraram relação com a diversidade genética detectada, porém, a metodologia utilizada não permite associar genótipos à sua expressão fenotípica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMAR EL TAHRA, M. A.; EL SHAZLY, A.; NASR, M. M.; EL SAADANY, M.; EL-TAHRA, M. A. A. Effect of using autolyzed starter and cheese slurry on acceleration of Ras cheese ripening made from mixture of goat's and cow's milk. *Egyptian Journal of Dairy Science*, Cairo, v. 22, n. 1, p. 67-80, 1994.
- AMRANE, A.; PRIGEN, Y. Influence of media composition on lactic acid production rate from whey by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, Kew, v. 15, n. 3, p. 239-244, Mar. 1993.
- ARDO, Y.; JONSSON, L. Chromatographic profiling of aminopeptidolytic activities in lactobacilli as a tool for strain identification. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 61, n. 4, p. 573-579, Nov. 1994.
- ARNAUD, A.; GIRAUD, J. P. Bioquímica microbiana. In: SCRIBAN, R. *Biotecnologia*. São Paulo: Manole, 1985. cap. 2, p.47-102.
- BOSI, F.; VESCOVO, M.; BOTTAZZI, V.; SCOLARI, G. L.; BATTISTOTTI, B.; BRAMBILLA, E. Lactic acid bacteria for Grana cheese production. Part II: Addition of pure cultures of thermophilic lactic acid bacteria to natural whey starter. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, Parma, v. 42, n. 3, p. 171-179, 1991.
- BOTTAZZI, V. Cultura de fermentos lácticos: cultura natural, starters, cultura combinada. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 4., 1977, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: EPAMIG, 1977. p.43-46.
- BOTTAZZI, V.; SCOLARI, G.L.; CAPPA, F.; BATTISTOTTI, B.; BOSI, F.; BRAMBILLA, E. Lactic acid bacteria for Grana cheese production. Part III: Acidification rate and blowing. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, Parma, v. 43, n. 2, p. 71-93, 1992.
- BOUTON, Y.; GUYOT, P.; DASEN, A.; GRAPPIN, R. Proteolytic activity of thermophilic lactobacilli strains isolated from starters and Comte. I. Validation of laboratory tests on mini-cheeses. *Lait*, Paris, v. 73, n. 3, p. 265-279, 1993.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de**

origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.

CALLEGARI, M. L.; RIBOLI, B.; SANDERS, J. W.; COCCONCELLI, P. S.; KOK, J.; VENEMA, G.; MORELLI, L. The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiology Reading*, v. 144, n. 3, p. 719-726, 1998.

CAMPOS, A.P.S. Divergência genética entre duas populações de *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, apidae, Meliponinae) por marcadores RAPD. 1999. 51p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

CAPPA, F.; BOTAZZI, V. Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 1 St 261. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milano, v. 46, n. 2, p. 299-310, 1996.

CARMINATI, D.; ZENARO, R.; NEVIANI, E.; GIRAFFA, G. Selection and characterization of phage-resistant mutants of *Lactobacillus helveticus*. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, Parma, v. 44, n. 1, p. 33-48, 1993.

CARVALHO, A. F. Systématique des bactéries propioniques laitières: classification, nomenclature et identification. 1994. 227p. (Tese de Doutorado). ENSA, Rennes.

CHAVES, A. H. Isolamento de microrganismos da fermentação aromática e seu emprego na elaboração de manteiga., 1991. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

COCCONCELLI, P. S.; PARISI, M. G.; SENINI, L.; BOTTAZZI, V. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 25, n. 1, p. 8-12, July 1997.

EZZAT N.; EL SODA M.; BOUILLANNE C.; BLANCHARD P. Cell wall associated proteinase in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*. *Milchwissenschaft*, Munchen, n. 40, n. 2, p. 140, Feb. 1985.

FORTINA, M. G.; NICASTRO, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E.; MANACHINI, P. L. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese

starters: the diversity in phenotypic characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 72-80, July 1998.

FOX, P. F.; LAW, J. Enzymology of cheese Ripening. **Food Biotechnology**, New York, v. 5, n. 3, p. 239-262, Sept./Dec. 1991.

FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. 2.ed. São Paulo: Globo, 1990a. 297p.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. 1990b. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FURTADO, M. M. **Manual prático da mussarela (pizza cheese)**. , São Paulo: Master Graf Editora, 1997. 70p.

