



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GISELLE MARIA PEREIRA DIAS**

**Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas  
de queijo de Coalho artesanal produzido no Município de  
Venturosa - Pernambuco**

**RECIFE**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**GISELLE MARIA PEREIRA DIAS**

**Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas  
de queijo de Coalho artesanal produzido no Município de  
Venturosa - Pernambuco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**  
**Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Taciana Holanda Cavalcanti**

**RECIFE**

**2014**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Dias, Giselle Maria Pereira

Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido no município de Venturosa - Pernambuco / Giselle Maria Pereira Dias. – Recife: O Autor, 2014.

100 folhas

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Maria Taciana Holanda Cavalcanti

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Bactérias 2. Queijo de Coalho I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Cavalcanti, Maria Taciana Holanda (coorient.) III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-102

**GISELLE MARIA PEREIRA DIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

**Orientador:**

---

**Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**  
**Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE**

**Titulares:**

---

**Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra**  
**Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE**

---

**Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco**  
**Departamento de Microbiologia - UFRPE**

---

**Profa. Dra. Carolina Albuquerque Lima**  
**Universidade de Pernambuco – UPE**

---

**Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques**  
**Pós-doutoranda da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE**

**Suplentes:**

---

**Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE**

---

**Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior**  
**Universidade Federal de Pernambuco – UFPE**

**RECIFE, 2014**

**A Deus,  
Aos meus pais,  
José Dias e Maria Miriam,**

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus razão da minha vida, por não ter me deixado desistir, por me ajudar a retorna ao que realmente amo e por todas às vezes que me fortaleceu na realização desse sonho.

À minha amada família, em especial meus pais, José Dias e Maria Miriam e meus irmãos, José Dias e Gleice, que foram instrumentos de Deus, em um momento que não acreditava mais em mim e estava abrindo mão desse sonho. Obrigada por Acreditar em mim, sempre.

Ao meu amado namorado, Augusto, pela paciência, amor, companheirismo e inúmeros conselhos.

As minhas orientadoras, Ana Porto e Taciana, por ter me recebido de braços abertos, pelo apoio, ensinamentos, motivação, inspiração, profissionalismo e amizade.

A professora Luciana Franco, pela amizade sincera, companheirismo, ensinamentos e oportunidade de docência.

A professora Raquel Pedrosa e Daniela Viana pela amizade, carisma e motivação.

Aos amigos do grupo de pesquisa Queijo de coalho, em especial, aos alunos de iniciação científica Nathália Granja, Adriano Silva, Rebeca, Eduardo e Talitha Nóbrega pela amizade, companheirismo e colaboração; Ao Frei Wellington pela amizade e benção concedida a mim no início dos meus experimentos; Aos amigos Pedro, Rosemary, Meire, Gabriela, Luiza e Diego Dias pelos laços de amizade feitos e experiências vividas.

Aos meus amigos de Laboratório Flávio, Virgínia Svedese, Cynthia, Gileno, Germana, Conceição, Márcia, Marcela, Milena, Thiago, José Noé, Nóe, Júlio, Pablo e Elaine, pela amizade e momentos de descontração.

Aos amigos de graduação Taline, Tatiana Bernardo, Danielle Oliveira, Armando, Lucilia e Tatiane Vitor muito obrigada pela amizade e carinho.

Aos amigos da Polícia Militar de Pernambuco, Cel. Ebenézer e Cap. Luna pelo apoio e ajuda; Ao Cb. Cabral, Cb. Santana, Cb. A. Carlos, Sd. Edilza e Sd. Carlúcia pela amizade sincera, companheirismo e motivação.

Ao meu amigo, o policial civil Assis (*in memorian*) e Renato (*in memorian*) pelas conversas, risadas, momentos de descontração, motivação e amizade.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a minha formação.

Meu sincero, obrigada!

"Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e  
Ele lhe mostrará o caminho certo"  
Provérbios 3; 6.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
<b>CAPITULO I</b>	4
<b>REVISÃO BIBIOGRÁFICA</b>	5
1. Queijo de Coalho	5
2. Bactérias ácido lácticas (BAL)	8
2.1 <i>Lactococcus</i>	11
2.2 <i>Leuconostoc</i>	12
2.3 <i>Streptococcus</i>	13
2.4 <i>Enterococcus</i>	14
2.5 <i>Lactobacillus</i>	15
3. Bacteriocinas	16
4. Referências bibliográficas	20
<b>CAPITULO II</b>	31
<b>BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCNONES PODEM ASSEGURAR A QUALIDADE SANITÁRIA E MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO DE COALHO?</b>	32
Resumo	32
1. Introdução	33
2. Materiais e métodos	34
2.1 Coletas das amostras de queijos	34
2.2 Avaliação da microbiota láctica	35
2.2.1 Preparação das amostras	35
2.2.2 Isolamento e contagem	35

2.2.3	Purificação e manutenção da microbiota lática	35
2.2.4	Caracterização da microbiota lática	36
2.2.5	Identificação das bactérias ácido lácticas (BAL)	36
2.3	Avaliação da atividade antagonista das BAL	37
3.	Resultados e discussão	38
3.1	Avaliação da microbiota lática quanto as temperaturas de isolamento	38
3.2	Caracterização das BAL	38
3.3	Identificação das BAL	40
3.4	Avaliação do potencial antagonico das BAL	43
4.	Conclusão	47
5.	Agradecimentos	48
6.	Referências Bibliográficas	48
	<b>CAPITULO III</b>	55
	<b>BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO QUEIJO DE COALHO: FONTE DE MICRO-ORGANISMOS PARA DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO LÁTICO</b>	56
		56
	Resumo	
1.	Introdução	57
2.	Materiais e métodos	59
2.1	Obtenção e manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas (BAL)	59
2.2	Potencial tecnológico de BAL	59
2.2.1	Avaliação da capacidade acidificante	59
2.2.2	Avaliação da atividade proteolítica	60
2.2.3	Avaliação da capacidade de produção de aroma	60
2.2.4	Tolerância ao NaCl	61
2.2.5	Avaliação da patogenicidade dos <i>Enterococcus</i>	61
2.3	Caracterização físico-química do queijo de Coalho	62
2.4	Análises estatísticas	62
3.	Resultados e discussão	62
3.1	Avaliação da capacidade acidificante	62

3.2 Avaliação da atividade proteolítica	67
3.3 Avaliação da capacidade de produção de diacetil	69
3.4 Tolerância ao sal	71
3.5 Avaliação da patogenicidade dos <i>Enterococcus</i>	72
3.6 Caracterização físico-química do queijo de Coalho	72
4. Conclusão	74
5. Agradecimentos	74
6. Referências Bibliográficas	74
<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	81
<b>ANEXOS</b>	82

## LISTA DE TABELAS

### CAPITULO II

<b>Tabela 01</b>	Classificação dos isolados de amostras de queijo de Coalho artesanal quanto à capacidade de coagulação do Leite Desnatado Reconstituído a 12% (p/v) por um período de até sete dias.	40
<b>Tabela 02</b>	Identificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas, com morfologia de cocos, isoladas de amostras de queijo Coalho artesanal produzidas no Município de Venturosa – Pernambuco.	40
<b>Tabela 03</b>	Avaliação do potencial antagônico de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 e média da variação do diâmetro dos halos em milímetros.	43

### CAPITULO III

<b>Tabela 01</b>	Valores médios de pH dos diferentes gêneros de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho artesanal crescidas em leite Desnatado Reconstituído a 10% após 6h e 24 h de incubação.	62
<b>Tabela 02</b>	Capacidade acidificante em Graus Dornic (°D) dos diferentes gêneros de bactérias ácido lácticas, isoladas do queijo de Coalho artesanal em leite Desnatado Reconstituído a 10% após 6h e 24 h de incubação.	65
<b>Tabela 03</b>	Atividade proteolítica qualitativa, em Ágar leite desnatado de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa – PE.	67
<b>Tabela 04</b>	Produção de aroma pelas Bactérias Ácido Lácticas isoladas do queijo de Coalho produzidos no Município Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil.	70

## LISTA DE SIGLAS

ATCC	American Type Cultural Collection
ADAGRO	Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco
a.C	Antes de Cristo
BAL	Bactérias Ácido Láctica
BHI	Brain infusion Heart
LDR	Leite Desnatado Reconstituído
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS	Meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe
NaCl	Cloreto de Sódio
PDO	Protected Designation of Origin
QC	Queijo de Coalho
TSB	Tryptic Soy Both
UFC	Unidade Formadora de Colônia
SSPRA	Secretário de Produção Rural e Reforma Agrária
Sindileite	Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do Estado de Pernambuco
°D	Graus Dornic

## RESUMO

O queijo de Coalho é um produto típico da Região Nordeste do Brasil. Em Pernambuco é produzido a partir de leite de vaca cru e representa a principal fonte de renda da Região Agreste do Estado. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial antimicrobiano e tecnológico de BAL isoladas de queijos de Coalho produzido artesanalmente no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil, e determinar as características físico-químicas desses queijos. A microbiota láctica foi avaliada através da contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), isolamento em meio Ágar APT nas temperaturas de 30 e 37°C e identificação bioquímica. A avaliação do potencial antagonístico foi realizada pela técnica de difusão em disco frente à *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, enquanto que o potencial tecnológico das BAL foi avaliados através de sua capacidade de acidificar o Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 10% (p/v) após 6 e 24h de incubação, produzir enzimas extracelulares com atividade proteolítica, produzir aroma a partir do metabolismo do citrato e crescer em presença de 3 e 4% (p/v) NaCl. De um total de 349 isolados, 210 (60,17%) foram confirmados como BAL, dentre estas, 76 amostras, todas com morfologia de coco e capazes de coagular o LDR a 12% (p/v) em até 18h de incubação, foram selecionadas para a etapa de identificação bioquímica e para os testes de atividade antagonística e do potencial tecnológico. Dentre as BAL selecionadas foram encontrados os gêneros *Enterococcus* (37,18%), *Lactococcus* (19,23%), *Streptococcus* (25,64%) e *Leuconostoc* (15,38%). A grande maioria das BAL testadas quanto à atividade antimicrobiana foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (82,89%) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (88,15%). O acompanhamento da evolução da acidificação pelas BAL, através do pH e acidez titulável, indicou a presença de micro-organismos com diferentes capacidades de acidificação que foram classificados como culturas iniciadoras ou acidificantes rápidas e culturas adjuntas ou acidificantes lentas. A maioria das BAL analisadas foi capaz de produzir enzimas proteolíticas extracelulares (82,89%) e aroma (65,79%) na intensidade forte, moderada, fraca, assim como crescer na presença de altas concentrações de cloreto de sódio. Os resultados físico-químicos caracterizaram o queijo de Coalho como de alta umidade (50,6%), gordo (53,6%) e teor de cloreto de 0,92%. Esses resultados confirmam que as BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa podem promover a coagulação do leite e criam um ambiente desfavorável para micro-organismos contaminantes, atuar no desenvolvimento das características organolépticas (sabor e aroma) e assegurar a qualidade sanitária e microbiológica desse queijo. O conhecimento da biodiversidade de BAL autóctones do queijo de Coalho de Venturosa e de suas propriedades tecnológicas permitiu avaliar como esses diferentes micro-organismos contribuem nas características organolépticas desse queijo e selecionar BAL com potencial promissor para a elaboração de fermentos lácticos destinados a elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

**Palavras-chave:** queijo de Coalho, bactérias ácido lácticas, potencial tecnológico.

## ABSTRACT

The cheese curd is a typical product of the Northeast Region of Brazil. Pernambuco is produced from raw cow's milk and is the main source of income of the Wasteland region of the state. The present work aimed to study the antimicrobial and technological potential of BAL isolated from Coalho cheeses produced by hand from in the Municipality of Venturosa, Wasteland Region of the State of Pernambuco, Brazil, and determine the physico-chemical characteristics of these cheeses. Lactic microbiota was evaluated by presumptive count of Colony Forming Units (CFU), Isolation in APT agar at temperatures of 30 and 37 ° C and biochemical identification. The evaluation of the antagonistic potential was performed by disk diffusion front of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, while the technological potential of BAL was assessed by their ability to acidify the Reconstituted Skim Milk (LDR) to 12% (w/v) after 6 and 24 hours of incubation, produce extracellular enzymes with proteolytic activity, producing flavor from citrate metabolism and grow in the presence of 3 to 4% (w/v) NaCl. From a total of 349 isolates, 210 (60.17%) were confirmed as BAL, among these 76 samples, each with morphology and color able to coagulate the LDR 12% (w/v) within 18h of incubation were selected for biochemical identification step and the testing of antagonistic activity and technological potential. Among the selected BAL *Enterococcus* (37.18%), *Lactococcus* (19.23%), *Streptococcus* (25.64%) and *Leuconostoc* (15.38%) genera were found. The vast majority of BAL tested for antimicrobial activity was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (82.89%) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (88.15%). Monitoring the evolution of acidification by BAL, based on pH and titratable acidity, indicated the presence of microorganisms with different acidification capabilities which were classified as fast or acidifying starter cultures and adjunct cultures or acidifying slow. Most BAL analyzed were capable of producing extracellular proteolytic enzymes (82.89%) and flavoring (65.79%) in the intense, moderate, weak, and grow in the presence of high concentrations of sodium chloride. The physicochemical results characterized the cheese curd as high humidity (50.6%), fat (53.6%) and content of 0.92% chloride. These results confirm that the isolated BAL Coalho cheese of the Venturosa may promote coagulation of milk and create an unfavorable environment for contaminating microorganisms, operating in the development of organoleptic properties (taste and aroma) and ensure health and microbiological quality of that cheese. The knowledge of the biodiversity of native BAL Coalho cheese Venturosa and technological properties allowed us to assess how these different microorganisms contribute in the organoleptic characteristics of cheese and select BAL with promising potential for the development of lactic ferments for the preparation of cheese curd from pasteurized milk.

**Keywords:** Coalho cheese, acid lactic bacteria, technological potential.

## INTRODUÇÃO

Na Região Nordeste do Brasil, o queijo de Coalho é um dos produtos alimentícios mais tradicionais, produzido há mais de 150 anos a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado (CAVALCANTE et al., 2007). Trata-se de produto popular incorporado à cultura de nossa região, e embora a tecnologia de produção seja simples, é comum o emprego de leite cru em seu processo de elaboração (ESCOBAR, 2001; FERREIRA & FILHO, 2008).

Na Região Nordeste do Brasil a produção de queijos de Coalho, concentra-se nos Estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (ARAÚJO et al., 2012; FERREIRA & FILHO, 2008; PERRY, 2004; ALMEIDA et al., 2010). Nesses Estados, a produção de queijos representa atividade bastante significativa para a economia regional (ALMEIDA et al., 2010).

Dentre os Estados Nordestino, Pernambuco é o que detém a maior rede de fábricas de queijo de Coalho do Nordeste, embora muitos sejam de origem artesanal cuja fabricação ocorre em pequenas queijarias urbanas ou rurais localizadas em pequenos municípios localizados na Região Agreste do Estado onde esta situada segundo dados do IBGE (2013) a segunda maior bacia leiteira do Nordeste (ESCOBAR, 2001).

Nesses pequenos municípios, localizados na Região Agreste do Estado de Pernambuco, a produção de queijos de Coalho adquiriu importância fundamental por constituir a principal fonte de renda da propriedade familiar (SILVA et al., 2012; NASSU et al., 2003; ESCOBAR, 2001).

As características inigualáveis de cada queijo artesanal dependem da tecnologia empregada na sua produção, da composição físico-química e da microbiota láctica endógena do leite utilizado como matéria prima (IRLINGER e MOUNIER, 2009). Queijos produzidos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado devido à biodiversidade das bactérias ácido lácticas (BAL) endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009). Assim, a biodiversidade de BAL autóctones ou não iniciadoras é considerada fator principal dessa grande diferença sensorial (GARABAL et al., 2008).

As BAL compreendem um grupo bastante diverso de micro-organismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico (AXELSSON, 2004) e devido a suas

propriedades tecnológicas, são empregadas na tecnologia de alimentos por contribuir no aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica em alimentos fermentados (SETTANNI & CORSETTI, 2008).

Essas bactérias participam das características organolépticas de queijos, através da proteólise de proteínas do leite, parâmetro especialmente importante para a ecologia microbiana, e importante na textura e aroma do produto final (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010), assim como seu crescimento na matriz queijo determina a inibição de micro-organismos indesejáveis, seja pela competição por nutrientes ou pela produção de substâncias antimicrobianas de origem protéica denominadas bacteriocinas (AYAD et al., 2004; OUWEHAND & VESTERLUND, 2004; DEEGAN et al., 2006).

Bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos termoestáveis, sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular com efeito bactericida ou bacteriostática sobre outros micro-organismos (ACUÑA et al., 2012; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

A produção de queijos de alta qualidade requer atenção especial para a caracterização, diferenciação e manutenção das cepas de BAL envolvidas no processo (GIRAFFA et al., 2003a). O conhecimento da biodiversidade de BAL autóctones de queijo de Coalho artesanal e de suas propriedades tecnológicas é importante para avaliar como esses diferentes micro-organismos contribuem nas características organolépticas desses queijos, assim como preservar as características originais do produto e permitir a seleção de BAL autóctones com potencial antimicrobiano e que possam ser promissoras na elaboração de um fermento láctico (BERESFORD et al., 2001; CARIDI et al., 2003).

O desenvolvimento de um fermento láctico definido, elaborado a partir de BAL isoladas do próprio queijo se faz necessário para a obtenção de um produto seguro e de boa qualidade, sem promover mudanças fundamentais nas características do mesmo (CARVALHO, 2007).

Desta forma, visando à preservação das características sensoriais do produto regional e a valorização das culturas lácticas autóctones do queijo artesanal, este presente trabalho tem como objetivo estudar o potencial tecnológico de BAL isoladas de queijos de Coalho produzido artesanalmente a partir de leite cru no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco - Brasil.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo Geral***

Estudar o potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no município de Venturosa - Pernambuco.

