

Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas

[Influence of altitude on lactic acid bacteria population of minas artisanal cheese from Serra da Canastra]

M.F.S. Resende¹, H.H.S. Costa¹, E.H.P. Andrade¹, L.B. Acúrcio¹, A.F. Drummond¹,
A.F. Cunha¹, A.C. Nunes³, J.L.S. Moreira⁴, C.F.A.M. Penna², M.R. Souza²

¹Alunos de pós-graduação – EV-UFGM - Belo Horizonte, MG

²Escola de Veterinária – UFGM – Belo Horizonte, MG

³Instituto de Ciências Biológicas – UFGM – Belo Horizonte, MG

⁴Aluno de pós-graduação – ICB-UFGM – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Amostras de queijo de minas artesanal foram coletadas em 18 queijarias localizadas em propriedades rurais da região da Serra da Canastra, Minas Gerais, com o objetivo de avaliar a influência da altitude sobre a população de bactérias acidoláticas. As queijarias estavam distribuídas nas altitudes de 600 a 900m, 900 a 1000m e mais de 1000m. Observaram-se populações mais elevadas de bactérias acidoláticas nas amostras de queijo da altitude de 600 a 900m. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* foram os principais microrganismos isolados e identificados por PCR ARDRA 16S-23S rDNA, além de *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e outras espécies de *Lactobacillus*. Sugere-se que estas espécies estejam adaptadas ao ambiente de produção do queijo de minas artesanal produzido na região, o que resultaria em características sensoriais próprias do produto.

Palavras-chave: queijo, altitude, bactérias acidoláticas, 16S-23S rDNA

ABSTRACT

Samples of minas artisanal cheese were collected in 18 small-scale producer properties located in the rural region of Serra da Canastra, Minas Gerais state, aiming to evaluate the influence of three altitudes, from 600 to 900m, 900 to 1000m, and higher than 1000m, on the lactic acid bacteria (LAB) population. High populations of LAB were observed in the cheese samples, mainly in the lowest altitude. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum* were the major LAB isolated from the cheese samples and identified according to PCR ARDRA 16S-23S rDNA. *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., and other species of *Lactobacillus* genus were also found. It is suggested that these microorganisms are adapted to the production environment of the minas artisanal cheese which result in the unique sensorial properties of the product.

Keywords: cheese, altitude, lactic acid bacteria, 16S-23S rDNA

INTRODUÇÃO

Em Minas Gerais, a produção de queijo de minas artesanal é uma atividade tradicional de vários municípios, além de ser a principal geradora de renda (Furtado, 1980). O queijo de minas artesanal, segundo o Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008 (Minas Gerais, 2008), é aquele

elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru integral, utilizando-se como ingredientes o “pingo” (soro-fermento), coalho e sal e, no ato da prensagem, apenas o processo manual. “Pingo” é a denominação utilizada para uma fração de soro fermentado, originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior, que é coletado e utilizado como

Recebido em 23 de março de 2010

Aceito em 14 de julho de 2011

Email: mfsresende@yahoo.com.br

fermento. A composição do soro-fermento é característica de cada região produtora e contém culturas lácticas selecionadas (Leite, 1993).

Em muitos países, queijos produzidos em pequena escala, a partir de leite cru, ordenhado pelos próprios produtores, são elaborados artesanalmente, a partir de técnicas tradicionais. Na produção desses queijos, normalmente não se empregam culturas iniciadoras comerciais, sendo esta função desempenhada pelas bactérias acidolácticas (BAL) naturalmente presentes no leite e no ambiente (Cogan *et al.*, 1997).

As BAL produzem grande número de enzimas que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis. Essas bactérias utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono, tendo como produtos de seu metabolismo substâncias como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionados, fazendo parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. São denominados microrganismos probióticos, apresentando um amplo espectro de ação contra microrganismos patogênicos e deteriorantes (Salminen e Von Writgh, 1993; Gomes e Malcata, 1999).