GASSER, F. Electrophoretic characterization of lactic dehydrogenases in the genus *Lactobacillus*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 62, p. 223-239, 1970.

GATTI, M.; FORNASARI, E.; NEVIANI, E. Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 345-348, Nov. 1997.

GINZINGER, W.; SEBASTIANI, H. Proteolytic activity of thermophilic lactobacilli. **DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft**, Munchen, v. 114, n. 3, p. 49-51, 1993.

GIRAFFA, G., GATTI, M., ROSSETTI, L., SENINI, L., NEVIANI, E. Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1259-1265, Apr. 2000.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; MUCCHETTI, G.; ADDEO, F.; NEVIANI, E. Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic lactobacilli used as natural starters in Grana cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 31-316, Apr. 1998.

GOMAA, M. S.; MEHANA, M. Y.; EL-RAZEK, M.B. Utilization of autolyzed starter to accelerate ripening process of Ras cheese. **Egyptian Journal of Food Science**, Cairo, v. 20, n. 3, p. 313-329, 1992.

GUIMARÃES, P. **Informações práticas sobre laticínios.** 1991. Apostila. Não paginado.

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W.; BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCILEIFER, K. H. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.** 2.ed Germany, 1992. v. 2, p.1535-1594.

HÉBERT, E. M.; De GIORI, G. S.; RAYA, R. R. Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1846-1850, Apr. 2000.

HERTEL, C.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K. H. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 3, p. 463-467, 1993.

HICKEY, M. W.; HILLIER, A. J.; JAGO, G. R. Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 825-831, Apr. 1986.

IBRAHIM, E. M. Growth and biochemical behaviour of lactic acid bacteria in milk of buffaloes fed different ratios of live yeast cultures. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, Assiut, v. 22, n. 3, p. 165-177, 1991.

IBRAHIM, E. M.; MOHRAN, M. A.; HANAFY, N. E. H. Growth and biochemical behaviour of some lactic acid starters in cow's and goat's milk. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, Assiut, v. 21, n. 2, p. 205-219, 1990.

INGRAHAM, J. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. **Cellular and Molecular Biology**, Washington, v. n. p.1543-1554, 1987.

JOHNSON, M. E.; OLSON, N. F. Nonenzymatic browning of Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3143-3147, Dec. 1985.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Regular non sporing Gram positive rods.** In: SNEATH, P. H. A.; MARR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds).

Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wikins, 1986. v. 2, p.1209.

KEMPER, M. A.; DOYLE, R. J. The cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during growth. In: **Dans Bacterial growth and Lysis.** New York: Plenum Press, 1993. p.245-252.

KIM, M. S.; KIM, S. C.; OLSON, N. F. Effect of commercial fungal proteases and freeze-shocked *Lactobacillus helveticus* CDR 101 on accelcrating cheese fermentation. 2. Proteolysis. **Milchwissenschaft, Munchen**, v. 49, n. 8, p. 442-445, Aug. 1994.

KYLA-NIKKILA, K.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M.; PALVA, A. Metabolic engincring of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 for production of pure L(+) lactic acid. **Applied Environmental of Microbiology, Washington**, v. 66, n. 9, p. 3841-3854, Sept. 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during. The assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature, London**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LARK, P. D.; CRAVEN, B. R.; BOSWORTH, R. C. L. **The Handling of Chemical Data.** London: Pergamon Press, 1968. 379p.

LE BORGEOIS, P.; LAUTIER, M.; RITZENTHALER, P. Chromosome mapping in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam**, v. 12, p. 109-124, 1993.

LECLERC, D.; ASSELIN, A. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamyde gel electrophoresis. **Canadian Journal of Microbiology, Ottawa**, v. 35, n. 8, p. 749-753, Aug. 1989.

LING, W. H.; SAXELIN, M.; HANNINEN, O.; SALMINEN, S. Enzyme profile of *Lactobacillus* strain GG by a rapid API ZYM system: a comparison of intestinal bacterial strains. **Microbial Ecology in Health and Disease, Oslo**, v. 7, n. 2, p. 99-104, 1994.

LORTAL, S.; HEIJENOORT, J. VAN; GRUBER, K.; SLEYTR, U. B.; VAN-HEIJENOORT, J. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. **Journal of General Microbiology, London**, v. 138, n. 3, p. 611-618, Mar. 1992.