### ***Objetivos Específicos***

Caracterizar o queijo de calho artesanal através de análises físico-químicas de umidade, cloretos e teor de matéria gorda no extrato seco;

Isolar bactérias ácido lácticas (BAL) presentes em amostras de queijo de Coalho artesanal produzidos no Município de Venturosa - Pernambuco;

Identificar, através de métodos clássicos, as bactérias ácido lácticas isoladas a partir do queijo de Coalho artesanal;

Avaliar a atividade antagônica dos isolados frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922;

Determinar as propriedades tecnológicas das BAL quanto à capacidade de acidificação, atividade proteolítica, produção de aroma e tolerância ao NaCl.

# CAPÍTULO I

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Queijo de Coalho

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial da sua fabricação. Há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C. Murais em tumbas egípcias mostram cenas de fabricação de queijo no Antigo Egito e a Bíblia cita este produto em mais de uma passagem do Velho Testamento. No ano de 1050 a.C. o rei Davi já se referia a sua fabricação (PERRY, 2004; SOUZA, 1960).

Durante o Império Romano foi que a produção de queijos aperfeiçoou-se alcançando um alto padrão. A produção em massa de queijos iniciou-se no século XIX, mas foi somente no início do século XX que foi aberta a primeira grande queijaria na França (PERRY, 2004). Já no Brasil, a primeira indústria de queijos foi construída em Minas Gerais, na Serra da Mantiqueira em 1888 (NOVAIS, 1988). O Estado de Minas Gerais produz 215 t/ano de queijos e responde pela metade do consumo Nacional (PERRY, 2004).

O Brasil é atualmente o sexto maior produtor de queijos do mundo e essa produção cresce a cada ano impulsionada pelo aumento de vendas (CHALITA et al., 2009). Segundo dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), em 2011, foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país, 9,4% mais que em 2010 estimando-se ultrapassar mais 1 milhão de toneladas em 2013.

Na Região Nordeste do Brasil, o queijo de Coalho é um dos produtos alimentícios mais tradicionais sendo produzido há mais de 150 anos, a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado (CAVALCANTE, 2007). Devido à simplicidade de sua tecnologia, queijo de Coalho, é amplamente fabricado e consumido em vários Estados da Região Nordeste do Brasil, cuja maior parte da produção concentra-se nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (ARAÚJO et al., 2012; FERREIRA & FILHO, 2008).

O nome Coalho advém do uso de coalho natural na sua fabricação. No Nordeste do Brasil, o queijo de Coalho está entre os principais tipos de queijos artesanais comprovadamente incorporados à cultura regional, mas que já vem ganhando espaço na

Região Sudeste. A maior parte da fabricação é artesanal e o queijo é feito a partir do leite cru (SEBRAE, 2008).

O queijo de Coalho por ser um produto bastante consumido pela população, em todas as faixas de renda, representa uma atividade bastante significativa para a economia regional o que torna essa atividade importante tanto no âmbito social quanto econômico, além de ser em determinadas localidades a principal fonte de renda e sobrevivência da população (PERRY, 2004; ALMEIDA et al., 2010). Neste contexto, a produção artesanal de queijo de Coalho é bastante expressiva na economia regional de vários estados nordestinos (ESCOBAR, 2001).

Dentre os Estados Nordestinos, Pernambuco é o que detém a maior rede de fábricas de queijo de Coalho do Nordeste, muitas de origem artesanal, cuja fabricação ocorre em pequenas queijarias urbanas ou rurais localizadas em municípios na Região Agreste, onde está situada a bacia leiteira (ESCOBAR, 2001).

Em função de seu grande consumo, em vários Estados do Nordeste já existe uma legislação específica para a produção do queijo de Coalho. Nacionalmente, já está estabelecida sua identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão ser cumpridos, por meio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (BRASIL, 2001).

De acordo com esse Regulamento o queijo de Coalho pode ser definido como o produto como o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação.

O Queijo de Coalho ainda pode ser definido como produto obtido por coagulação enzimática, cuja coalhada pode ou não sofrer aquecimento, podendo ser prensado manualmente ou em pequenas prensas e salgado a seco, diretamente na massa ou na superfície (MANGUEIRA, 2001).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, o queijo de Coalho é classificado como queijo de médio (36,0-45,9%) e alto teor de umidade (46,0-54,9%), de massa semi-cozida ou cozida, semi gordo (25,0-44,9%) ou gordo (45,0-59,9%), apresentando um teor de gordura nos sólidos totais entre 35 e 60%. Quanto aos critérios microbiológicos o queijo de Coalho deverá obedecer as normas estabelecidas para queijo de médio a alto teor de umidade do Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos

Microbiológicos de Queijos, segundo a Portaria nº 146/96 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996).

O queijo de Coalho, quanto aos aspectos sensoriais, apresenta consistência semidura e elástica com textura compacta e macia podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

O queijo de Coalho produzido em estabelecimentos artesanais em Pernambuco pode ser definido pela Resolução SPRRA (Secretário de Produção Rural e Reforma Agrária) N° 002 de 19 de abril de 1999, sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária deste estado, em dois tipos: Tipo A: queijo produzido com leite pasteurizado, massa crua prensada, dessorada, salgada e maturada; Tipo B: queijo produzido com leite cru integral ou desnatado, massa crua prensada ou não, dessorada, salgada e maturada. A resolução prever como aspectos físico-químicos do queijo de Coalho de Pernambuco, teor de umidade entre 46,0-54,9%, matéria gorda no extrato seco de 24-44,9% e teor de cloretos de até 3% (Pernambuco, 1999).

Em Pernambuco, o queijo de Coalho adquire importância fundamental na economia de pequenos municípios situados na bacia leiteira do Estado, por ser a principal fonte de renda da propriedade familiar e dos fornecedores de leite, especialmente aqueles que não têm acesso a plantas de processamento de leite (SILVA et al., 2012; NASSU et al., 2003).

A seca que atinge atualmente Pernambuco está afetando economia da Região Agreste do Estado, a produção de leite devido a morte do rebanho com a falta de chuvas, a renda da família que utiliza o leite para a fabricação e venda de queijo e nós, os consumidores, que nos deparamos com os altos preços que esse produto chega às prateleiras. Antes da estiagem, o Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produto Derivados do Estado de Pernambuco (Sindileite) contabilizava a produção de 2,3 milhões de litros por dia e, atualmente apenas 830 mil litros são produzidos diariamente. Segundo a Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO) a seca provocou uma redução de quase 70% na produção da bacia leiteira, formada por 14 municípios. O Sindileite aponta a morte de mais de 200 mil animais e o abate precoce de outros 528 mil, com prejuízo mensal estimado em R\$ 36 milhões (<http://www.noticiasagricolas.com.br>).

Embora, em Pernambuco a lei nº 15.192 de 13 de dezembro de 2013 permita a produção de queijo de Coalho a partir de leite cru, a legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996) ou que quando produzidos com leite cru seja maturado por um período de 17 a 22 dias, segundo a Instrução Normativa de 6 de agosto de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Como o queijo de Pernambuco não é maturado e é produzido a partir de leite cru e comercializado em um prazo de até 10 dias, ele pode se tornar um excelente meio de crescimento para os micro-organismos. Além disso, poder vir a ser veículos de patógenos, quando não há os cuidados higiênicos sanitários devidos com sua produção, transporte e comercialização, que acaba por ter consequência direta na restrição da comercialização desse produto ao Estado de Pernambuco (BRASIL, 2001; BRASIL, 1996; SALVADOR et al., 2001; FRANCO et al., 2004).

Por outro lado, a pasteurização, além de destruir os micro-organismos indesejáveis, também promove a destruição da microbiota láctica natural do leite, a qual é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (BERESFORD et al., 2001).

Queijos de Coalho produzidos a partir de leite cru apresentam sabores mais intensos que os produzidos com de leite pasteurizado, devido à presença de micro-organismo próprios do leite com características autóctones da região onde ele é produzido, denominadas bactérias ácido lácticas (BAL) endógenas do leite (FRANCIOSI et al., 2009; HOORDE et al., 2010).

## **2. Bactérias Ácido Lácticas**

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo bastante diverso de micro-organismos cuja principal característica é a produção de ácido láctico (AXELSSON, 2004). São amplamente distribuídas na natureza e predominam na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas, como leite, queijo, carne, frutas e vegetais, podendo ainda ser isolados de solos, água, plantas, silagens, esterco, esgoto, sendo também encontradas nos tratos intestinal, respiratório superior e urogenital inferior de animais assim como na pele e mucosa de animais e humanos (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; BRUNO & CARVALHO, 2009; SETTANNI & MOSCHETTI, 2010; NETO et al., 2005).

Apresentam morfotipos bacilares ou em cocos com células simples, duplas ou tétrades podendo ainda formar pequenas ou grandes cadeias. São usualmente conhecidas pela falta de motibilidade, com exceção do *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus ghanensis* e *Lactobacillus capillatus* (NIELSEN et al., 2007; CHAO et al., 2008).

As BAL são caracterizadas como micro-organismos Gram-positivos, não formadores de esporos, oxidase e catalase negativa e com baixo teor de G + C no seu DNA. (BOTINA, TSYGANKOV & SUKHODOLETS, 2006; KLANDLER & WEISS, 1986). A maioria dessas bactérias é inativada a temperaturas superiores a 70°C (NETO et al., 2005). Quanto à capacidade de assimilar oxigênio, formam um grupo bastante heterogêneo podendo ser anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias e microaerófilas (BROADBENT & STEELE, 2005; MATA et al., 2008).

Segundo Lehninger, Nelson & Cox. (2011), as BAL são as únicas desprovidas de catalase que conseguem crescer em condições aeróbias. Catalase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A incapacidade das BAL em degradar este composto, deve-se a fato de não sintetizarem grupos porfirínico, como exemplo o heme. Apesar de serem incapazes de sintetizar ATP por meios respiratórios, as BAL não têm seu crescimento afetado pela presença ou ausência de ar (AXELSSON et al., 2004).

As BAL são estritamente fermentadoras e desprovidas de citocromos, obtendo energia através da fermentação, mas precisamente por fosforilação ao nível de substrato. Através da fermentação de hidratos de carbono, produzem ácido lático como principal ou único produto do seu metabolismo fermentativo da glicose (MAYO et al., 2010; BROADBENT & STEELE, 2005; AXELSSON, 2004).

De acordo com os produtos da fermentação, as BAL empregam duas vias fermentativas: Via homofermentativa ou via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que convertem glucose quase quantitativamente a ácido lático (produto primário); Via heterofermentativas ou via hexose-monofosfato em que são produzidos além do ácido lático, dióxido de carbono, ácido acético e etanol (KLEEREBEZEM & HUGENHOLTZ, 2003; CARR, CHILL & MAIDA, 2002).

Correspondem a um grupo de micro-organismos fastidiosos que requerem uma elevada exigência nutricional, composta essencialmente por aminoácidos e vitaminas, dentre elas as do complexo B (FRANÇOISE, 2010). Como resultado dessa capacidade biossintética limitada, as BAL são normalmente cultivadas em meios contendo peptona e

extrato de levedura que devem ser suplementado com um carboidrato fermentável para prover uma fonte de energia (KLAENHAMMER et al., 2005; LIMA, AQUARONE & BORZAN, 1975).

Em habitats ricos em nutrientes, como leite, vegetais, carnes e seus derivados, as BAL muitas vezes contribuem no aroma, na textura, no valor nutricional e na vida de prateleira mais prolongada dos produtos fermentados (LEROY & DE VUYST, 2004). Devido a sua vasta utilização em produtos fermentados tradicionais, as BAL possuem o estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) concedido pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (AMMOR, FLÓREZ & MAYO, 2007).

Por fazer parte da matéria-prima do leite, as BAL também fazem parte da microbiota do queijo e podem desempenhar papéis diferentes na fabricação destes. Algumas espécies participam no processo de fermentação, enquanto outros são envolvidos na maturação do queijo. No primeiro caso, BAL rapidamente fermentam a lactose produzindo ácido láctico e são designados como BAL iniciadoras ou *starters*, enquanto que as não iniciadoras, adjuntas ou secundárias são responsáveis pelo processo de maturação e estão envolvidos na definição das características sensoriais do queijo (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010; BERESFORD et al., 2001).

O desenvolvimento de BAL iniciadoras ou não em queijo fabricados com leite cru segue uma dinâmica geral. As BAL iniciadoras são encontradas em grande número (aproximadamente  $10^8$  e  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>) no início da maturação e diminuem regularmente por dois ou mais ciclos logarítmicos durante o envelhecimento. Pelo contrário, BAL não iniciadoras ou adjuntas estão presentes em baixas concentrações após a prensagem e podem aumentar cerca de quatro a cinco ciclos logarítmicos em poucos meses (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010).

A produção de queijos de alta qualidade requer atenção especial para a caracterização, diferenciação e manutenção das cepas de BAL envolvidas no processo (GIRAFFA et al., 2003a). Os critérios utilizados na classificação taxonômica das BAL são de origem fenotípica: morfológicos (forma da célula e tamanho da colônia), bioquímicos (fermentação da glicose e configuração espacial (D/L) do ácido láctico produzido) e fisiológicos (crescimentos em diferentes temperaturas, em altas concentrações de sal e tolerância ao pH ácido e alcalino). Embora esses critérios ainda sejam utilizados, a taxonomia atual das BAL tem por base extensos trabalhos de determinação de sequências

de RNA e DNA ribossômico, particularmente o rRNA 16S (AXELSSON, 2004; MAKAROVA & KOONIN, 2007; SCHROETER & KLAENHAMMER, 2009).

O isolamento de BAL nativas do queijo é importante para o conhecimento de biodiversidade desses micro-organismos, para avaliar como as diferentes espécies de BAL contribuem na maturação de queijos, além de manter as características típicas de sabor e aroma do produto. Estas informações podem permitir a seleção das linhagens autóctones próprias do leite cru que ao serem introduzidas como culturas iniciadoras em queijos produzidos com leite pasteurizado, reproduzam as características típicas de um queijo fabricado com leite cru (DEMARIGNY et al., 1997; ERCOLINI et al., 2001; MARINO, MAIFRENI & RONDININI, 2003).

O isolamento de BAL autóctones do queijo de Coalho de Pernambuco e sua possível utilização como fermentos lácteos para a aplicação nas indústrias de queijos pode contribuir para a caracterização da identidade e qualidade desse produto. Sabe-se que vários queijos artesanais têm sido premiados com o selo PDO (*Protected Designation of Origin*) e são considerados como marcadores culturais da sociedade, como produtos de arte, de acordo com o Regulamento 510/06 da União Europeia (FONTAN et al., 2001; RANDAZZO, CAGGIA & NEVIANE, 2009; RENNA et al., 2009). A denominação de queijo PDO assume que existe esta relação entre a área de origem, as técnicas tradicionais de processamento e os micro-organismos nativos presentes nas características específicas do produto final (RANDAZZO, CAGGIA & NEVIANE, 2009).

As BAL são representadas por um grupo de 12 gêneros que compreendem os *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (MOGENSEN, SALMINEN & O'BRIEN, 2003). Dentre esses, os gêneros mais comumente encontrados em queijos são: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (BERESFORD et al., 2001; FOX et al., 2000).

## **2.1 *Lactococcus***

O gênero *Lactococcus* é um grupo pequeno de micro-organismos em forma de cocos, Gram-positivo, catalase negativo e não esporulantes (CASSALTA & MONTEL, 2008), predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa. Sua

presença é reduzida durante o processo de cura, desaparecendo entre seis e oito semanas de maturação (FONTÁN et al., 2001 e LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000).

São as bactérias mesofílicas mais usadas nas fermentações lácteas devido à capacidade de converter rapidamente a lactose em ácido láctico (GAYAN et al., 1999). São homofermentativas com produção exclusiva de ácido láctico L(+) a partir da glicose (TEUBER, 1995). Podem crescer a 10°C, mas não a 4 e 45°C e apresentam pH ótimo de crescimento em torno de 6,0–6,5 (HARRIGAN, 1998; WHITMAN, 2009).

Atualmente o gênero *Lactococcus* apresenta 7 espécies e 4 subespécies, sendo *Lc. raffinolactis*, *Lc. chungangensis*, *Lc. fujiensis*, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremonis*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *tructae* (EUBÉZY, 2012c). A subespécie *Lactis* apresenta uma variante *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* que é capaz de converter citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (HASSAN & FRANK, 2001).

Dentre as espécies citadas, cinco que compreendem os *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* e *Lc. piscium* são aplicadas na indústria de laticínios como culturas de arranque ou iniciadoras (TEUBER & GEIS, 2006). Embora essas cinco espécies sejam utilizadas na indústria, o *Lactococcus lactis* é a que possui maior significância na fermentação dos produtos lácteos (WOUTERS et al., 2002).

O *Lc. lactis* apresentam vasta aplicação industrial em produtos lácteos, tais como queijo, manteiga e leites fermentados (WOUTERS et al., 2002) e é composto por duas subespécies a *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. A subespécie *lactis* é usada preferencialmente na fabricação de queijo de pasta e mole e a subespécie *cremoris* em queijos de pasta dura (BOLOTIN et al., 2001). Ambas as subespécies, contribuem para o desenvolvimento da textura, pela produção de exopolissacarídeo, e para o sabor pela produção de compostos aromáticos como alcoóis, cetonas e aldeídos. Também pode ser usada para a conservação de alimentos, devido a produção de ácidos orgânicos (CASSALTA & MONTEL, 2008).

Os *Lactococcus* podem ser empregados como probióticos sendo considerado micro-organismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (CASSALTA & MONTEL, 2008).

## **2.2 *Leuconostoc***

O gênero *Leuconostoc* é um grupo de micro-organismos em forma de cocos ou cocobacilos, dispostos em pares ou cadeias, Gram-positivo, catalase negativo, não esporulante e anaeróbio facultativo (OGIER et al., 2008).

Apresentam como habitat natural plantas frescas a partir das quais se disseminam para vários nichos, incluindo leite e produtos alimentares refrigerados (OGIER et al., 2008). Caracterizam-se por apresentar crescimento lento, propriedade acidificante fraca e temperatura ótima de crescimento na faixa de 20-30°C (FOX et al., 2000; DELLAGLIO, DICKS & TORRIANI, 1995).