O queijo de minas artesanal da Serra de Canastra só é produzido nesta região, onde se combinam, de maneira única, solo, pastagem, clima, altitude e água. As informações sobre o queijo de minas artesanal da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nesta microbiota ainda são limitados. O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência da altitude das queijarias nas populações de BAL presentes no queijo de minas produzido artesanalmente na região da Serra da Canastra, MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram visitadas 18 queijarias, localizadas em propriedades rurais nos municípios de São Roque de Minas, Medeiros e Tapiraí, na região da Serra da Canastra, MG. De cada propriedade, foi coletada uma amostra de queijo artesanal, com

período de maturação entre sete e 15 dias. As queijarias estavam distribuídas em três níveis de altitude – 600 a 900 metros, 900 a 1.000 metros e acima de 1.000 metros –, determinados por aparelho de geoprocessamento remoto (GPS MAP76S, *Garmim Ltd.*, Olathe, Kansas, Estados Unidos).

Alíquotas de 25g foram retiradas de cada amostra de queijo e abrangiam tanto a superfície quanto a parte interna da massa. As alíquotas de cada amostra foram adicionadas em 225mL de salina tamponada estéril (5,61g de NaCl, 1,0g de KH_2PO_4 , 2,0g de Na_2PO_4 e 0,11g de KCl em 1.000mL de água destilada), homogeneizadas e diluídas, seguindo-se a diluição decimal. A partir de cada uma das diluições, uma alíquota de 0,1mL foi espalhada na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar *Man-Rogosa-Sharpe* (MRS: *Merck*, Darmstadt, Alemanha) e ágar M17 (*Himedia*, Mumbai, Índia) (International..., 1988). As placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose, quando foi feito o isolamento. O isolamento, a enumeração, a coloração pelo método de Gram, o teste de catalase, o teste respiratório e a purificação de BAL foram realizados segundo Mac Fadin (1980) e International... (1988). Após o crescimento, as colônias foram enumeradas e os diferentes tipos morfológicos foram estriados em ágar MRS e M17 para a obtenção de culturas puras. As bactérias foram estocadas em *freezer* a -18°C, em caldos MRS e M17 adicionados de glicerol a 20%. Esses cultivos foram destinados à biologia molecular, com a finalidade de identificação das espécies isoladas, por intermédio de análise de restrição do DNA ribossomal (ARDRA) pela amplificação por reação de polimerização em cadeia (PCR) da região espaçadora 16S-23S do rDNA, conforme metodologia proposta por Tisala-Timisjarvi e Alatosava (1997), Tannock *et al.* (1999) e Moreira *et al.* (2005). Esta região do DNA é muito variável entre as espécies de microrganismos, porém bastante conservada em microrganismos da mesma espécie, sendo, então, utilizada em pesquisas de identificação microbiana, em base molecular.

As espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* são genotipicamente muito próximas entre si e podem demonstrar fenótipos semelhantes (Torriani *et al.*, 2001). Apresentam

perfil de restrição enzimática semelhante, o que inviabiliza a diferenciação pela ARDRA. A técnica de PCR *multiplex* utiliza mais de um par de iniciadores na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de várias sequências de DNA. Essa técnica auxilia a identificação de mais de uma espécie de microrganismo na mesma reação de PCR (Kwon *et al.*, 2004). Assim, a distinção entre estas espécies foi feita a partir da técnica de PCR *multiplex*, usando iniciadores específicos para amplificação da região do gene *recA*, segundo metodologia descrita por Torriani *et al.* (2001).

Utilizando-se a análise de variância, seguida de comparação de médias da enumeração de BAL pelo teste t, a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002), os dados da enumeração de BAL apresentaram elevada variabilidade, não

seguindo uma distribuição normal. Assim, para uma comparação e análise mais eficientes dos parâmetros microbiológicos, precedeu-se à transformação dos dados, de forma a se obter uma distribuição normal, o que foi alcançado por meio da transformação logarítmica na base 10 (Log_{10}). A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS (Statistical..., 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens médias de BAL isoladas de queijo de minas artesanal em ágar MRS variaram entre $1,2 \times 10^7$ e $8,8 \times 10^7$ UFC/g, e em ágar M17 entre $6,5 \times 10^7$ e $3,5 \times 10^8$ UFC/g (Tab. 1). Estes resultados assemelham-se a outros de trabalhos que envolvem queijos artesanais (Guedes Neto, 2004; Borelli, 2006; Dolci *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009).