LORTAL, S.; VALENCE, F.; BIZET, C.; MAUBOIS, J.L. Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification. **Research Microbiology**, Paris, v. 148, n. 6, p. 461-474, July 1997.

MAN, J. C. de; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 130-135, 1960.

MATZDORF, B.; CUPPETT, S. L.; KEELER, L.; HUTKINS, R. W. Browning of Mozzarella cheese during high temperature pizza baking. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 2850-2853, Oct. 1994.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; PLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 16, p. 1215, 1988.

MUKHERJEE, K. K.; HUTKINS, R. W. Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 2839-2849, Oct. 1994.

MURALIDHARAN, K.; WAKELAND, E. K. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplifies polymorphic DNA PCR. **BioTechniques**, Natick, v. 14, p. 362-364, 1993.

NEVES, E. O.; CARVALHO, A. F. de ; FRANCO, P. M. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Caracterização de bactérias produtoras de gás em queijos da região do Campo das Vertentes. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15., 1998, Juiz de Fora. **Anais... Juiz de Fora : EPAMIG/ILCT**, 1998. p.60-65.

NEVIANI, E.; CARINI, S. Microbiology of Parmesan cheese. **Microbiologie, Aliments, Nutrition**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1994.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J.C. Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation. **Food Biotechnology**, New York, v. 7, n. 3, p. 235-251, 1993.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. C. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus*

helveticus for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 16, n. 6, p. 457-466, June 1994a.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. C. Reduction of yeast extract supplementation in lactic acid fermentation of whey permeate by immobilized cell technology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 9, p. 2494-2508, 1994b.

OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, A. F. de; LaGATTA, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F. Isolamento e caracterização de *Lactococcus lactis* endógenos do estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15., 1998, Juiz de Fora. **Anais... Juiz de Fora : EPAMIG/ILCT**, 1998. p.125-129.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, 2521p.

PESIC, D. Evaluation of the quality of yoghurt microflora. **Hrana i Isхранa**, v. 32, n. 4, p. 193-195, 1991.

PILLOUD N.; MALLET, B. DNA probes for the detection of *Lactobacillus helveticus*. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 13, n. 345, 1990.

REINHEIMER, J. A.; MORELLI, L.; BOTTAZZI, V.; SUAREZ, V. Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. **International Dairy Journal**, Auntingdon, v. 5, n. 1, p. 97-103, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3:B.23, E.6.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SHINODA, T.; KUSUDA, D.; ISHIDA, Y.; IKEDA, N.; KANEKO, K.; MASUDA, O.; YANAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 108-113, Feb. 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, J. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SNEATH, P. H. A.; KRIEG, N. R.; HOLT, J. G.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. J.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore : Willians & Wilkins, 1994. 787p.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARP, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v. 2, 1599p.

SOUZA NETTO, A. C. M. . **Isolamento de bactérias naturais produtoras de gás em regiões de Minas Gerais**. 1997. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

STACKEDRANDT, E.; TEUBER, M. Molecular taxonomy and pylogenetic position of lactic acid bacteria. **Biochimie, Paris**, n. 70, p. 317-324, 1988.

TAILIEZ, P.; QUÉNÉE, P.; CCHOPIN, A. Estimativa da diversidade entre as linhagens da coleção CNRZ: aplicação do RAPD a um grupo de lactobacilos. **Lait, Paris**, n. 76, p. 147-158, 1996.

TÉCNICAS de microscopia eletrônica. Rio de Janeiro: ART-Fiocruz, 1982. 430p.

THORMANN, C. E.; OSBORN, T. C. Use of RAPD & RFPL markers for gemplasm evaluation. In: **Applications of RAPD technology to plant breeding**. Minneapólis, 1992. p. 9-11.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An Overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v. 44, p. 163-191, 1994.

VALENCE, F.; DEUSTSCH, S. M.; RICHOUX, R.; GAGNAIRE, V.; LORTAL, S. Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 261-71, May 2000.

VESCOVO M., BOTAZZI, V. Characteristics of lactic acid bacteria in natural whey cultures. VI. Localization of proteolytic system of *Lactobacillus helveticus*. **Scienza e Tecnica Lattiero Casearia**, Parma, n. 30, p. 411, 1979.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 18, p. 7213-7218, 1990.



WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOLFF, K.; SCHIÖEN, E. D.; RIJN, J. P. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 1033-1037, 1993.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 917-922, Apr. 1994.



Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.