Esse grupo de micro-organismos é facilmente distinguido de outras BAL devido ao seu metabolismo heterofermentativo (FOX et al., 2000). Atualmente o gênero *Leuconostoc* apresenta 23 espécies e 3 subespécies (EUZÉBY, 2012d). As espécies *L. mesenteroides* e *L. lactis* desempenham papel importante na formação do aroma, sabor e textura de produtos lácteos por produzir compostos aromáticos como diacetil e cetonas (OGIER et al., 2008). Enquanto que as subespécies *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* e a *L. mesenteroides* subsp. *lactis* são frequentemente associadas aos produtos lácteos (FOX et al., 2000).

Devido à capacidade de produzir compostos aromáticos são utilizadas como micro-organismos aromatizantes em produtos lácteos, junto às bactérias do gênero *Lactococcus* (HASSAN & FRANK, 2001). A produção de diacetil, CO<sub>2</sub> e acetoína a partir do citrato é responsável pela qualidade organoléptica, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (DELLAGLIO, DICKS & TORRIANI, 1995).

Os *Leuconostoc* também apresentam status GRAS e podem ser empregadas como probióticos (OGIER et al., 2008).

### **2.3 *Streptococcus***

O *Streptococcus thermophilus* compreende um grupo de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, anaeróbicos facultativos, homofermentativa com produção de L(+) lactato, acetaldeído e diacetil a partir da lactose do leite (ROBINSON, 2002).

*Streptococcus thermophilus* é a única espécie do gênero utilizada nas fermentações lácteas sendo amplamente utilizada como cultura iniciadora para a produção de iogurtes, queijos e leites fermentados (ROBINSON, 2002; HASSAN e FRANK, 2001).

Na fermentação láctea o papel do *S. thermophilus* está relacionado a sua rápida conversão de lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008).

Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE & WHILEY, 1995). Contudo, são capazes de fermentar um pequeno número de carboidratos e suporta concentração máxima de NaCl de até 2,5% (HASSAN & FRANK, 2001; FOX et al., 2000).

A maior parte dos produtos lácteos submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação é acidificada pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus spp* (CARVALHO, 2007).

Em ensaios *in vitro* apresentou propriedade anti-inflamatória, sendo ferramenta eficaz como probiótico (LAMMERS et al., 2003).

## **2.4 Enterococcus**

Bactérias desse gênero são em forma de coco individuais, aos pares ou em cadeias curtas, não esporuladas, catalase negativa, anaeróbico facultativo e homofermentativa, cujo principal produto da fermentação é o ácido láctico L(+) (DEVRIESE & POT, 1995).

A comum ocorrência desses micro-organismos no trato gastrointestinal de animais, aliado a capacidade de sobreviver a condições adversas, como pH entre 4,5- 10, temperaturas entre 5-65°C e salinidade extrema fazem desses, micro-organismos indicadores de contaminação (FISHER & PHILIPS, 2009; CARIDI et al., 2003; GIRAFFA, 2003b; GIRAFFA, 2002). Contudo, sabe-se que sua utilização como indicador de contaminação fecal é limitada em função da inespecificidade do hospedeiro, uma vez que são frequentemente isolados de água, plantas e alimentos, compondo a microbiota de diversos produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2002).

A presença desses micro-organismos na microbiota natural de queijos artesanais é de extrema importância devido ao desenvolvimento de características sensoriais dos queijos, pela produção de compostos aromáticos e enzimas que contribuem na textura, sabor, aroma dos queijos, e pela produção além de bacteriocinas, substâncias antimicrobianas com espectro de inibição a patógenos como *Listeria spp.* e *Clostridium spp*

(GIRAFFA, 1997). Contudo, a alta incidência desse gênero em queijos industrializados produzidos a partir do leite pasteurizado, geralmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a sua elaboração (GIRAFFA, 2003b).

O *Advisory Committee on Novel Foods and Processors* (ACNFP) permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento lácteo em produtos fermentados. No entanto, a resistência de espécies do gênero a antibióticos e evidências e relatos de sua ocorrência em infecções humanas tem gerado controvérsias sobre seu uso na tecnologia alimentar (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006; FRANZ et al., 2003).

## 2.5 *Lactobacillus*

No gênero *Lactobacillus* incluem-se as bactérias em forma de bacilos, com um teor de G+C no DNA inferior a 50%, estritamente fermentativas e mais tolerantes ao meio ácido (HAMMES & VOGEL, 1995). Algumas espécies formam pequenos cocobacilos, que lembram *Leuconostoc* (SILVA et al., 2007). No leite, iniciam o crescimento, preferencialmente, em pH próximo de 5,5 – 6,2 reduzindo-o para valores abaixo de 4,0 (HASSAN & FRANK, 2001).

Do ponto de vista metabólico, os *Lactobacillus* podem ser divididos em três subgrupos denominados *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* (JAY, 1994; VANDAME et al., 1996). No primeiro grupo estão os lactobacilos termofílicos homofermentativos obrigatórios, no segundo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos e no terceiro grupo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos obrigatórios.

O grupo dos lactobacilos homofermentativos obrigatórios é representado pelas espécies *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. salivarius*, enquanto que o segundo grupo é representado pelas espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* que geralmente são encontrados em fermentos lácticos artesanais (CROW, CURRY & HAYES, 2001; FOX et al., 2000) e estão associados à fermentação secundária (BERESFORD & WILLIAMS, 2006) e o terceiro grupo são representados pelas espécies *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* e *Lb. reuteri* cujas espécies podem produzir sabores indesejáveis e gás durante a maturação do queijo (HASSAN & FRANK, 2001), sendo detectados com menor frequência (BERESFORD & WILLIAMS, 2006).

Os *Lactobacillus* fazem parte da microbiota de muitos alimentos fermentados, como queijo, iogurte, kefir, salame, polvilho, azeitonas, pickles, molhos ácidos e vinhos. Devido a sua capacidade acidificante, de melhoria de sabor e textura, e por garantirem a qualidade nutritiva é reconhecido como micro-organismos seguro para serem utilizados em alimentos (BARBÉS, 2008; LEE & SALMINEN, 1995).

O gênero *Lactobacillus* é dentre todos os gêneros que constituem o grupo de BAL, o de maior diversidade e com uma filogenia complexa (CLAESSON, VAN SINDEREN & O'TOOLE, 2007).

A microbiota láctica de queijos, particularmente os produzidos com leite cru, é bastante complexa e o crescimento dessas BAL determina a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis em alimentos, seja pela competição por nutrientes, pela produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil ou pela produção de substâncias antimicrobianas de origem protéica denominadas bacteriocinas (AYAD et al., 2004; OUWEHAND & VESTERLUND, 2004; DEEGAN et al., 2006).

### **3. Bacteriocinas**

Bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos termoestáveis, sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular com efeito bactericida ou bacteriostática sobre micro-organismos taxonomicamente relacionados, contudo imune à célula produtora (ACUÑA et al., 2012; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

A capacidade das BAL em produzirem tais substâncias faz com que essas tenham um papel biológico importante, provocando a lise celular (efeito bactericida) ou impedindo a multiplicação celular de outras células (efeito bacteriostático) (KAUR et al., 2011; COTTER, HILL & ROSS, 2005; DÁLIE, DESCHAMPS & RICHARDS-FORGET, 2010).

A ação inibitória sobre micro-organismos patógenos e deterioradores de alimentos despertou interesse sobre o uso dessas substâncias na preservação de alimentos, como forma de substituir ou reduzir a adição de conservantes químicos, sem alterar a qualidade nutricional e sensorial do alimento (VÁSQUEZ, SUÁREZ & ZAPATA, 2009; KAUR et al., 2011).

Para que o potencial bioconservador de uma bacteriocina seja aproveitada na indústria de alimentos, ela deve apresentar algumas características, como ser termoestável, não apresentar risco à saúde do consumidor, apresentar amplo espectro de inibição sobre os

principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles, ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, além de ser produzido por uma linhagem microbiana de status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008; AGRAWAL & DHARMESH, 2012; KAUR et al., 2011).

Esses requisitos para a obtenção de uma bacteriocina com potencial biopreservador despertou a atenção para as produzidas pelas BAL, micro-organismos que além de apresentarem essas características, são reconhecidas como bactérias *Food Grade* frequentemente associadas à fermentação de alimentos lácteos (DE MARTINS, ALVES & FRANCO, 2002; DEEGAN et al., 2006).

O alvo principal das bacteriocinas de BAL são as bactérias Gram-positivas, podendo atuar contra bactérias de uma mesma espécie (estreito espectro de atividade) ou de espécies diferentes (amplo espectro de atividade) (CARR et al., 2002; CHEN & HOOVER, 2003; COTTER et al., 2005). Contudo, já há trabalhos que relatam a presença de BAL isoladas do leite e de queijos com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas (CARRASCO, SCARINCI & SIMONETTA, 2002; NETO et al., 2005)

A condição primordial para que uma BAL produza bacteriocinas é a presença de genes que as codificam (GÁLVEZ et al., 2007). A expressão desses genes é usualmente regulada por *operons*, que podem estar localizados no cromossomo, nos plasmídeos, ou mesmo em *transposons* (CHEN & HOOVER, 2003; DEEGAN et al., 2006).

Para a síntese das bacteriocinas são exigidos quatro genes: (1) o gene estrutural que codifica o pré-peptídeo (pré-bacteriocina); (2) o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; (3) o gene responsável pela produção de proteínas de transporte que externalizam a bacteriocina (denominado sistema de transporte ABC); (4) e o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao sistema de transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina. Os genes responsáveis pela imunidade da célula produtora estão concentrados em *operons* (DEEGAN et al., 2006), e a proteína é produzida concomitantemente com a bacteriocina, pois trata-se de um mecanismo de proteção das cepas bacteriocinogênicas (ROSA & FRANCO, 2002).

A produção de bacteriocinas pode ocorrer de forma natural durante a fase exponencial do crescimento microbiano ou ao final desta, possuindo relação direta com a biomassa (KAUR et al., 2011; ACUÑA et al., 2012; COTTER, HILL & ROSS, 2005). Contudo, a produção é favorecida quando o micro-organismo é cultivado em condições de

estresse, como em temperaturas sub ótimas ou pH ácido. Nestas condições, pode ocorrer baixa taxa de multiplicação microbiana, resultando na melhor utilização de energia e maior disponibilidade de metabólitos para a síntese das bacteriocinas. Em condições ótimas de cultivo há elevada taxa de multiplicação, ocasionando a falta de aminoácidos disponíveis para produção das bacteriocinas (VAN DEN BERGHE, DE WINTER & DE VUST, 2006).

As bacteriocinas produzidas por BAL são distintas dos antibióticos. Há diferenças entre antibióticos e bacteriocinas quanto à síntese, aplicação espectro antimicrobiano, modo de ação, mecanismos de resistência, toxicidade e micro-organismos produtores (MONTVILLE & KAISER, 1993; CLEVELAND et al.; 2001).

O acúmulo, nos últimos anos, de estudos conduzidos sobre bacteriocinas indica que sua aplicação em alimentos pode trazer uma série de benefícios, tais como extensão da vida-de-prateleira, proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição do risco de transmissão de micro-organismos patogênicos na cadeia de alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos (GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas formam um grupo heterogêneo de compostos antimicrobianos, de natureza peptídica apresentando de 20 a 60 resíduos de aminoácidos com características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. São produzidas por um grande número de espécies bacterianas e variam quanto ao modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas e origem genética (HUGAS, 1998; GARNEAU, MARTIN & VEDERAS, 2002; CAROLISSEN-MACKAY, ARENDSE & HASTINGS, 1997).

Segundo Schulz et al., (2003) e Rajaram et al., (2010) estas bacteriocinas podem ser subdivididas em 4 classes, baseadas na sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular. Em função das semelhanças observadas nas suas características, essa classificação acabou sendo adotada também para substâncias produzidas por outras bactérias Gram-positivas.

A Classe I é a dos lantibióticos, caracterizados pela presença de lantionina e  $\beta$ -metil lantionina, com peso molecular inferior a 5 kDa, sendo alguns representantes desse grupo a nisina, lacticina 481, carnocina UI49, lactocina S. Na Classe II estão agrupados pequenos peptídeos (<10 kDa) relativamente estáveis ao calor, que não contêm lantionina, como a pediocina pA-1, sakacinas A e P, curvacina A e outras. A Classe III encontra-se associada a grandes proteínas termolábeis (>30 kDa) que podem ser representadas pelas helveticinas J,

acidophilicina A e lactacinas A e B. Já na classe IV, encontramos bacteriocinas complexas que contém porções lipídicas ou de carboidratos, além da porção protéica, como a plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27, pediocina SJ 1 (CLEVELAND et al., 2001; RAJARAM et al., 2010; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

A bacteriocina mais conhecida e estudada é a nisina, produzidas por *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* com duas variantes: nisina A e nisina Z. O nome nisina, do inglês nisin, vem de “Group N Inhibitory Substance” o sufixo in é comumente usado para compostos com atividade antibacteriana. A nisina é a única bacteriocina considerada GRAS pelo comitê de aditivos do *Codex Alimentarius* da FAO (*Food and Agriculture Organization*) com aplicação prática na indústria de alimentos, sendo utilizada como conservante de alimentos há cerca de 50 anos (STEVENS et al., 1991; CHI-ZHANG, YAM & CHIKINDAS, 2004).

A nisina foi descoberta em 1933 e comercializada na forma purificada em 1953 na Inglaterra. Em 1983, a nisina foi adicionada a lista de aditivos alimentares na Europa e em 1988 seu uso foi aprovado em queijos processados nos Estados Unidos (COTTER, HILL & ROSS, 2005). No Brasil, o uso da nisina foi regulamentado em 1996, permitindo o emprego de até 12,5 mg.kg<sup>-1</sup> em queijos (BRASIL, 1996).

Seu uso como aditivo alimentar está regulamentado em mais de 48 países e sua principal aplicação é em queijos processados, produtos lácteos e alimentos enlatados (O’SULLIVAN, ROSS & HILL, 2002; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por, pelo menos, três diferentes maneiras: pela ação direta de bacteriocinas purificadas, como a nisina; em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de bactérias lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; ou pela adição destas culturas como adjuntas (NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008).

A ação da nisina sobre células de micro-organismos Gram-positivos ocorre em duas etapas. A primeira envolve a adsorção não-específica da nisina sobre a parede celular de micro-organismos Gram-positivos, fenômeno reversível e dependente do pH (3,0-6,5), da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática dos micro-organismos sensíveis, da presença de cátions divalentes e trivalentes (Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> e Gd<sup>3+</sup>) e da concentração utilizada. Em uma segunda etapa, a nisina torna-se insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis. Ela seria fortemente atraída aos fosfolipídios na membrana,

formando poros ou canais de 0,2-1,0nm de diâmetro. A simultânea despolarização da membrana causaria um rápido efluxo de moléculas essenciais (íons K<sup>+</sup>, aminoácidos e ATP), levando a uma série de alterações que resultariam na lise celular (MORENO et al, 1999).

De modo geral, a nisina possui um amplo espectro de ação. Atua sobre *Clostridium*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. É ativa frente a bactérias Gram-positivas e seus esporos e apenas contra alguns micro-organismos Gram-negativos. Isto se dá porque a parede celular das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina, além de impedir a germinação dos esporos (SCHULZ et al., 2003; DE MARTINIS et al., 2002).

#### 4. Referências Bibliográficas

ACUÑA, L.; PICARIELLO, G.; SESMA, F.; MORERO, R. D.; BELLOMIO, A. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. **The Federation of European Biochemical Societies Open BIO**, n.2, p.12-19, 2012.

AGRAWAL, R.; DHARMESH, S. An anti-*Shigella dysenteriae* bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 cheese isolate. **Turkish Journal of Biology**, v.36, p. 177-185, 2012.

ALMEIDA, S.L. et al. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. **RIAE - Revista Ibero-Americana de Estratégia**, São Paulo, v. 9, n. 2 mai./ago, p. 74-97, 2010.

AMMOR, M.S., FLÓREZ, A.B., MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, 24, 559–570, 2007

ARAÚJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; PAIVA, F. F. de A.; MARINHO, F. A.; PESSOA, P. F. A. de P.; VASCONCELOS, H. E. M. **Pesquisa participativa e novo modelo de produção de queijo Coalho artesanal da comunidade de Tisol, em Tauá, CE**. Cadernos de Ciência e Tecnologia, Brasília, v. 29, n. 1, p. 213-241, 2012.

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

AXELSSON, L.T., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 1-72.

BARBÉS, C. 2008. *Lactobacilli*. *In*: Versalovic, J., Wilson, M. (Eds.), Therapeutic Microbiology. **Probiotics and Related Strategies**, First Edition. ASM Press, Washington, pp. 19-33.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. *In*: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2006. v. 1, General Aspects, p. 287-317.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BOLOTIN, A., WINCKER, P., MAUGER, S., JAILLON, O., MALARME, K., WEISSENBAACH, J., EHRLICH, S.D., SOROKIN, A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Research** 11, 731-753.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 3977-3978, 11 março 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26/06/ 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga de terra ou manteiga de garrafa, queijo de Coalho e queijo de manteiga **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p.13-15, 16 jul. 2001.

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

BRUNO, L. M. **Microbiota láctica de queijos artesanais** / Laura Maria Bruno, Juliane Döering Gasparin Carvalho – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

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

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 1-16, 1997.

CASALTA, E. & MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271–273, 2008.

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

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

CARRASCO, M.S., SCARINCI, H. E., SIMONETA, A.C. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**. v.57, n.1, p. 15-19, 2002.

CAVALCANTE, J. F.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; CHAO, S.H.; TOMII, Y.; SASAMOTO, M.; FUGIMOTO, J.; TSAI, Y.C.; WATANABE, K. *Lactobacillus capillatus* sp., a motile *Lactobacillus* specie isolated from stinky tofu brine. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 58, n.11, p. 2555-2559, 2008.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. de O. P.; PETTI, R. H. V.; SILVA, C. R. L. da. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, SP, v.39, n.6, jun. 2009.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82-100, 2003.

CHI-ZANG, Y.; YAM, L.K.; CHIKINDAS, L.M. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.15-22, 2004.