Tabela 1. Médias (x) e coeficientes de variação (CV) da contagem de bactérias acidoláticas, isoladas em ágar MRS e ágar M17, em 18 amostras de queijo de minas artesanal coletadas em propriedades rurais nas diferentes altitudes na região da Serra da Canastra, MG

Amostra	Altitude 1 (600-900m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000m) (n=6)		Altitude 3 (>1000m) (n=6)	
	x (UFC/g)	CV(%)	x (UFC/g)	CV(%)	x (UFC/g)	CV(%)
Ágar MRS	$8,8 \times 10^7$ ^a	102	$1,2 \times 10^7$ ^b	218	$1,3 \times 10^7$ ^{ab}	150
Ágar M17	$3,5 \times 10^8$ ^a	118	$6,5 \times 10^7$ ^b	103	$9,7 \times 10^7$ ^{ab}	102

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste t ($P < 0,05$)

A altitude foi relevante na contagem de BAL nas amostras de queijo de minas artesanal. A contagem na altitude de 600 a 900m foi mais alta que a registrada na altitude de 900 a 1000m ($P < 0,05$), e a contagem na altitude 3 foi intermediária entre as duas altitudes citadas ($P > 0,05$), para ambos os meios. Tavarria e Malcata (2000), ao avaliarem a microbiota do queijo artesanal português Serra da Estrela, verificaram que a localização geográfica da queijaria desempenhou importante papel na variabilidade microbiológica das amostras pesquisadas, e atribuíram o fato às práticas de higiene e produção do queijo seguidas pelos produtores.

Elevados valores de CV foram verificados para as contagens de BAL, independentemente do isolamento em ágar MRS e ágar M17 e da altitude da queijaria. Os maiores valores de CV para o isolamento em ágar MRS ocorreram em queijarias localizadas na altitude de 900 a 1000m. No ágar MRS crescem melhor

microrganismos do gênero *Lactobacillus*, os quais estariam mais associados ao sabor do queijo (Beresford *et al.*, 2001). Para o isolamento em ágar M17, queijarias localizadas entre 600 e 900m apresentaram maior CV, o que poderia determinar maior alteração na acidez dos queijos ali produzidos. O ágar M17 permite o isolamento de *Lactococcus* spp., principalmente o que compõe a microbiota acidificante dos queijos (Beresford *et al.*, 2001).

Foram submetidas à identificação em base molecular 158 amostras de microrganismos. Os microrganismos caracterizados como bastonetes Gram positivo, catalase negativo, com crescimento anaeróbio facultativo ou microaerófilo, seja em ágar MRS ou ágar M17, e que apresentaram três ou mais cópias da região intergênica 16S-23S, de três tamanhos (pares de bases) semelhantes, em seu DNA, podem pertencer aos gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* (Tannock *et al.*, 1999). Em ágar MRS, a presença de cocos anaeróbios facultativos ou

microaerófilos, Gram positivo, catalase negativo, que possuem, no mínimo, uma e duas cópias da região intergênica 16S-23S, de um e dois tamanhos semelhantes, em seu DNA, sugere o isolamento de espécies pertencentes aos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, respectivamente (Tannock et al., 1999). Em ágar M17, a presença de cocos aeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, Gram positivo, catalase negativo, que possuem uma e duas cópias da região intergênica 16S-23S, em seu DNA, sugere o isolamento de microrganismos pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*, respectivamente.