CLAESSON, M.J., VAN SINDEREN, D., O'TOOLE, P.W. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letters** 269, 22–28, 2007.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

CICHOSCKI, A. J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A. T.; TORNADIJO, M. E.; FRESNO, J. M. Characterization of Prato Cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: Evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, v. 13, n. 4-5, p. 329-336. 2002.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 777-788, 2005.

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

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET , F.; Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, p. 370-380, 2010.

DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HIL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools preservation and shelf-life extension, **International Dairy Journal**, Alberta, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.

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

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products, **Food Reviews International**, v. 18, n. 2 e 3, p 191-208, 2002.

DEVRIESE, L. A.; POT, B. The genus *Enterococcus*. In: Wood, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H. (Eds.), **The genera of lactic acid bacteria**, v. 2. Blackie Academic & Professional, UK, p. 327-367.

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

ESCOBAR, C. A. M. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de Coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora** 2001, v. 56, n. 321, p. 248-256.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus Lactococcus** (2012). Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>>. Acesso em 18/06/2013c

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus Leuconostoc** (2012). Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/l/leuconostoc.html>>. Acesso em 19/06/2013d

FERREIRA, W. L.; FILHO, J.R.F. Avaliação da qualidade físico-química do queijo de Coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agrindustrial**, v. 2, n.1, p. 127-133, 2008.

FISHER, K., PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology** 155, 1749-1757, 2009.

FONTAN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M.E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in San Simon cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v. 18, p. 25-33, 2001.

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

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

FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's Milk. **Internacional Dairy Journal**, v. 19, p. 3 – 11, 2009.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, Ed. Atheneu, São Paulo, 2004.

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

FRANZ, C.M., STILES, M.E., SCHLEIFER, K.H., HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology** 88, 105-22, 2003.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.120, p.51-70, 2007.

GARABAL, J. I.; ALONSO, P. R.; CENTEN, J. A.; Characterization of acid lactic bacteria isolated from raw cow's milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). **LTW – Food Science and technology**, v. 41, n.8, p. 1452-1458, 2008.

GARNEAU, S.; MARTIN, I. N. ; VEDERAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p. 577-592, 2002.

GAYAN, P.; BABIN, M.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Diversity among lactococci isolated from ewe's raw milk and cheese. **Journal Applied Microbiology**, v. 87, p. 849 – 855, 1999.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732 – 738, 1997.

GIRAFFA, G. Enterococci in food. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163 – 171, 2002.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003b.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (eds). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, v. 2, 1995.

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

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HOORDE, K. V.; LEUVENC, I. V.; DIRINCK, P.; HEYNDRICKX, M.; COUDIJZER, K.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. 144 (2010) 226–235.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat science**, v.49, n.98, p. 139-150, 1998.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology** (2009), doi: 10.1016/j.copbio.2009.02.016.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ª Ed, Zagarosa: Ed. Acribia, 1994. 804p.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Genus Lactobacillus Beijerinck 1901**. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., SHARPE, M.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, p. 1209-1234, 1986.

KAUR, G.; MALIK, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, T. P.; BHARDWAJ, A.; SINGROHA, G.; VIJ, S.; KUMAR, N. Nisin and class II bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Microbial Drug Resistance**. 17(2), 197-205, 2011.

KLAENHAMMER, T.R., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., AZCARATE-PERIL, M.A., ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews** 29, 393–409, 2005.

KLEEREBEZEM, M., HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology** 14, 232–237, 2003.

LAMMERS, K. M.; BRIGIDI, P.; VITTALLI, B.; GIONCHETTI, P.; RIZELLO, F.; CARAMELLI, E.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Immunomodulatory effects of probiotics bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 165-172, 2003.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p.241-244, 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 5. Ed comemorativa dos 25 anos. São Paulo: Sarvier, 2011.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology** 15, 67–78, 2004.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. V.1, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1975, 286p.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.

MANGUEIRA, T. F. B. Aceitação sensorial de queijo de Coalho com baixo teor de gordura (light) e enriquecido com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 109–116, 2001.

MAKAROVA, K.S., KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology** 189, 1199–1208, 2007.

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

MATA, P. C.; ARLINDO, S.; BOEHME, K.; MIGUEL, T.; PASCOAL, A. VELAZQUEZ, J. B. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, p.43–63, 2008.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK – PIEKARCZYK, T., FERNANDÉZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ - MARTÍN, P., BARDOWSKI, J. **Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria**. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, USA, p. 3-33, 2010.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. Food microorganisms – health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 377, p. 4-9, 2003.

MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. New York: **Academic Press**, p.1-22,1993.

MORENO, I.; LERAYER, A. L; BALDINI, V. L. S.; LEITÃO, M. F. F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, vol.19, n.1, 1999.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, 2008.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. dos, S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. de A. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento. Embrapa Agroindústria Tropical**, n. 11, p. 24, 2003.

NETO, G. G. L.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005. Acesso em: < <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57s2/28329.pdf>>. Acesso em: 02 mar. 2013.

NIELSEN, D.S.; SCHILLINGER, U.; FRANZ, C.M.P.; BRESCIANI, J.; AWUA, W.A.; HOLZAPFEL, W.H.; JAKOBSON, M. *Lactobacillus ghanensis* sp. Nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. **International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1468-1472, 2007.

NOVAIS, G. 100 anos de Indústria de laticínios no Brasil. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p.1, 1988.

OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 286–290, 2008.

O`SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; & HILL, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, 84, 593-604.

OUWEHAND, A.C., VESTERLUND, S., 2004. **Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria**. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 375-396.

PERNAMBUCO. Secretária de Produção Rural e Reforma Agrária. Resolução nº 002 de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo de Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. **Diário oficial do Estado de Pernambuco**, Recife, 20 de abril de 1999.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. *Química Nova*, v. 27, nº 2, p. 293-300, 2004.

RAJARAM, G.; MANIVASAGAN, P.; GUNASEKARAN; THILAGAVATHI, B.; SARAVANAKUMAR, A. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.2, n.2, p. 138-144, 2010.

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

RENNA, M.; GARDA, A.; LUSSIANA, C.; AMBROSOLI, R.; BATTAGLINI, L.M. Chemical, nutritional and microbiological characterization of organic Fontina PDO cheese. **Italian Journal Food Science**, vol. 21, n. 3, 2009.

ROBINSON, R. K. (ed.) *Dairy Microbiology handbook*. 3. ed. New York: **Wiley Interscience**, 2002. 765 p.

ROSA, M. C.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Conscientiae Saúde Revista Científica, UNINOVE** . São Paulo. v.1, p.09-15, 2002.

SCHROETER, J., KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 292, 1–6, 2009.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. Bacteriocinas: Mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 14, n.2, p.229-235, 2003.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p.691-697, 2010.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food bio-preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

SILVA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p

SILVA, R. A.; BISMARA, P. A.; MOURA, R. B.; FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho artesanal produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012.

SOUZA, E. A. Tecnologia da fabricação de queijos. Juiz de Fora: **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 116p., 1960.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p.3613-3615, 1991.

TEUBER, M. **The genus *Lactococcus***. In: Wood, B.J.B., Holzappel, W.H. (Eds.), The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, UK, pp.173-232, 1995.

TEUBER, M., GEIS, A., 2006. The genus *Lactococcus*. **Prokaryotes** 4, 205–228.

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

VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pHdependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p. 159-170, 2006

VÁSQUEZ, S. M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas em la conservación de la carne. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 36, n.1, 2009.

WHITMAN, W.B., 2009. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. 3, The Firmicutes, Second Edition. Springer, USA.

WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J. SMIT, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal** 12, 91–109.

[www.noticiasagricolas.com.br](http://www.noticiasagricolas.com.br), acesso em: Dezembro de 2013.

# **CAPÍTULO II**

(Artigo a ser submetido à revista *Journal of Applied Microbiology*)

# BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES PODEM ASSEGURAR A QUALIDADE SANITÁRIA E MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO DE COALHO?

Giselle Maria Pereira Dias<sup>1,2</sup>, Nathalia Maria Cavalcanti Granja<sup>2</sup>, Talitha Nóbrega da Silva<sup>2</sup>, Maria Taciana Holanda Cavalcanti<sup>2,3</sup> e Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco CCB-UFPE;

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia Industrial – CENAPESQ/ UFRPE; <sup>3</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

## Resumo

A ação inibitória de substâncias produzidas por bactérias ácido láticas (BAL) sobre patógenos e deterioradores de alimentos tem despertado interesse sobre seu uso na preservação de alimentos e na segurança sanitária e microbiológica do produto. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial antimicrobiano de BAL isoladas de queijo de Coalho produzido artesanalmente a partir de leite cru no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil. A microbiota láctica foi avaliada através da contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônia – UFC, isoladas em meio Agar APT nas temperaturas de 30 e 37°C e identificação fenotípica. A avaliação do potencial antagonico foi realizada pela técnica de difusão em disco frente à *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. De um total de 349 isolados, 210 (60,17%) foram confirmados como BAL, dentre esses, 76 amostras, todas com morfologia de coco e capazes de coagular o Leite Desnatado Reconstituído (LDR) 12% (p/v) em até 18h de incubação, foram selecionadas para a etapa de identificação. Entre os isolados lácticos selecionados foram encontrados os gêneros *Enterococcus* (37,18%), *Lactococcus* (19,23%), *Streptococcus* (25,64%) e *Leuconostoc* (15,38%). A grande maioria das BAL testadas quanto à atividade antimicrobiana foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (82,89%) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (88,15%). As maiores médias dos halos de inibição foram obtidas pelos representantes dos gêneros *Leuconostoc* frente a *S. aureus* ATCC 6538 diferenciando significativamente dos demais gêneros estudados. Enquanto que os representantes do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* não apresentaram diferença significativa da média de seus halos quanto testados frente a *E. coli* ATCC 25922. As médias dos halos de inibição do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus* quando testados frente a *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538 diferiram significativamente, contudo, as médias obtidas foram estatisticamente superiores quanto testados frente a *E. coli* ATCC 25922. As BAL isoladas do queijo do Coalho de Venturosa apresentam potencial antimicrobiano e podem assegurar a qualidade sanitária e microbiológica do queijo de Coalho.

**Termos de Indexação:** potencial antimicrobiano, bactéria ácido lática, queijo de Coalho artesanal.

## 1. Introdução

O queijo de Coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos e consumidos no Nordeste Brasileiro, principalmente nos Estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba. Devido à simplicidade de sua tecnologia e suas características organolépticas peculiares, o queijo de Coalho tem se expandido comercialmente sendo encontrado praticamente em todos os Estados da Federação (FERREIRA & FILHO, 2008).

Devido a grande aceitação pelos consumidores, o queijo de Coalho tem participação considerável na economia da região Nordeste do Brasil, o que torna essa atividade importante tanto no âmbito social quanto econômico, além de ser em determinadas localidades a principal fonte de renda e sobrevivência da população (ALMEIDA et al., 2010; PERRY, 2004; NASSU et al., 2006).

Queijos produzidos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado devido à biodiversidade das Bactérias Ácido Lácticas (BAL) endógenas do leite. As BAL, comumente encontrados em queijos são as pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FRANCIOSI et al., 2009; ABRIOUEL et al., 2008; MUCHETTI & NEVIANI., 2006; FOX et al., 2000; ABBE, KRÖCKEL & HILL et al., 1995).

A classificação das BAL, em diferentes grupos, baseia-se na sua morfologia, no modo de fermentação da glicose, do crescimento a diferentes temperaturas, na adaptação a ambientes ricos em nutrientes para produzirem ácido láctico, na habilidade de crescer em altas concentrações de sal (NaCl) e de apresentem tolerância a meios ácidos ou alcalinos (HARRIGAN, 1998; SALMINEM & WRIGTH, 1998).

Os fermentos ou culturas lácticas, durante a elaboração de queijos, desempenham papel importante, porque a acidez produzida facilita a ação do Coalho e auxilia na expulsão do soro além de gerar no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos e leveduras, conferindo-as uma vantagem competitiva sob estes micro-organismos (AYAD et al., 2004; FERREIRA, 2001).

O queijo de Coalho por ter sua origem ligada à fabricação artesanal, em numerosas unidades de produção caseira e em pequenas queijarias rurais onde é fabricado a partir de leite cru, pode favorecer, quando não há os devidos cuidados de higiene, a contaminação, devido à manipulação inadequada. A contaminação da matéria prima por condições

higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento, armazenamento, transporte e comercialização, trazem como consequência, queijos de baixa qualidade, além de expor o consumidor ao risco de doenças transmitidas pelos alimentos - DTA (JAY, 2009; CAVALCANTE et al., 2007; PEIXOTO et al., 2007; FEITOSA, 2005).

A produção de queijos de alta qualidade requer uma estreita atenção para a caracterização, diferenciação e manutenção das cepas de BAL envolvidas no processo (GIRAFFA et al., 2003a). Além disso, o crescimento de BAL determina a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis em alimentos tendo como estratégia básica a produção de substâncias antagônicas denominadas bacteriocinas (AYAD et al., 2004; ABBE et al., 1995).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizadas pelas BAL que quando liberadas no meio extracelular além de apresentar ação bactericida ou bacteriostática frente a micro-organismos patogênicos e deteriorante de alimentos, não provocam alterações na qualidade sensorial do produto, o que desperta o crescente interesse das indústrias de alimentos sobre o potencial de utilização desses compostos como conservantes naturais em substituição aos químicos, além de conferir ao queijo uma proteção natural contra a contaminação por micro-organismos patógenos (AROURI et al., 2009; NASCIMENTO, MORENO & KUAYE, 2008; HAJIHANI et al., 2007; COTTER et al., 2005; CHEN & HOOVER, 2003; CINTAS et al., 2000).

Dessa forma, esse trabalho visou estudar o potencial antimicrobiano de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho produzido artesanalmente a partir de leite cru no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Coleta das Amostras de queijo**

As amostras de queijo de Coalho artesanal fabricadas com leite cru foram coletadas em duas unidades produtoras localizada no Município de Venturosa, região Agreste de Pernambuco, Brasil durante os meses de agosto e setembro de 2011. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Biotecnologia do Centro de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESQ/ UFRPE) e armazenadas sob-refrigeração a temperatura de 10°C até as análises.

## **2.2 Avaliação da Microbiota Láctica**

### **2.2.1 Preparação das amostras**

As amostras de queijo de Coalho foram subdivididas aleatoriamente, a fim de se obter uma alíquota de 25g, as quais foram homogeneizadas com 225 mL de solução de Citrato de Sódio 2% (p/v) (VETEC<sup>®</sup>). Na sequência, foram realizadas diluições decimais em série até 10<sup>9</sup>, em solução de água peptonada a 0,1% (HIMEDIA<sup>®</sup>) (HARRIGAN, 1998; FRANK, CHRISTEN & BULLERMAN, 1992).

### **2.2.2 Isolamento e contagem**

A contagem e o isolamento das BAL foram realizados após inoculação, em duplicata, de 100µL das diluições das amostras do queijo de Coalho, *surplate* (HALL, LEDENBACH & FLOWERS, 2001) em meio *APT Broth – All Purpose Tween*, (HIMEDIA<sup>®</sup>) adicionado de *Agar Powder Bacteriological* (HIMEDIA<sup>®</sup>) seguido de estriamento. As placas foram incubadas a 30 e 37±1°C por 48 horas sob condições aeróbicas (SILVA et al., 2007).

Após 48 horas de crescimento das BAL, foi realizada uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias – UFC. Os morfotipos foram escolhidos das placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias, das quais 15-20 colônias de cada placa foram selecionadas e coletadas para a etapa de purificação.

As características morfológicas das UFC (unidades formadoras de colônias) escolhidas de acordo com Cavalcante et al. (2007) foram colônias relativamente pequenas, de formato arredondado, cor branca, opacas, bordas delimitadas e localizadas sempre na região interna da placa. De acordo com os mesmos autores, o tamanho reduzido das colônias é atribuído principalmente ao baixo rendimento de crescimento, uma consequência do metabolismo exclusivamente fermentativo das BAL.

### **2.2.3 Purificação e manutenção da microbiota láctica**

A purificação foi realizada pelo estriamento das colônias selecionadas, (item 2.2.2), em meio *APT ágar*, seguida de incubação a 30±1°C e 37°C±1°C, conforme temperatura usada na etapa de isolamento, por 48 horas. Após etapa de purificação, as BAL foram mantidas em caldo LDR (Leite Desnatado Reconstituído) (MOLICO NESTLÉ<sup>®</sup>) 12%

suplementado com glicerol 15% (FMAIA<sup>®</sup>) e armazenadas em freezer a temperatura de -18°C até a etapa de caracterização da microbiota láctica.

#### **2.2.4 Caracterização da microbiota láctica**

Antes dos testes de caracterização da microbiota láctica, cada BAL foi submetida a duas reativações consecutivas, ambas em caldo LDR 12% (p/v) seguida de incubação a 30 e 37±1°C por 72h e 24h, cada reativação.

Para a confirmação de BAL, as colônias purificadas foram submetidas a testes bioquímicos de reação da atividade da catalase (SILVA et al., 2001), coloração de Gram (QEEL KIT – Química Especializada Erich, LTDA) e capacidade de coagulação do caldo LDR 12% (p/v).

Para a avaliação da capacidade de coagulação foi realizada pela adição de uma alíquota de 1% das culturas ativadas em caldo LDR 12% (p/v) e incubadas em estufa microbiológica a 30 e 37±1°C por um período de sete dias ou até a coagulação. A coagulação do caldo, durante esse período, foi indicativo de produção de ácido láctico pelos micro-organismos.

De acordo com a capacidade de coagular o leite, os isolados foram classificados Segundo Citti, Sandine & Eliker (1965) como fortes produtores de ácido (FTP) os com capacidade de coagular o LDR 12% (p/v) em até 18-48h e denominados culturas iniciadoras ou *startes*, fracos produtores de ácido (FCP) os que coagularam após as 48h e denominadas culturas adjuvantes ou secundárias e não produtores de ácido (NP) os que não tiveram capacidade de coagulação o meio em até 7 dias.

Os micro-organismos catalase negativa, Gram-positivos e capazes de produzir ácido, na forma de cocos ou bastões foram considerados BAL (HALL, LEDENBACH e FLOWERS, 2001).

#### **2.2.5 Identificação das bactérias ácido lácticas (BAL)**

Os isolados confirmados como BAL, na forma de coco e capazes de coagular o LDR 12% em até 18h de incubação seguiram para a etapa de identificação ao nível de gênero.

A identificação das BAL em forma de cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) foi realizada de acordo com Harrigan (1998), e teve como

base testes de crescimento dos isolados nas seguintes condições: temperaturas de 10° e 45±1°C, pH de 4,4 e 9,6, teor de NaCl de 4 e 6,5% (p/v) e produção de CO<sub>2</sub> a partir da glucose.

O teste de crescimento em temperaturas de 10 e 45°C foi realizado em caldo BHI - *Brain Heart Infusion* (HIMEDIA®) incubados por 7 e 2 dias, respectivamente.

Os testes de crescimento em pH 4,4 e 9,6 e na presença de 4 e 6,5 % (p/v) de NaCl foram realizados em caldo TSB - *Tryptic Soybean Broth* (ACUMEDIA®), todos incubados nas respectivas temperaturas de isolamento por 48h. Para ajuste do pH foram utilizadas soluções de HCl e NaOH, ambas a 0,1N e para ajuste do teor de sal, foi adicionado ao meio, NaCl anidro de acordo com a concentração final desejada.

O teste de produção do CO<sub>2</sub> foi utilizado o caldo APT (HIMEDIA®), suplementado com 5% de glucose e um tubo de Durham invertido. Após inoculação da BAL o caldo foi coberto com uma camada de 1 cm de óleo mineral esterilizado. A leitura dos resultados dos testes de produção de CO<sub>2</sub> foi realizada nas primeiras 18h de incubação e a cada 24 horas por um período de 7 dias.

Os isolados que diferiram em alguma das características foram considerados atípicos.

### **2.3 Avaliação da atividade antagonista das BAL**

Para os testes de avaliação da atividade antagônica, cada BAL foi submetida a duas reativações consecutivas. A primeira reativação foi realizada em caldo LDR 12% (p/v) e a segunda em Caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) suplementado 0,5% (p/v) de glucose seguida de incubação a 30 e 37±1°C, conforme temperatura usada na etapa de isolamento, por 72h e 24h, cada reativação.

Os micro-organismos patógenos utilizados na avaliação da atividade antagônica foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Antes do teste, esses micro-organismos foram submetidos a duas reativações consecutivas, ambas em caldo BHI, a 37°C por 24 h.

A atividade antagônica das BAL frente aos patógenos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tagg et al. (1976) modificado pelo uso da técnica de disco difusão. Para essa atividade, três discos de papel de filtro da marca Whatmam n°1 de 6 mm foram dispostos em posições equidistantes na superfície do MRS ágar contidos em placas

de Petri. Em dois discos foram adicionados 5µL de uma cultura previamente reativada, com exceção ao disco referente ao controle negativo no qual foi adicionado 5µL de Caldo MRS esterilizado acrescido de 5% de glicose sem micro-organismos. As placas foram encubadas a 37°C por 48h, em aerobiose.

Após esse período, foram adicionadas as tampas das placas de Petri, 500µL de clorofórmio, deixando-os agir por 30 minutos em temperatura ambiente com o objetivo de eliminar as BAL e permanecer apenas as substâncias antimicrobianas. Em seguida, foi colocado uma sobrecamada de ágar BHI semi-sólido em cada placa, contendo os micro-organismos patogênicos na concentração de 10<sup>6</sup> e incubadas sob aerobiose a 37°C em estufa microbiológica, durante 24 horas. Todo o experimento foi feito em duplicata.

A atividade antagônica foi verificada pela presença de halos de inibição ao redor dos discos. A medição dos halos foi realizada em milímetros com auxílio de paquímetro.

As médias obtidas do diâmetro dos halos de inibição foram comparadas através do software Assistat utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1 Avaliação da microbiota láctica quanto as temperaturas de isolamento**

As temperaturas de incubação permitiram bom crescimento microbiano com contagens de 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/mL para BAL isoladas a temperatura de 30±1°C e contagens de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/mL para as BAL isoladas a 37±1°C.

Em relação ao crescimento das BAL nas temperaturas de incubação, obtivemos um percentual de 81,25% dos 240 micro-organismos submetidos a temperatura de incubação de 30±1°C, enquanto a 37±1°C esse percentual caiu para 64,17%, mostrando que a microbiota do queijo de Coalho de Venturosa é composta em sua maioria por bactérias mesofílicas.

Entre os 480 micro-organismos isolados com as características acima citadas, 349 isolados (72,71%) foram submetidos aos testes de caracterização fenotípica, as demais amostras (27,29%) foram descartadas por não apresentar crescimento durante as etapas de purificações.

#### **3.2 Caracterização das BAL**

De um total de 349 isolados apenas 16 foram caracterizados como catalase positiva (4,58%) e, portanto eliminados. As demais que correspondem a 95,42% dos isolados foram

classificadas como catalase negativa e posteriormente submetidos ao teste de coloração de Gram.

Dentre os 333 isolados submetidos ao teste de Gram, um total de 115 isolados (34,53%) foi classificado como Gram-negativo. A maioria dos isolados testados, 218 (65,47%) foi classificada como Gram-positivos.

Dentre os micro-organismos Gram-positivos, foi observado uma predominância de cocos (74,77%), os demais micro-organismos Gram-positivos foram classificados como bacilos e cocobacilos com percentuais de 15,60% e 9,63%, respectivamente.

Os isolados classificados como Gram-positivos foram avaliados quanto à capacidade de coagulação de leite LDR 12%. Dos 218 micro-organismos Gram-positivos e catalase negativa, 178 (81,65%) foram classificados como fortes produtores de ácido (FTP), 32 (14,68%) foram classificados como Fracos produtores de ácido (FCP) e apenas 8 (3,67%) não foram capazes de coagular o leite em até 7 dias.

Micro-organismos Gram-positivo, catalase negativa em forma de cocos sugerem bactérias ácido lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (TAGG, DAJAMI & WANNAMAKER et al., 1976).

Os resultados obtidos nesse trabalho são similares aos de Begovic et al. (2011), ao analisarem a dominância de bactérias ácido lácticas em 5 amostras de queijos artesanais produzidos na Sérvia. Esses autores isolaram 530 micro-organismos e classificaram 406 como Gram-positivos e catalase negativo. Destes 406 isolados, 309 bactérias apresentaram morfologia de cocos e apenas 97 apresentaram morfologia em forma de bastão.

Nossos resultados estão de acordo com os de Moraes et al. (2009), que dentre as culturas isoladas de leite cru e de queijos provenientes da Região de Viçosa – Minas Gerais obteve cocos Gram-positivos e catalase negativa como predominantemente em suas amostras. Predominância da microbiota com morfologia de cocos em queijos artesanais e industrializados também foram observados por outros pesquisadores (MALLESHA et al., 2010; LEITE et al., 1997; OLIVEIRA & GARCIA, 1986).

Ao final dos testes de confirmação das culturas lácticas, um total de 210 (96,33%) micro-organismos foram classificados como BAL por apresentarem características morfológicas e bioquímicas compatíveis com essa classe de bactérias, tais como catalase negativa, Gram-positiva e produtor de ácido (FTP e FCP) sendo, então, submetidas aos testes bioquímicos de identificação de BAL.

### 3.3 Identificação das BAL

Dos 210 isolados confirmados como BAL, um total de 78, todos com morfologia de coco e considerados fortes produtores de ácido com capacidade de coagulação do LDR 12% em até 18h de incubação, foram selecionados para a etapa de identificação do gênero (Tabela 01). Das 78 BAL selecionadas, observou-se uma predominância de BAL crescidas a temperatura de 30±1°C (Tabela 02).

**Tabela 01:** Classificação dos isolados de amostras de queijo de Coalho artesanal quanto à capacidade de coagulação do Leite Desnatado Reconstituído a 12% por um período de até sete dias.

Produção de Ácido	Morfologia das BAL			N° de isolados *	% **
	Coco*	Bacilo*	Cocobacilo*		
FTP (18h)	78	19	11	108	51,43
FTP (24h)	18	1	4	23	10,95
FTP (48h)	32	12	3	47	22,38
FCP	28	2	2	32	15,24
Total	156	34	20	210	100,00

FTP: Forte Produtor de ácido; FCP: Fraco Produtor de ácido.

\* Resultados expressos como números de amostras; \*\* Percentagem dos números total de isolados.

**Tabela 02:** Identificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas com morfologia de cocos, isoladas de amostras de queijo Coalho artesanal produzidas no Município de Venturosa – Pernambuco.

Gêneros	Temperatura de incubação		N° de isolados *	% **
	30±1°C	37±1°C		
<i>Enterococcus</i>	25	4	29	37,17
<i>Streptococcus</i>	13	7	20	25,64
<i>Lactococcus</i>	13	2	15	19,23
<i>Leuconostoc</i>	12	-	12	15,38
NI	2	-	2	2,56
Total	65	13	78	100,00

NI Número de isolados não Identificados. \* Resultados expressos como números de amostras;

\*\* Percentagem dos números total de isolados;

O gênero *Enterococcus* foi predominante dentre as BAL, representando 37,17% dos isolados com morfologia de cocos identificados, seguido de *Streptococcus* (25,64%), *Lactococcus* (19,23%) e *Leuconostoc* (15,38%). Apenas 18,4% das BAL não apresentaram resultados diferentes aos citados na literatura para os testes de identificação, sendo todas as demais consideradas atípicas.

A alta incidência do gênero *Enterococcus* nas amostras estudadas pode ser justificada pela alta adaptabilidade e resistência deste gênero de sobreviver a condições adversas, tais como pH e salinidade extremas (OGIER & SERROR 2007; CARIDI et al., 2003).

A predominância do gênero *Enterococcus* também foi encontrada por Freitas (2011) analisando amostras de queijo de Coalho de diferentes laticínios no Estado da Paraíba, o mesmo classificou dentre um total de 49 isolados, 40,82% como pertencentes ao gênero *Enterococcus* e Bruno et al. (2007), relataram o gênero *Enterococcus* como predominante entre as BAL isoladas em queijos de Coalho artesanais produzidos no Rio Grande do Norte. Contudo, nossos resultados não corroboram com os de De Souza, Rosa & Ayub. (2003) que afirmam que de 431 BAL isoladas de queijos Serrano tipo artesanal produzido a partir de leite cru, os *Lactobacillus* foram os mais abundantes, seguidos por *Enterococcus* e *Lactococcus*.

A presença do gênero *Enterococcus* é de extrema importância na composição da microbiota natural de queijos artesanais e sua alta densidade em produtos lácteos, como queijo e leite já foi observada em muitos trabalhos (PRICHULA et al., 2013; MALLESHA et al., 2010; FRANZ et al. 2009). A influência positiva deste gênero no queijo deve-se ao desenvolvimento de características sensoriais, por meio de reações bioquímicas como proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis. Além disso, algumas espécies de *Enterococcus* podem produzir bacteriocinas, motivo pelo qual são aplicadas como fermento láctico primário. Contudo, o seu maior uso ainda é como fermento adjunto (GIRAFFA, 2003b; FRANZ et al. 2009).

O gênero *Streptococcus* representou 25,64% das BAL identificadas, dos quais apenas 35% de seus representantes foram isolados a 37°C. Este gênero apesar de ser uma espécie diferenciada pela sua resistência ao aquecimento, neste trabalho, seu isolamento ocorreu predominantemente à temperatura de 30±1°C.

De acordo com Hassan & Frank (2001), a frequência de *Streptococcus* é comum em fermentações lácticas sendo a espécie mais encontrada, *S. thermophilus*, devido a sua resistência ao aquecimento e capacidade de resistir  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, característica essa que o diferencia das demais BAL, além de poder justificar seu isolamento a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . A frequência do gênero *Streptococcus* também foi encontrada por Michel & Martley (2001) em queijos produzidos com cozimento da massa como o Cheddar, etapa não executada em queijos de Coalho produzidos em Pernambuco.

O gênero *Lactococcus* representou 19,23% das BAL identificadas com isolamento a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sendo este resultado justificado por se tratar de um micro-organismo mesofílico (BERESFORD & WILLIAMS, 2006).

Os resultados expostos neste trabalho podem ser comparados com os encontrados por Ouadghiri et al. (2005) ao avaliar a biodiversidade de bactérias ácido lácticas em queijo branco e macio Marroquino, classificaram dentre 164 BAL isoladas, 27% como sendo do gênero *Lactococcus*, sendo este, o segundo gênero mais numeroso após *Lactobacillus* (34%). Entretanto, são diferentes dos resultados encontrados por González et al. (2010) quando analisaram a atividade enzimática de BAL (com propriedades antimicrobianas) isoladas a partir de um queijo tradicional espanhol, classificaram 54,16% de um total de 24 BAL, como pertencentes ao gênero *Lactococcus*. A predominância do gênero *Lactococcus* também foi observado no trabalho de Begovic et al. (2011) ao analisar a dominância de bactérias ácido lácticas em 5 amostras de queijos artesanais produzidos na Sérvia o qual obteve o maior número de representantes pertencentes a esse gênero.

A densidade populacional do gênero *Lactococcus* pode ser explicada pelas alterações no fluxograma de cada tipo de queijo, como por exemplo, o cozimento da massa durante a produção do queijo, pode reduzir ou eliminar incidência do gênero *Lactococcus* que são geralmente predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa. A sua presença também pode ser reduzida durante o processo de cura e maturação, podendo os *Lactococcus* desaparecerem após seis a oito semanas, o que pode justificar a sua predominante ou não em alguns queijos (FONTÁN et al, 2001; LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000).

Outro fator relacionado à incidência de *Lactococcus* em queijos deve-se às concentrações de cloretos, pois segundo Fox et al. (2000) os baixos níveis de NaCl encontrados nas amostras de queijos podem estimular o crescimento das espécies de *Lactococcus*, porém, concentrações acima de 5% inibem fortemente os micro-organismos

deste gênero. O queijo de Coalho de Pernambuco por apresentar uma massa fresca que não sofre cozimento da massa e baixa concentração de sal (0,92%) permitir o desenvolvimento de *Lactococcus* o que justifica a presença desse gênero nos resultados encontrados.

O isolamento de representantes do gênero *Leuconostoc* só foi obtido a temperatura de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , o que representou 15,38% do total das BAL identificadas. A presença desse gênero em apenas essa temperatura pode ser justificada, pelo fato de serem micro-organismos mesofílicos (BERESFORD e WILLIAMS, 2006; FOX et al., 2000).

Nossos resultados são similares aos encontrados por González et al. (2010) que ao analisar atividade enzimática com propriedades antimicrobianas, identificaram 12,5% entre as 24 BAL isoladas de um queijo tradicional Espanhol (Queijo Genestoso), como sendo *Leuconostoc*, mas, difere dos relatados por Ouadghiri et al. (2005) ao avaliar a biodiversidade de bactérias ácido lácticas em queijo branco e macio Marroquino classificaram dentre 164 BAL isoladas, 27% como sendo do gênero *Leuconostoc*.

Dentre as 78 BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa, apenas 2 (2,56%) não foram identificados a partir dos testes bioquímicos realizados e por isso não foram submetidos a avaliação do potencial antagônico.

### **3.4 Avaliação do potencial antagônico das BAL**

Os resultados da avaliação do potencial antagônico das BAL dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922, estão apresentadas na Tabela 03.

**Tabela 03** – Avaliação do potencial antagônico de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e média do diâmetro dos halos em milímetros.

Gêneros (N°)	Efeito Antagônico				
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>E.coli/ S. aureus</i>
	Inibição* (%)	Diâmetro dos halos <sup>a</sup> (mm)	Inibição* (%)	Diâmetro dos halos <sup>a</sup> (mm)	Inibição** (%)
<i>Enterococcus</i> (29)	93,10	20,33 <sup>bB</sup>	89,65	22,83 <sup>aA</sup>	51,72
<i>Streptococcus</i> (20)	75,00	19,00 <sup>bB</sup>	80,00	21,00 <sup>aA</sup>	35,00
<i>Lactococcus</i> (15)	73,33	20,16 <sup>aB</sup>	93,33	20,66 <sup>aA</sup>	46,66
<i>Leuconostoc</i> (12)	83,33	24,83 <sup>aA</sup>	91,66	21,50 <sup>bA</sup>	41,66
CV % 4,60					

\* Percentagem dos isolados de BAL que apresentaram atividade antagônica para apenas um patógeno.

\*\* Percentagem dos isolados de BAL que apresentaram atividade antagônica para ambos os patógenos.

<sup>a</sup> Resultados apresentados como média aritmética do diâmetro dos halos em milímetros. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam linhas e as letras minúsculas comparam colunas.

A grande maioria das BAL isoladas nesse trabalho foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 (82,89%) e *E. coli* ATCC 25922 (88,15%) mostrando que as BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa-PE são capazes de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, interferir no desenvolvimento do patógeno e dessa forma auxiliar na segurança sanitária e microbiológica desse alimento.

A contaminação microbiana de queijos de Coalho assume destacada relevância em Saúde pública ao se verificar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *S. aureus* e *E. coli* são comumente encontrados em produtos lácteos (PERESI et al., 2001).

Diante disso, a pesquisa por BAL que apresentem capacidade de produzir substâncias antimicrobianas e inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, eliminaria o risco que esses patógenos poderiam causar a saúde do consumidor como também retardaria o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos causadas pelo seu crescimento.

As culturas dos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus* foram as que apresentaram melhor potencial de inibição do crescimento dos micro-organismos patogênicos, uma vez que mais de 90% de seus representantes apresentaram atividade antagonista frente a *S. aureus* ATCC 6538 (93,10%) e *E. coli* ATCC 25922 (93,33%), demonstrando o seu efeito benéfico na qualidade sanitária do queijo de Coalho.

Entre os gêneros de bactérias ácido lácticas avaliados 51,72% dos *Enterococcus*, 35,00% dos *Streptococcus*, 46,66% *Lactococcus* e 41,66% dos *Leuconostoc* foram capazes de apresentar atividade antagonista para ambos os micro-organismos patogênicos testados o que mostra o potencial dessas BAL em produzir substâncias antimicrobianas que são

ativas tanto para micro-organismos Gram-positivos quanto Gram-negativos. Neste estudo, também foi observado a variação com relação às médias dos diâmetros dos halos de inibição frente a micro-organismos patogênicos.