Nove microrganismos isolados dos queijos artesanais não puderam ser identificados pela técnica de restrição enzimática. Apesar de os resultados da reação de PCR-ARDRA 16S-23S rDNA e das análises de coloração morfológicas indicarem que estas amostras podem pertencer ao gênero *Lactobacillus*, elas foram consideradas bactérias acidoláticas, pois o perfil de restrição enzimática de produto de PCR-ARDRA 16S-23S delas não permitiu a identificação em base de espécie. A distribuição das espécies de BAL isoladas em meios MRS e M17 a partir das amostras coletadas nas propriedades rurais é apresentada na Tab. 2.

Tabela 2. Bactérias acidoláticas isoladas em meios MRS e M17 a partir de 18 amostras de queijo de minas artesanal coletadas em propriedades rurais em diferentes altitudes na região da Serra da Canastra, MG

Microrganismos	Altitude 1 (600-900m) (n=6)		Altitude 2 (900-1000m) (n=6)		Altitude 3 (>1000m) (n=6)		Total
	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17	
<i>Lactobacillus casei</i>	6	-	3	-	8	1	18
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5	-	9	1	3	2	20
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7	-	7	-	3	-	17
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1	-	2	-	1	-	4
<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Enterococcus</i> spp.	2	11	1	9	4	7	34
<i>Lactococcus</i> spp.	-	19	-	16	-	19	54
BAL	2	2	-	3	-	2	9
Total	23	32	22	29	21	31	158
	55		51		52		

Lactobacillus foi o gênero de BAL mais frequentemente isolado nos queijos estudados e *L. rhamnosus* foi o predominante dentro deste gênero, seguido por *L. casei*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* e *L. paraplantarum*. *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* também foram isolados por Borelli (2006) em amostras de queijo de minas artesanal provenientes de propriedades rurais da região da Serra da Canastra.

L. rhamnosus, *L. casei* e *L. plantarum* representam exemplos de microrganismos desejáveis à produção de queijos pelas características sensoriais e por serem microrganismos com importante papel probiótico (Holzapfel et al., 2001). Pelo menos uma destas espécies de BAL já foi isolada em outros trabalhos envolvendo queijos artesanais (Guedes

Neto, 2004; Bulut et al., 2005; Dolci et al., 2008) em diferentes países do mundo.

L. hilgardii já foi descrita como componente da microbiota de queijos artesanais italianos (Baruzzi et al., 2000) e turcos (Şengül, 2006). No Brasil, essa espécie foi encontrada como contaminante no processo fermentativo da produção artesanal de cachaça (Carvalho Netto et al., 2008). Não foi encontrado relato na literatura pesquisada a respeito da presença de *L. hilgardii* em queijos artesanais ou industriais brasileiros. A literatura consultada também não relatou trabalhos sobre a ocorrência de *L. paraplantarum* em queijos brasileiros. Este microrganismo já foi isolado em queijos artesanais italianos e gregos (Psoni et al., 2003) e italianos (Baruzzi et al., 2000).

Como no presente trabalho, *Weissella paramesenteroides* também foi isolada por Borelli (2006) em queijo de minas artesanal da região da Serra da Canastra. Trabalhos realizados na Espanha (Mas *et al.*, 2002) e na Grécia (Gerasi *et al.*, 2003) isolaram *W. paramesenteroides* em queijos artesanais. A ocorrência do gênero *Weissella* em queijos estaria envolvida em reações de proteólise, importantes para o desenvolvimento de sabor característico em queijos maturados (Guedes Neto, 2004).

Lactococcus spp. tem papel importante e desejável na produção de queijos, seja pela atividade proteolítica, ou pela produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos, que podem colaborar no aparecimento do sabor e aroma característicos do produto (Beresford *et al.*, 2001). Alguns autores já descreveram a presença de *Lactococcus* spp. em queijos artesanais (Cogan *et al.*, 1997; Guedes Neto, 2004; Bulut *et al.*, 2005; Dolci *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009)