As maiores médias dos halos de inibição foram obtidas pelos representantes dos gêneros *Leuconostoc* frente a *S. aureus* ATCC 6538 diferenciando significativamente dos demais gêneros estudados. Enquanto que a média dos halos de inibição obtidos pelos representantes do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* não apresentaram diferença significativa quanto testados frente a *E. coli* ATCC 25922.

As médias dos halos de inibição do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus* quando testados frente a *E. coli* ATCC 25922 foram estatisticamente superiores que quando testados frente a *S. aureus* ATCC 6538.

A ação antagonista das BAL naturalmente presentes na microbiota de alimentos de origem animal já foi descrita, principalmente em relação a patógenos Gram-positivos tais como *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* (NERO et al., 2008). A presença da dupla camada lipídica externa, presente nos micro-organismos Gram-negativos dificulta a interação de substância antagonista específica, como bacteriocinas, com a parede e membrana plasmática das bactérias (DEEGAN et al., 2006). Contudo, neste trabalho isso não foi observado, visto que a maior percentagem de isolados lácticos apresentou potencial antagonista frente a *E. coli*.

Apesar de serem descritas como portadoras de atividade antimicrobiana específica contra determinadas espécies de bactérias, as bacteriocinas podem apresentar essa mesma atividade de forma inespecífica contra Gram-positivas e Gram-negativas que não apresentam integridade na sua membrana externa, permitindo a interação com a estrutura da membrana citoplasmática (COTTER et al., 2005; WIRAWAN et al., 2006). Entretanto, culturas bacteriocinogênicas são imunes às próprias bacteriocinas, devido à produção de proteínas específicas de imunidade (ARAUZ et al., 2009).

As BAL bacteriocinogênicas normalmente estão presentes em altas concentrações em leites e derivados (RODRÍGUEZ et al., 2000), este resultado também foi observado no queijo de Coalho de Pernambuco.

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Coventry et al. (1997), que isolaram de amostras de leite e derivados culturas bacteriocinogênicas de BAL produtoras de bacteriocinas contra *S. aureus* e *L. monocytogenes* e por Carrasco, Scarinci & Simonetta

(2002), que isolaram bactérias ácido lácticas de queijos artesanais e de produtos lácteos comercializados na Argentina que exibiram atividade antagônica tanto contra bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

Atividade antimicrobiana de BAL isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) também foi encontrada por Alexandre et al. (2002), que detectaram atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos, tais como: *S. aureus* FRI-184, *S. carnosus* Mc1, *L. monocytogenes* Scott A, *L. inócu*a BL 86/26, *Lactobacillus sake* 2714. Contudo difere com os nossos resultados, quando relata que nenhuma das BAL testadas inibiu *E. coli*.

Nosso trabalho também está de acordo com os resultados obtidos por Guedes et al. (2005) que isolaram BAL de amostras de queijos de Coalho artesanal e industrial coletadas em unidades produtoras de Pernambuco e no Comércio Varejista do Recife que exibiram atividade antagônica contra micro-organismos patógenos de relevância nesse alimento, tais como os *S. aureus*, a *E. coli* e a *L. monocytogenes*. Contudo, os *Lactococcus* isolados por Guedes et al. (2005) exibiram halos de inibição entre 16,61 e 20,16 mm frente aos *S. aureus* e de 54,87 mm frente a *E. coli*, enquanto que os isolados do queijo de Coalho de Venturosa exibiram halos de 20,55 e 20,82 mm para *S. aureus* ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 6538, respectivamente.

A variação nas medidas dos halos de inibição, observada entre os grupos de BAL, podem ser devido a existências de mecanismos de inibição diferentes e/ ou a composição química da substância inibidora, que influencia a sua difusão do meio (MACIEL et al., 2008).

A ação antimicrobiana dos *Lactococcus* deve-se a produção de nisina, das 40 espécies conhecidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 35 sintetizam essa bacteriocina, comumente encontradas em produtos lácteos e que possui ampla atividade antimicrobiana, sendo ativa contra bactérias Gram-positivas e esporos além de ser utilizada como conservante alimentar (CLEVELANT et al., 2001; LIU et al., 2004). A habilidade da nisina em inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas inclusive as patogênicas de alto risco nos alimentos, como os *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum* e *L. monocytogenes* também foram demonstradas nos trabalhos de Bower et al. (2002) e Clevelant et al. (2001).

A nisina também tem demonstrado ação efetiva frente a bactérias Gram-negativas e fungos quando usadas em combinação com outros compostos, como um agente quelante (BOWER et al., 2002). Segundo Helander & Sandholm (2000), o EDTA é o agente quelante mais efetivo e quando combinado com a nisina, auxilia a inibição de bactérias do grupo das Gram-negativas. Segundo Cleveland et al. (2001), relataram a efetividade da nisina sobre bactérias Gram-negativas quando combinadas com o ácido láctico.

As bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus* são comumente chamadas de enterocinas com atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas, incluindo esporos e bactérias patogênicas, tais como *Listeria* spp. (CLEVELAND et al., 2001). Até o momento, poucas são as enterocinas caracterizadas por apresentarem atividade contra bactérias Gram-negativas. A enterocina O12 é um exemplo de bacteriocina produzida por *Enterococcus* com atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (JENNES et al., 2000). Bactérias ácido láctica isoladas de produtos cárneos, também apresentaram atividade antagonista especialmente contra patógenos Gram-negativos (DÁVILA et al., 2006).

Torri Tarreli et al. (1994) observaram a inibição das BAL isoladas de derivados lácticos frente a patógenos como *L. monocytogenes* e *S. aureus* por bacteriocinas produzidas por *Enterococcus*. González et al. (2006), também relataram a atividade antagonista de *Enterococcus* isolados de Queijo Genestoso frente a *S. aureus* CECT 748, *E. faecalis* CECT 481, *C. tyrobutyricum* CECT 4011, *L. monocytogenes* CECT 4031 e *Lactobacillus plantarum* CECT 748.

Segundo Savadogo (2004), o grau de inibição de *S. aureus* pode estar relacionado ao crescimento da BAL e produção de ácido láctico. A redução rápida do pH, associadas as características de competição biológica produzidas por essas bactérias podem ser fatores de inibição do crescimento dessa espécie.

#### **4. Conclusão**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que há uma variedade de bactérias lácticas autóctones no queijo de Coalho artesanal com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas que auxiliam na qualidade sanitária e microbiológica deste produto e na segurança alimentar da população consumidora.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e ao Centro de Apoio a Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CENAPESq/ UFRPE).

## 6. Referências bibliográficas

ABEE, T.; KRÖCKEL, L. E HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbial**, Berlin, v. 28, p. 169-185, 1995.

ABRIOUEL, H., MARTÍN-PLATERO, A., MAQUEDA, M., VALDIVIA, E., MARTÍNEZ-BUENO, M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p. 200–208, 2008.

ALEXANDRE, D.P., SILVA, M.R., SOUZA, M.R. SANTOS, W.M.L. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte. V.54, n.4, p.424-428, 2002.

ALMEIDA, S.L.; JÚNIOR, P.G.F.; GUERRA, J.R.F. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. **RIAE - Rev. Ibero-Americana de Estratégia**, v.9, p.74-97, 2010.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, T.C.; PENNA, V. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, p. 146-154, 2009.

AROURI, A., DATHE, M., BLUME, A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1788 (3) 650-9, 2009.

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

BEGOVIĆ, J., BRANDSMA, J. B., JOVČIĆ, B., TOLINACKI, M., VELJOVIĆ, K., MEIJER, W. C., TOPISIROVIĆ, L. Analysis of dominant lactic acid bacteria from artisanal raw milk cheeses produced on the Mountain Stara Planina, Serbia. **Archives Biological Science Belgrade**, v.63; n.1; p.11-20, 2011.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, Amsterdam: Elsevier Academic Press, ed. 3, v.1, p. 287-317, 2006.

BOWER, C.K., PARKER, J.E., HIGGINS, A.Z., OEST, M.E., WILSON, J.T., VALENTINE, B.A., BOTHWELL, M.K., MCGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**. v. 25, p.81-90, 2002.

BRUNO, L. M. **Microbiota láctica de queijos artesanais** / Laura Maria Bruno, Juliane Döering Gasparin Carvalho – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.

CARRASCO, M.S., SCARINCI, H. E., SIMONETA, A.C. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.15-19, 2002.

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

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O. ELARDI, E. Processamento do queijo de Coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctea endógena. **Ciência e Tecnologia dos alimentos**, Campinas, v.27, n. 1, p. 205-214, 2007.

CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82-100, 2003.

CINTAS, L. et al. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P and novel bacteriocin secreted without in N-terminal extension termed enterocin Q. **Journal Bacteriological**, Oxford, v.182, p 6806 – 6814. 2000.

CITTI, J.E.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. Comparison of slow and fast acid producing *Streptococcus lactis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, n.1, p.14-18, 1965.

CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, LM. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 71, p. 1-20, 2001.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p. 777-788, 2005.

COVENTRY, M.J., GORDON, J. B., WILCOCK, A., HARMARK, K., DAVIDSON, B.E., HICKEY, M.W.; HILLIER, A.J., WAN, J. Detection of bacteriocins on acid lactic bacteria isolated from food and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology**. v.83, p. 248-258, 1997.

DÀVILA, E. ZAMONA, L.M., PLA, M., CARRETERO, C., PARÉS, D. Identification and antagonistic activity of acid lactic bacteria occurring in porcine blood from industrial

slaughterhouses – a preliminary study. **International Journal of Food Microbiology**, 107, 207-211.

DEEGAN, L. C.; COTTER, P. D.; HIL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools preservation and shelf-life extension, **International Dairy Journal**, Alberta, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DE SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Braslian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n. 3, p. 260-266, 2003.

FEITOSA, T., BORGES, M. F., NASSU, R. T., AZEVEDO, E. H. F., MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos alimentos**. Campinas, v. 23, n. 3, p. 162-165, 2005.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados - Aspectos bioquímicos e tecnológicos**, 2º. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 112 p. (Cadernos Didáticos, 43).

FERREIRA, W. L.; FILHO, J.R.F. Avaliação da qualidade físico-química do queijo de Coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agrindustrial**, v. 2, n.1, p. 127-133, 2008.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v.18, n.1, p.25-33, 2001.

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

FRANCIOSI, E.; SETTANI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's Milk. **Internacional Dairy Journal**, v.19, p.3-11, 2009.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Test for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap. 8, p. 271-286.

FRANZ, C. M; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int. Journal Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 2009.

FREITAS, W. C. **Aspectos higiênicos-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica de leite cru, queijo de Coalho e soro de leite produzidos no estado da Paraíba**. 2011. 91p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). João Pessoa: Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.215-222, 2003b.

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

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

GONZÁLEZ, L., SANDOVAL, H., SACRISTÁN, N., CASTRO, J.M., FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**. v. 18, n. 6, p. 716-722, 2006.

GUEDES NETO, L. G., SOUZA, M.R., NUNES, A.C., NICOLE, J.R., SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3<sup>a</sup> ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. V. 1, General Aspects, p. 207-259.

HAIKHANI, R., BEYATLI, Y., ASLIM, B. Antimicrobial activity of Enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**. 60:2, p. 105-108, 2007.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing Microorganisms. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>a</sup> ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 19, p.201-207.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HELANDER, I.M. & SANDHOLM, T.M. Permeability barriers of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, 60 (2-3):153-61, 2000.

HOOVER, D.G., STEENSON, L.R. (1993). Bacteriocins of acid lactic bacteria. **Academic Press**, Ins. San Diego. 274p.

JAY, J. M. **Microbiologia dos alimentos**, Ed. Artmed – Porto Alegre, 2009.

JENNES, W., DICS, L., VERWOERD, D. Enterocin O12, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **Journal Applied Microbiology**, London, v. 88, p.349-357, 2000.

LEITE, M.O., et al. Isolamento e identificação de bactérias lácticas de soro de queijo da região do Serro, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 52, n. 299, p. 3-11, 1997.

LIU, M.; BAYJANOV, J. R.; RENCKENS, B.; NAUTA, A.; SIEZEN, R. J. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **BMC Genomics**. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/36>. Acesso:12:26 p 1-15, 2010.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MACIEL, J.F., CARVALHO E.A., SANTOS, L.S.S., ARAÚJO, J.B., NUNES, V.S. Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga-BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p.443-448, 2008.

MALLESHA; SHYLAJA, R.; SELVAKUMAR, D.; JAGANNATH, J. H. Isolation and identification of acid lactic bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. *Recent Research in Science and Technology*, v. 2 (6), p. 42-46, 2010.

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

MUCCHETTI, G., & E. NEVIANI. 2006. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza. **Tecniche nuove**, Milano, IT.

MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; YAMAZI, A. K.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Food borne pathogens and disease**, v. 6, n. 2, 75 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, 2008.

NASSU, R. T.; ANDRADE, A. A. SILVA, A. C.; SILVA, G. J. F.; FERNANDES, R. L. A. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 351, p. 303-305, 2006.

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

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in raw Milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, 55, 299-305, 2008.

OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Bioversity of latic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 2, p. 267-271, 2005.

OGIER, J. C.; SERROR, P. The *Enterococcus* genus. **Unité des Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA**, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-em-Josas, France. Available 22 Aug. 2007.

OLIVEIRA, J.S.; GARCIA, S. Isolamento e caracterização de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 40, n. 239, p. 19-30, 1986.

PEIXOTO, A. M. S.; PRAÇA, E. F.; GÓIS, V. A. de,. A potencialidade microbiológica de coagulação do Coalho líquido artesanal. *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)*v.2, n.2, p. 52 – 64 Julho/Dezembro de 2007.

PERESI, J. I. M.; GACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. Queijo minas frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica e testes de sensibilidade aos agentes anti-microbianos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

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

PRICHULLA, J.; ZVOBODA, D. A.; PEREIRAS, R. I.; SANTESTEVAN, N. A.; MEDEIROS, A. W. MOTTA, A. S.; ALVESD`AZEVEDO, P.; GIORDANI, A. R. FRAZZON, A. P. G. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 2 , 2013.

RODRÍGUEZ, E., GONZÁLEZ, B., GAYA, P., NUNEZ, M., MEDINA, M. Diversity f bacteriocins produced bay acid lactic bactéria isolated from raw Milk. **International Dairy Journal**. v.10, p.7-15, 2000.

SAVADOGO, A., OUATARA, C.A.T., BASSOLE, I.H.N., TRAORE, A.S. Antimicrobial activities of acid lactic bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.3, n.3, p.174-179, 2004.

SEBRAE. **Queijos Nacionais**: Estudo de mercado SEBRAE/ESPM: Relatório Completo. [S. l.]: SEBRAE/ESPM, 2008. (Série Mercados).

SILVA et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N, F, A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed., São Paulo: Varela, 2001. 317p.

SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristic of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 260-266, 2003.

TAGG, J.R., DAJAMI, A.S., WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TORRI TORELLI, G., CARMINATI, D. GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy esterococci. **Food Microbiology**, v.11, p. 243-252, 1994.

WIRAWAN, R.E., KLESSE,N.A., JAC,R.W., TAGG,J.R. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 77:2. p. 1148-1156, 2006.

# **CAPÍTULO III**

(Artigo a ser submetido à revista *Journal of Dairy Research*)

## BACTÉRIAS AUTÓCTONES DO QUEIJO DE COALHO: FONTE DE MICRO-ORGANISMOS PARA DESENVOLVIMENTO DE FERMENTO LÁTICO

Giselle Maria Pereira Dias<sup>1</sup>, Gileno Vitor Mota Lima<sup>2</sup>, Adriano Barbosa da Silva<sup>3</sup>, Maria Taciana Holanda Cavalcanti<sup>4</sup> e Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco CCB-UFPE;

<sup>2</sup>Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco LABTECBIO-UFRPE; <sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia Industrial – CENAPESQ/ UFRPE;

<sup>4</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

### Resumo

Seleção de bactérias ácido lácticas (BAL) com potencial para a elaboração de um fermento láctico tem despertado interesse por permitir à produção de queijos a partir de leite pasteurizado, sem alterar as características organolépticas desse produto. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial tecnológico de BAL, isoladas de queijos de Coalho produzido artesanalmente a partir de leite cru no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil, que sejam promissoras para a elaboração de um fermento láctico e determinar as características físico-químicas desse queijo. Um total de 76 BAL pertencentes ao gênero *Enterococcus* (29), *Streptococcus* (20), *Lactococcus* (15) e *Leuconostoc* (12), isoladas de queijo de Coalho, foram avaliadas quanto a capacidade de acidificar o Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 10% (p/v) após 6 e 24h de incubação, produzir enzimas extracelulares com atividade proteolítica, produzir aroma a partir do metabolismo do citrato e crescer em presença de 3 e 4% (p/v) NaCl; enquanto que as amostras de queijo foram submetidas as determinações de umidade, teor de cloretos e matéria gorda no extrato seco. De acordo com a capacidade de acidificação das BAL, observamos que os valores de pH foram diretamente proporcional aos obtidos em graus Dornic, uma vez que após 6h de incubação, aproximadamente 53% dos isolados reduziram o pH para 5,3 e obtiveram valores menores ou igual a 40°D, enquanto que após 24h de incubação a maioria dos isolados (84,2%) reduziram o pH para 4,6 enquanto que a de acidificação aumentou para valores entre 40-60°D. A maioria das BAL analisadas (82,9%) foi capaz de produzir enzimas proteolíticas extracelulares com halo variando de 13 a 24,5mm de diâmetro. Dentre os gêneros estudados, o *Leuconostoc* foi o que apresentou maior número de isolados produtores de aroma de intensidade forte (25%) e moderada (75%), enquanto que a maioria das BAL não foi capaz de produzir aroma ou produziu em intensidade fraca. A maioria das BAL analisadas foi capaz de crescer a 3 e 4% de NaCl. Os resultados físico-químicos caracterizaram o queijo de Coalho como de alta umidade (50,6%), gordo (53,6%) e teor de cloreto de 0,92%. Esses resultados confirmam que as BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa podem promover a coagulação do leite e criam um ambiente desfavorável para micro-organismos contaminantes, atuar no desenvolvimento das características organolépticas (sabor e aroma), além de permitir indicar BAL com potencial promissor para a elaboração de fermentos lácticos destinados a elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

**Termos de Indexação:** bactéria ácido láctica, queijo de Coalho artesanal, potencial tecnológico, fermento lácticos.

## 1. Introdução

O queijo de Coalho artesanal é um produto típico do Nordeste do Brasil, destacando-se como o principal produto artesanal incorporado à cultura da região. Sua produção concentra-se nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (ARAÚJO et al., 2012; FERREIRA & FILHO, 2008).

Em Pernambuco está situada a maior rede de fábricas de queijo de Coalho do Nordeste, muitas de origem artesanal, cuja fabricação dos queijos ocorre em pequenas queijarias localizadas em municípios na Região Agreste, onde está situada a bacia leiteira do Estado (QUEIROZ, 2008). Nesses municípios, a produção de queijo adquiri importância fundamental na economia, uma vez que constitui a principal fonte de renda da propriedade familiar e dos fornecedores de leite, especialmente aqueles que não têm acesso a plantas de processamento de leite (SILVA et al., 2012; NASSU et al., 2003).

Embora, em Pernambuco a lei nº 15.192 de 13 de dezembro de 2013 permita a elaboração de queijo de coalho artesanal a partir do leite cru integral fresco, a legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). Isso ocorre devido ao fato de o leite cru ser excelente meio de crescimento para os micro-organismos e poder vir a serem veículos de patógenos, o que tem como consequência direta a restrição da comercialização desse produto ao Estado.

A pasteurização, além de destruir os micro-organismos indesejáveis, também promove a destruição da microbiota láctica natural do leite, a qual é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (BERESFORD et al., 2001).

Queijo de Coalho produzidos a partir de leite cru apresentam sabores mais intensos do que os queijos de leite pasteurizado, devido à presença de micro-organismos próprios do leite com características selvagens da região onde ele é produzido, denominadas bactérias ácido lácticas não iniciadoras (NSLAB). (HOORDE et al., 2010; FRANCIOSI et al., 2009).

Durante a elaboração de queijos, os fermentos ou culturas lácticas desempenham papel importante porque a acidez desenvolvida promove a coagulação do leite e é, usualmente, desfavorável para a multiplicação dos micro-organismos patogênicos (AYAD et al., 2004). Outra propriedade tecnológica importante, das BAL na matriz queijo, está associada à capacidade de produzir proteases extracelulares que além de atuar no fenômeno

de maturação dos queijos é parâmetro fundamental para a ecologia microbiana do produto (EL-GAISH et al., 2010; SETTANNI & MOSCHETTI, 2010).

A capacidade de produzir diacetil e acetoína, compostos responsáveis pelo desenvolvimento de aroma e sabor de queijos poucos ou não curados a partir do metabolismo do citrato, é outra propriedade tecnológica importante desse grupo de micro-organismo (HASSAN & FRANK, 2001; FOX et al., 2000).

Devido as suas propriedades metabólicas, as BAL são amplamente empregadas na tecnologia de alimentos por contribuição no aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica em alimentos fermentados (SETTANNI & CORSETTI, 2008). Por isso a busca por culturas lácticas não iniciadoras (NSLAB) com novas propriedades funcionais para uso na indústria leiteira que quando adicionada como fermentos em leite pasteurizado devolva a qualidade sensorial típica do queijo de Coalho fabricado com leite cru tem sido intensificada (HOORDE et al., 2010; FRANCIOSI, 2009).

A seleção de BAL autóctones do queijo de Coalho de Pernambuco e sua possível utilização como fermentos lácteos em queijos produzidos com leite pasteurizado podem contribuir para a caracterização da identidade e qualidade desse produto em Pernambuco, assim como permitir sua comercialização em outros estados. Sabe-se que vários queijos artesanais têm sido premiados com o selo PDO (*Protected Designation of Origin*) e são considerados como marcadores culturais da sociedade, como produtos de arte, de acordo com o Regulamento 510/06 da União Européia (RANDAZZO, CAGGIA & NEVIANI, 2009; RENNA et al., 2009; FONTAN et al., 2001). A denominação de queijo PDO assume que existe esta relação entre a área de origem, as técnicas tradicionais de processamento e os micro-organismos nativos presentes nas características específicas do produto final (RANDAZZO, CAGGIA & NEVIANI, 2009).

A seleção de um fermento láctico para a produção de queijos pode ser realizada através da avaliação de propriedades tecnológicas de BAL como produção de ácido láctico, produção de sabor e aroma desejáveis durante a cura, tolerância ao sal, produção de bacteriocinas, sensibilidade ao aquecimento (AYAD et al., 2004).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tecnológico das BAL isoladas do queijo de Coalho produzidos artesanalmente no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil que sejam promissoras para a elaboração de um fermento láctico.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Obtenção e manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas (BAL)**

Um total de 76 bactérias ácido lácticas (BAL) autóctones isoladas de queijos de Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco - Brasil, pertencentes aos gêneros *Enterococcus* (29), *Streptococcus* (20), *Lactococcus* (15) e *Leuconostoc* (12) e classificadas como rápidas produtoras de ácido devido a sua capacidade de coagular o Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 12% em até 18h de incubação (CITTI, SANDINE & ELIKER, 1965) foram selecionadas para o estudo de seu potencial tecnológico.

Antes da avaliação do potencial tecnológico, as BAL mantidas congelados em LDR (Leite Desnatado Reconstituído) (MOLICO NESTLÉ<sup>®</sup>) 12% (p/v), suplementado com glicerol 15% esterilizado (FMAIA<sup>®</sup>) (v/v) à temperatura de -80°C foram reativadas duas vezes em caldo LDR 12% e incubadas a 30±1°C (82,8%) ou 37±1°C (20,6%) de acordo com a temperatura de isolamento, por 72 e 24 horas, com exceção aos testes de atividade proteolítica, onde a primeira reativação foi realizada em caldo LDR 12%, e a segunda em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) suplementado com 0,5% de glicose, incubados nas mesmas condições acima citada.

### **2.2 Potencial tecnológico de BAL**

A avaliação do potencial tecnológico foi realizada com o objetivo de verificar se as BAL selvagens do queijo de Coalho de Venturosa são promissoras para a elaboração de um fermento láctico.

As propriedades tecnológicas avaliadas foram capacidade de acidificação, determinadas pelo pH e acidez titulável, atividade proteolítica extracelular qualitativa, produção do composto diacetil e tolerância ao Cloreto de Sódio (NaCl) nas concentrações de 3 e 4% (p/v).

#### **2.2.1 Avaliação da capacidade acidificante**

A habilidade das culturas lácticas em produzir ácido láctico foi realizada através da aferição do pH e da acidez titulável. A taxa de acidificação foi calculada segundo a metodologia de Kihal et al. (1996) e o resultados foram expressos em Graus Dornic (°D).

Um por cento das culturas lácticas ativadas foi inoculada em tubos contendo 10 mL de LDR (10%) com pH inicial de 6,5 e incubados a 30 ou  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , de acordo com a temperatura de isolamento, por 6 e 24 h. O controle do experimento foi realizado pela incubação de 10 mL de LDR (10%) com pH inicial de 6,5 sem inóculo. Todo o experimento foi realizado em duplicata (ESTEPAR et al., 1999).

Para uma cultura láctica ser considerada rápida produtora de ácido, ela deve reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h de incubação à temperatura adequada (COGAN et al. 1997).

De acordo com a velocidade de acidificação, as estirpes capazes de reduzir o pH do leite em 1,2U foram classificadas como de rápida acidificação e selecionadas como BAL iniciadoras ou starters, enquanto que as de lenta acidificação, foram selecionadas como culturas secundárias ou adjuntas (SETTANNI & MOSCHETTI, 2010).

### **2.2.2 Determinação da atividade proteolítica**

A determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa foi realizada segundo metodologia de Pailin et al. (2001), modificada pelo uso da técnica de Disco Difusão.

Para essa atividade, três discos de papel de filtro da marca Whatman n°1 de 6 mm foram dispostos em posições equidistantes na superfície do leite desnatado Ágar contidos em placa de Petri. Em dois discos foram adicionados 5 $\mu\text{L}$  de uma cultura de BAL previamente reativada, com exceção ao disco referente ao controle negativo no qual foi adicionado 5 $\mu\text{L}$  MRS acrescido de 5% de glicose sem micro-organismo. As placas foram incubadas a 30 e  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas, seguido de refrigeração a  $10\pm 1^{\circ}\text{C}$  por mais 72h.

A capacidade de produção de proteases extracelulares foi verificada pela presença de halos proteolíticos ao redor do disco de papel de filtro. A medição dos halos foi realizada em milímetros com auxílio de paquímetro.

### **2.2.3 Avaliação da capacidade de produção de aroma**

O diacetil é um composto aromatizante, gerado como um produto final do metabolismo do citrato por determinadas BAL. A avaliação da capacidade de produção de diacetil foi realizada segundo metodologia de Furtado (1990), modificada quanto ao tempo de agitação que foi de 5 minutos. Esta metodologia consiste em adicionar a 2,5mL da

cultura previamente ativada, 1mL de solução de creatina 1% (MERK®) e 2,5ml de solução de NaOH 10N, seguidos de agitação em vortex por 5 minutos. A produção de diacetil e acetil metil carbinol é indicado pelo aparecimento de coloração rósea que foi classificada de acordo com a intensidade da cor desenvolvida como fraca, moderada, forte e ausente.

#### **2.2.4 Tolerância ao NaCl**

A capacidade das BAL tolerarem altas concentrações de sal é um parâmetro tecnológico importante, uma vez que o metabolismo desses micro-organismos pode ser comprometido durante a salga, etapa do processo de fabricação do queijo de Coalho.

A tolerância das culturas lácticas ao cloreto de sódio foi avaliada com base nos testes crescimento em caldo TSB, suplementado com NaCl a 3 e 4% (p/v) (Vetec Química Fina Ltda, Brasil) seguidos de incubação a 30 ou 37±1°C, por 48h (HARRIGAN, 1998).

As concentrações de NaCl utilizadas nestes testes, foram escolhidas com base nas concentração estabelecida pela resolução SSPRA n° 002 de 19 de abril de 1999, que prevê uma concentração máxima de cloretos de sódio em queijos de Coalho produzidos em estabelecimentos artesanais em Pernambuco de até 3%.

#### **2.2.5 Avaliação da patogenicidade dos *Enterococcus***

O potencial patogênico dos *Enterococcus* foi avaliado através dos testes de atividade de hemolisinas de acordo com a metodologia descrita por Asteri et al. (2009) com modificação do meio de cultura utilizado e de produção de gelatinase determinada pela metodologia de Terzic-Vidojevic et al. (2009).

A atividade hemolítica foi avaliada através do estriamento, em triplicata, das culturas em meio ágar-sangue, preparado a partir de ágar BHI – *brain heart infusion* (ACUMIDIA®) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, seguido de incubação por 48h a 37±1°C. A atividade das hemolisinas foi verificada pela formação de halos de hemólise ao redor das estrias.

A produção de gelatinase foi avaliada através do estriamento, em triplicata, das culturas em meio ágar gelatina, seguido de incubação por 48h a 37±1°C. A produção de gelatinase foi revelada pelo aparecimento de halo transparente após adição de 500 mL de solução saturada de sulfato de amônio (MERK®).

## **2.3 Caracterização físico-química do queijo de Coalho**

As amostras de queijo de Coalho utilizadas para isolar as BAL desse estudo, foram submetidas à caracterização de suas propriedades físico-químicas. Após etapas de trituração e homogeneização, as amostras de queijo de Coalho foram submetidas às determinações de Umidade (método B), Teor de Cloretos (Método B – Argentométrico) e Matéria Gorda no Extrato Seco (método H – Butirométrico) realizadas, em duplicata, no Laboratório de análise físico-química de Alimentos do Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco (LANAGRO-PE).

Os parâmetros físico-químicos estudados foram analisados de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006 – MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996) e Regulamento técnico Geral de Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos – Portaria nº 146/96 – MAPA (BRASIL, 1996).

## **2.4 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos da avaliação da capacidade de acidificação através do pH e da atividade proteolítica foram comparadas através do software Assistat utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1 Avaliação da capacidade acidificante**

Os resultados obtidos para a capacidade de acidificação, através da aferição do pH após período de incubação de 6 e 24h, podem ser observados na Tabela 01.

**Tabela 01** – Valores médios de pH dos diferentes gêneros de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho artesanal em leite Desnatado Reconstituído a 10% após 6h e 24 h de incubação.

Gênero (Qtd.)	pH 0h	pH ≤ 5,3 em 6h		pH ≤ 4,6 em 24h	
		N*(%)	Média do pH**	N* (%)	Média do pH**
<i>Enterococcus</i> (29)	6,50	14 (48,27)	5,36 (±0,60) <sup>Aa</sup>	23 (79,31)	4,33 (±0,30) <sup>bA</sup>
<i>Streptococcus</i> (20)	6,50	8 (40,00)	5,36 (±0,58) <sup>Aa</sup>	17 (85,00)	4,43 (±0,34) <sup>bA</sup>
<i>Lactococcus</i> (15)	6,50	10 (66,67)	5,23 (±0,53) <sup>Aa</sup>	14 (93,33)	4,36 (±0,23) <sup>bA</sup>
<i>Leuconostoc</i> (12)	6,50	8 (66,67)	5,20 (±0,56) <sup>Aa</sup>	10 (83,33)	4,43 (±0,35) <sup>bA</sup>
Total (76)		40 (52,63)	5,28	64 (84,21)	4,38
CV % = 4,34					

\* Número de isolados; (%) valores dos números de isolados em percentagem. \*\*Resultados apresentados como média aritmética; (Desvio Padrão); Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam linhas e as letras minúsculas comparam colunas; CV% = Coeficiente de variação em percentagem.

Das 76 culturas avaliadas, 40 (52,6%) foram consideradas rápidas produtoras de ácido, pela capacidade de reduzir o pH do leite para valor igual ou menor que 5,3 após 6 h de incubação. Deste total, 12 (30,0%) isolados foram capazes de reduzir o pH do leite a valores igual ou menor que 4,6 promovendo a coagulação do leite. Segundo Congan et al. (1997) esta é uma característica atribuída a BAL iniciadoras.

De acordo com os resultados apresentados, 53% das BAL dos queijos de Coalho de Venturosa são culturas iniciadoras (starters) e podem ser utilizadas na produção de alimentos derivados de leite, pois sua capacidade acidificante é essencial para promover a coagulação do leite, criar um ambiente desfavorável para muitos micro-organismos contaminantes e promover a segurança microbiológica desse produto (AYAD et al., 2004; DURLU-OZKAYA et al., 2001; FOX et al., 2000).

O grupo de BAL que alcançaram pH igual ou menor a 4,6 em 6h de incubação, além dos atributos acima mencionado, podem ser utilizados para garantir uma maior conservação de produtos lácticos fermentados (FOX et al., 2000) como para contribuir nas características organolépticas dos mesmos (CARR et al., 2000).

As demais BAL que não foram capazes de reduzir o pH do leite para 5,3 em até 6 horas de incubação, foram consideradas de lenta acidificação e podem ser usadas como culturas secundárias ou adjuntas. Essas BAL geralmente estão envolvidas com as características sensoriais (sabor e aroma) e podem ser utilizadas para equilibrar o teor de umidade do queijo, já que as de rápida acidificação podem alterar essa característica (CROW et al., 2001; BERESFORD et al., 2001).

De acordo com os valores médios de pH obtidos não foi observado diferença significativa entre os gêneros estudados a 6 e 24h de incubação. Todavia, a acidificação foi superior diferindo significativamente em 24h (Tabela 01).

A maior percentagem de isolados com capacidade de reduzir o pH do leite para 5,3 após 6h de incubação, foi encontrado para os representantes do gênero *Leuconostoc* e *Lactococcus* (66,7%), seguidos dos gêneros *Enterococcus* (44,2%) e *Streptococcus* (40,0%), enquanto que o gênero que apresentou maior número de isolados com capacidade de reduzir o pH do leite para 4,6 após 6 horas de incubação, foi representado pelos *Enterococcus* (35,7%). Após 24h de incubação, 84,2% das culturas alcançaram o pH a valores igual ou menor que 4,6.

Apesar de Hassan & Frank (2001) relatarem que o gênero *Leuconostoc* apresenta pequena capacidade acidificante, neste trabalho esse grupo foi o que apresentou maior número de representantes (66,7%) capazes de reduzir o pH do leite para 5,3 após 6 h de incubação.

Os *Lactococcus* isolados do queijo de Venturosa apresentaram mesmo número de isolados (66,7%) que os *Leuconostoc*, com capacidade de reduzir o pH do leite para 5,3 após 6 horas de incubação. Nossos resultados corroboram com os obtidos por Ballesteros et al. (2006) que apontaram os *Lactococcus* isolados de queijos Manchego tipo artesanal e industrial como os micro-organismos com maior capacidade de acidificação.

O maior número de isolados com capacidade de acidificar o leite para valores de pH igual ou menor a 4,6 após 24 h de incubação, foi obtido pelos representantes do gênero *Lactococcus* (93,3%) e *Streptococcus* (85,0%) (Tabela 01). Esses resultados não corroborando com os apresentados por Suzzi et al. (2000) que observaram que *E. faecalis* isolados de queijos artesanais italianos foram os com maior capacidade de reduzir o pH do leite desnatado para 4,5 após 24h de fermentação.

Segundo Teuber (1995), os *Lactococcus* apresentam elevada capacidade de produção de ácido levando cerca de 10-20 h para fermentar o leite cru, e, portanto, são os micro-organismos mais usados nas fermentações lácteas. Assim como, os *S. thermophilus* que são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido lático, causando uma rápida diminuição do pH (DELORME, 2008).

A capacidade de acidificação das BAL também foi determinada através do método titulométrico, cujos resultados expressos em Graus Dornic (°D) podem ser observados na Tabela 02.