A presença de *Enterococcus* spp. em alimentos pode estar associada a condições de higiene precárias, pois este microrganismo compõe a microbiota intestinal de alguns mamíferos e aves (Jay *et al.*, 2005). A ocorrência de *Enterococcus* spp. em alimentos é questionada pelo fato de esse microrganismo ser capaz de desencadear problemas como endocardite e infecções do trato urinário em humanos e transmitir genes associados à resistência aos antimicrobianos e a outros fatores de virulência, como gelatinase, substância de agregação e proteína de superfície (Jay *et al.*, 2005; Dolci *et al.*, 2008). Entretanto, a presença dessa bactéria em queijos está relacionada com intensa atividade lipolítica, produção de compostos aromáticos voláteis a partir do citrato, como diacetil, acetaldeído e acetofina, e produção de bacteriocinas que controlariam o desenvolvimento de patógenos (Bulut *et al.*, 2005). A presença de *Enterococcus* spp. em queijos artesanais já foi descrita por diversos autores, no Brasil (Guedes Neto, 2004; Borelli, 2006; Lima *et al.*, 2009) e em diferentes países do mundo (Cogan *et al.*, 1997; Bulut *et al.*, 2005; Dolci *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

A altitude foi relevante nas contagens médias de BAL nas amostras de queijo de minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra, MG. Sugere-se que as espécies pesquisadas estejam bem adaptadas ao ambiente de produção do queijo de minas artesanal produzido na região, contribuindo, talvez, para o desenvolvimento de características sensoriais do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUZZI, F.; MOREA, M.; MATARANTE, A. *et al.* Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, v.89, p.807-814, 2000.
- BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, v.11, p.259-274, 2001.
- BORELLI, B.M. *Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo de minas curado produzido na Serra da Canastra – MG.* 2006. 120f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BULUT, C.; GUNES, H.; OKUKLU, B. *et al.* Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *J. Dairy Res.*, v.72, p.19-24, 2005.
- CARVALHO NETTO, O.V.; ROSA, D.D.; CAMARGO, L.E.A. Identification of contaminant bacteria in cachaça yeast by 16S rDNA gene sequencing. *Sci. Agric.*, v.65, p.508-515, 2008.
- COGAN, T.M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E. *et al.* Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy Res.*, v.64, p.409-421, 1997.
- DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G. *et al.* Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, v.25, p.392-399, 2008.

- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, v.35, p.33-36, 1980.
- GERASI, E.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *Int. J. Dairy Technol.*, v.56, p.117-122, 2003.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, v.10, p.139-157, 1999.
- GUEDES NETO, L.G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp. e de bactérias acidoláticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, n. 73, suppl., p.365S-373S, 2001.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C. *IDF Standard, 117A*, 1988. 4p.
- JAY, J.M.; LOESSNER M.J.; GOLDEN, D.A. *Modern food microbiology*. 7. ed. New York: Springer, 2005. 790p.
- KWON, H.; YANG, E.; YEON, S. *et al.* Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.239, p.267-275, 2004.
- LEITE, M.O. *Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo de minas curado*. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.266-272, 2009.
- Mac FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1980. 527p.
- MAS, M.; TABLA, R.; MORICHE, J. *et al.* Ibores goat's milk cheese: microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait*, v.82, p.579-587, 2002.
- MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. *Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo de minas artesanal*. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em: 25 jan. 2010.
- MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F. *et al.* Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, v.5, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/15>>. Acessado em: 25 jan. 2010.
- PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of batzos, a traditional greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.*, v.20, p.575-582, 2003.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- ŞENGÜL, M. Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: microbiological quality, isolation and identification of its indigenous Lactobacilli. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.22, p.613-618, 2006.

Queijo de minas artesanal...

STATISTICAL analysis system: user's guide – SAS release 8.ed. Cary, NC: SAS Institute, 2000.

TANNOCK, G.W.; TISSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. *et al.* Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, p.4264-4267, 1999.

TAVARIA, F.K.; MALCATA, F.X., On the microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiol.*, v.17, p.293-304, 2000.

TISSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rDNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, v.35, p.49-56, 1997.

TORRIANI, S.; FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR Assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.3450-3454, 2001.