**Tabela 02** – Capacidade acidificante em Graus Dornic (°D) dos diferentes gêneros de bactérias ácido lácticas, isolados do queijo de Coalho artesanal em leite Desnatado Reconstituído a 10% após 6h e 24 h de incubação.

Gênero	N* (%)	Acidificação °D/ 6h			Acidificação °D/ 24h		
		≤ 40°D	40-60°D	≥ 60°D	≤ 40°D	40-60°D	≥ 60°D
<i>Enterococcus</i>	29 (38,1)	17 (58,6)	11 (37,9)	1 (3,4)	0 (0,0)	24 (82,7)	5 (17,2)
<i>Streptococcus</i>	20 (26,3)	15 (75,0)	5 (25,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	16 (80,0)	3 (15,0)
<i>Lactococcus</i>	15 (19,7)	6 (40,0)	9 (60,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (80,0)	3 (20,0)
<i>Leuconostoc</i>	12 (15,7)	5 (41,6)	7 (58,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (75,0)	1 (8,3)
Total	76 (100,0)	43 (56,5)	32 (42,1)	1 (1,3)	1 (1,3)	61(80,2)	12 (15,7)

\*Números de isolados; (%) valores dos números de isolados em percentagem.

De acordo com a capacidade de acidificação das BAL, observamos que os valores de pH obtidos (Tabela 01) foram diretamente proporcional aos obtidos em graus Dornic (Tabela 02), uma vez que após 6h de incubação, aproximadamente 53% dos isolados reduziram o pH para 5,3 e obtiveram valores menores ou igual a 40°D, enquanto que após 24h de incubação a maioria dos isolados (84,2%) reduziram o pH para 4,6 enquanto que a de acidificação aumentou para valores entre 40-60°D.

Dentre os gêneros estudados, *Streptococcus* e *Enterococcus* foram os que apresentaram maior número de isolados com capacidade de acidificação o leite a valores igual ou menor que 40°D, enquanto que os *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram os que apresentaram maior número de isolados com atividade acidificante entre 40 e 60°D.

Esses resultados diferem dos obtidos por Badis et al. (2004) ao estudarem a capacidade de acidificação das BAL isoladas de leite de cabra cru de 4 raças da Algeria. Estes autores obtiveram, valores maiores que 56°D e 60°D para *Streptococcus thermophilus* 16TMC, após 6 e 24h de incubação, respectivamente.

Após 24h de incubação, a maioria (80,2%) manteve valores de acidificação entre 40 e 60°D e apenas 15,7% dos isolados apresentaram intensidade de acidificação acima de 60°D. Esses resultados sugerem que a intensidade de produção de ácido pela BAL do queijo de Coalho de Venturosa é em sua maioria fraco ou moderado cujos resultados variaram entre 15 a 72°D.

Dentre os gêneros estudados, os *Enterococcus* foi o que apresentou maior número de isolados com acidificação entre 40 e 60°D após 24 horas de incubação. Segundo Durlu-Okaya (2001), os *Enterococcus*, isolados de amostras clínicas quando inoculados em leite apresentam baixa capacidade de acidificação quando comparados com outros gêneros lácticos, assim isolados de fontes alimentares apresentam melhores características tecnológicas e menos fatores de virulência o que pode explicar os resultados obtidos nesse trabalho (GIRAFFA, 1997; SARANTINOPOULOUS et al., 2001).

Valores de acidificação maior ou igual a 60°D, após 6 horas de incubação foi observado apenas para os isolados do gênero *Enterococcus* (3,4%), enquanto que após 24 horas, o gênero com maior número de isolados com essa capacidade foi o *Lactococcus* (20,0%), seguidos dos *Enterococcus* (17,2%), *Streptococcus* (15,0%) e *Leuconostoc* (8,3%).

A baixa incidência de isolados com capacidade de acidificar o LDR 10% a valores igual ou maior que 60°D pode ser explicado por Hutkins & Nannen (1993), que afirmam que as BAL crescem mais devagar sob pH ácido, pois a acidez elevada do meio provoca danos celulares e diminui a sua viabilidade durante a estocagem do produto. Ainda de acordo com Thamer & Penna (2005) produtos com elevada acidez (iogurtes) conduzem a maior perda da variabilidade celular das bactérias relacionadas do que os produtos com baixa acidez (queijos).

As BAL isolados do queijo de Coalho de Venturosa foram capazes de produzir ácido láctico de intensidade variada após 6 e 24h de incubação. A intensidade da produção variou em função do tempo de incubação, variou entre os diferentes gêneros e entre os isolados de um mesmo gênero (Tabela 02). Segundo Durlu-Okaya (2001) dentro de um mesmo gênero pode haver cepas com diferentes comportamentos quanto a esta característica. Os diferentes valores da acidez observados entre as espécies, ainda pode ser explicados por De Roissart (1986), o qual afirma que a capacidade acidificante de cada cepa, está relacionada à sua capacidade de degradar os compostos do meio, para torná-los

assimilável e permitir o transporte desses elementos nutritivos para o citoplasma (ALBENZINO et al., 2001).

### 3.2 Avaliação da atividade proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica qualitativa das BAL crescidas em Agar leite desnatado está apresentada na Tabela 03.

**Tabela 03** – Atividade proteolítica qualitativa, em Agar leite desnatado de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Município de Venturosa – PE.

Gênero (Qtd.)	N* (%)	Atividade Proteolítica	
		Faixa de diâmetro dos halos (mm)**	Média dos isolados***
<i>Enterococcus</i> (29)	22 (75,8)	13,3 - 24,0	15,83 ( $\pm 3,2$ ) <sup>b</sup>
<i>Streptococcus</i> (20)	19 (95,0)	13,0 - 24,5	17,16 ( $\pm 3,6$ ) <sup>b</sup>
<i>Lactococcus</i> (15)	13 (86,6)	15,0 - 20,5	18,13 ( $\pm 1,6$ ) <sup>ab</sup>
<i>Leuconostoc</i> (12)	9 (75,0)	15,0 - 24,5	20,50 ( $\pm 3,6$ ) <sup>a</sup>
CV % = 5,80			

\*Número de isolados; (%) valores dos números de isolados em percentagem; \*\* Faixa mínima e máxima do diâmetro dos halos (mm) obtidos após medição; \*\*\*Resultados apresentados como média aritmética ( $\pm$ Desvio Padrão); <sup>a,b</sup> Valores médios seguidos de letras distintas em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Dos 76 isolados avaliados, um total de 63 (82,9%) apresentou atividade proteolítica com halo variando de 13 a 24,5mm de diâmetro. Estes resultados demonstram que as BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa são produtoras de enzimas proteolíticas extracelulares, um parâmetro que contribui para o desenvolvimento das características organolépticas dos queijos.

A capacidade de produzir proteases extracelulares é uma característica importante de BAL (EL-GAISH et al., 2010). Estas proteases catalisam a hidrólise das proteínas do leite (caseína), fornecendo os aminoácidos essenciais para o seu crescimento (FIRA et al., 2001) além de permitir a liberação de peptídeos curtos e aminoácidos livres (FORSYTHE, 2002; MOULAY et al., 2006) que promovem uma rápida acidificação do meio durante a fermentação (GOBBETTI, 1998).

Dentre os isolados analisados, os gêneros que apresentaram maior número de representantes com capacidade de produzir enzimas proteolíticas foram os *Streptococcus* (95%), seguidos dos *Lactococcus* (86,6%), *Enterococcus* (75,8%) e *Leuconostoc* (75%).

Contudo, de acordo com os valores médios obtidos da atividade proteolítica, os representantes do gênero *Leuconostoc* foram estatisticamente superiores aos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* diferindo significativamente desses (Tabela 03).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com os observados por Begovic et al. (2011) que analisou a atividade proteolítica de 262 BAL isoladas de queijos artesanal produzidos com leite fresco e obteve uma percentagem de 71,75% dos isolados produtores de atividade proteolítica. Contudo, não corroboram com os observados por Franciosi et al. (2009) ao estudar a atividade proteolítica de 63 BAL isoladas de leite de vaca fresco, obteve um percentual de apenas 12,6% das amostras com essa atividade, sendo o gênero *Enterococcus* o grupo com maior número de representantes (2 cepas de *E. faecalis* e 2 de *E. durans*), seguido dos *Streptococcus* (3 cepas *St. thermophilus*) e apenas uma de *Lc. lactis subsp. lactis*.

Apesar de Hassan & Frank (2001) relatarem que os *Streptococcus thermophilus* possuam atividade proteolítica limitada, neste trabalho o gênero, *Streptococcus* foi o que obteve maior número de representantes com atividade proteolítica, e juntamente com o gênero *Enterococcus* foram os que obtiveram a maior variação no diâmetro dos halos. Segundo Scheinbach (1998) e Arunachalam (1999) o uso de *Streptococcus thermophilus* em produtos fermentados melhora a sua atividade proteolítica o que pode ter influenciado na obtenção dos resultados apresentados.

Os resultados da variação do diâmetro dos halos observados para o gênero *Enterococcus* já era esperado, pois segundo Centeno et al. (1996) e Giraffa (2003), esse gênero demonstram maior atividade proteolítica do que outras bactérias, sendo consideradas importantes na maturação de queijos. Contudo seu efeito benéfico não se restringe apenas a isso, deve-se também a reações bioquímicas que realizam durante a cura (proteólise, lipólise, utilização de citrato) que são responsáveis pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos.

Já de acordo com Hassan & Frank (2001) e Liu et al. (2010) a pequena habilidade acidificante e proteolítica, do gênero *Leuconostoc* pode ser explicada pelo fato do genoma deste micro-organismo codificar poucas enzimas proteolíticas, sendo que, linhagens desta espécie podem ou não expressar proteases extracelulares, dependendo do isolado. Neste trabalho, percentagem acima de 70% dos isolados foi capaz de produzir essas enzimas proteolíticas o que pode sugerir que essas bactérias expressem esses genes.

O sistema proteolítico de BAL tem sido descrito em detalhe para vários isolados de origem leiteira como também de outros produtos de origem alimentar (GOBBETTI et al., 1996a,b) tais como pão (ZOTTA, RICCIARDI & PARENTE, 2007), salames artesanais (CARPINÉ et al., 2010) e grãos de Kefir (KABADJOVA-HRISTOVA et al., 2006). Além da capacidade de produzir enzimas proteolíticas, as BAL também são capazes de produzir grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas que, juntamente com as enzimas proteolíticas, transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009).

Certas bactérias lácticas denominadas iniciadoras – BLI possuem atividade proteolítica importantíssima na maturação de queijos, pois são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico e suas enzimas contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto (BERESFORD et al., 2001).

As BLI podem ser adicionadas no início da produção ou não. Neste último caso, utilizam-se somente aquelas bactérias que já ocorrem naturalmente no leite sendo este processo normalmente utilizado na fabricação de queijos artesanais a partir de leite não pasteurizado (BERESFORD et al., 2001).

Uma proteólise muito intensa provoca alterações no aroma, sabor e características físico-químicas do leite e derivados tais como acidez excessiva, sabor amargo do queijo devido à produção de peptídeos e aminoácidos livres, provenientes da degradação da caseína (COUSIN, 1982; FOX et al., 2000; SOUZA et al., 2001; ANTUNES, 2006).

### **3.3 Avaliação da capacidade de produção de aroma**

Dos 76 isolados, 50 (65,7%) foram produtores de diacetil. A produção de diacetil é uma característica importante para uma cultura adjunta, uma vez que este composto participa no aroma de muitos produtos lácteos (MAYO et al., 2010).

Dentre os produtores de diacetil, 72% foram classificadas como produtoras de intensidade franca, 20% de intensidade moderada e apenas 8% de intensidade forte. A variação na produção do diacetil entre isolados do mesmo gênero demonstram a diversa capacidade das BAL em produzirem esse composto, havendo micro-organismos de uma mesma população que contribuem mais do que outros, para a formação do *flavour* (FRANCIOSI et al., 2009).

A intensidade da produção ainda variou entre representantes de um mesmo gênero (Tabela 04).

**Tabela 04.** Produção de aroma pelas Bactérias Ácido Láticas isoladas do queijo de Coalho produzidos no Município Venturosa, Região Agreste do Estado de Pernambuco – Brasil.

Produção de Aroma	<i>Enterococcus</i> * (29 amostras)	<i>Streptococcus</i> * (20 amostras)	<i>Lactococcus</i> * (15 amostras)	<i>Leuconostoc</i> * (12 amostras)
Forte	1	0	1	2
Moderado	1	1	2	6
Fraco	16	15	5	0
Ausente	11	4	7	4

\*Resultados são expressos como o número de amostras.

Quanto à intensidade de produção do diacetil, o gênero *Leuconostoc* foi o que apresentou maior número de isolados produtores de diacetil de intensidade forte (25%) e moderada (75%). Enquanto que o gênero *Enterococcus* foi o que apresentou maior número de isolados produtores de diacetil de intensidade fraca (93,7%), seguidos dos *Streptococcus* (88,9%) e *Lactococcus* (62,5%).

A produção do diacetil pelos representantes do gênero *Leuconostoc* foi esperado, uma vez que este gênero é referido na literatura pela capacidade de produzir diacetil, CO<sub>2</sub> e acetoína a partir do metabolismo do citrato, e dessa forma contribui no desenvolvimento de aroma e sabor de queijos pouco ou não curados (FOX et al., 2000). Esses micro-organismos também participam da qualidade desse alimento, sendo responsáveis pelas características organolépticas assim como consistência, textura e formação de olhaduras em queijos (DELLAGLIO; DICKS; TORRIANI, 1995).

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Franciosi et al. (2009), ao estudar o potencial biotecnológico de BAL selvagens isoladas de leite de vaca cru, os mesmos obtiveram de um total de 63 isolados, 48 (76,1%) BAL produtoras de diacetil. Contudo, não corroboram com esses mesmos autores, quando afirmam que 50% dos representantes do gênero *Streptococcus* foram produtores de diacetil de intensidade forte.

Por outro lado, nossos resultados não corroboram com os observados por Alonso-Calleja et al. (2002), que verificaram uma percentagem de 31% dos *Lactococcus* isolados a partir de leite de cabra e de queijo Valdeteja como fortes produtores de diacetil.

Os *Lactococcus* produtores de aroma nesse presente trabalho, provavelmente são a variante *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, pois esses micro-organismos são referido pela literatura pela sua capacidade de converter o citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijo (HASSAN & FRANK, 2001). O aumento da eficiência de conversão de açúcares em diacetil pode ser promovido por meio de alterações na “engenharia” dos *Lactococcus lactis* com a combinação ao máximo de NADH-oxidase e inativação de  $\alpha$ -acetolase descarboxilase (HUGENHOLTZ et al., 2000).

A interação entre os gêneros de BAL tem contribuído na qualidade organoléptica de numerosos produtos lácteos, tais como queijos e leites fermentados, além de esta associada a uma grande variedade de sabores, aromas e texturas (OGIER *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de aroma e sabor em queijos é um processo bioquímico dinâmico e complexo que é influenciado primeiro pela composição do leite, segundo, pelas condições de processamento e terceiro pelos micro-organismos e suas enzimas presentes na matriz queijo (STEELE et al., 2013).

### **3.4 Tolerância ao sal**

Mais de 90% das BAL isoladas do queijo de Coalho de Venturosa foram capazes de tolerar e crescer em presença de NaCl nas concentrações de 3 e 4% de cloreto de Sódio. Esta é uma característica importante, visto que culturas iniciadoras ou adjuntas selecionadas para a produção do queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado devem estar adaptadas às condições ambientais relacionadas ao processamento do queijo, tais como a salga.

As concentrações de cloretos utilizadas neste trabalho foram às mesmas utilizadas por Carvalho, 2007 para caracterizar a microbiota láctica isolada do queijo de Coalho artesanal produzidos no Estado do Ceará, onde 98 e 87% delas suportaram 3 e 4% de NaCl, respectivamente.

A tolerância dos representantes do gênero *Streptococcus* e *Leuconostoc* foi um resultado esperado, pois de acordo com a literatura, os primeiros são capazes de suportar uma concentração máxima de sal de até 2,5% (FOX et al., 2000), enquanto que os segundos fazem parte da microbiota bacteriana intrínseca da carne de charque (PARDI, 1996) e por isso toleram altas concentrações.

Concentrações de sal de 2 e 4% é um parâmetro utilizado na distinção de *Lactococcus lactis subsp. lactis* de *Lactococcus lactis subsp. cremoris* devido a incapacidade deste último em crescer a 4% NaCl o que pode sugerir que 14 das 15 amostras de *Lactococcus* spp. estudados são *Lc. lactis subsp. lactis* (FOX et al., 2000).

### **3.5 Avaliação da patogenicidade do gênero *Enterococcus***

A maioria dos *Enterococcus* (79,3%) avaliados nesse estudo pode ser utilizada na composição de fermentos alimentares por não possuírem potencial de patogenicidade relacionadas com a presença de hemolisinas e de gelatinases.

### **3.6 Caracterização físico-química do queijo de Coalho**

As amostras de queijo de Coalho foram avaliadas no momento da manipulação e definidas como queijo de casca fina, de consistência semidura e cor branca uniforme. A presença de olhaduras foi verificada em todas as amostras analisadas, no entanto em pequenas proporções como permite a legislação pertinente. Ambas as amostras de queijo continha embalagens com ausência de soro, mas apenas uma apresentava rótulo.

As amostras de queijo de Coalho analisadas foram classificadas como de alta umidade (51,59%) e alto teor de matéria gorda no extrato seco (53,69%). Esses resultados estão de acordo com os padrões estabelecidos na legislação brasileira onde o queijo de Coalho é um produto classificado como de médio (36,0 – 45,9%) a alto teor de umidade (46,0 – 54,9%), semigordo (25,0 – 44,9%) ou gordo (45,0 – 59,9%) (Brasil, 2001).

Sena et al. (2000) analisando amostras de queijo de Coalho comercializados em Recife, concluíram que 81,6% das amostras analisadas eram queijos semigordos e 18,57% eram queijos magros diferindo dos resultados encontrados nesse trabalho. Porém corroboram com o mesmo autor em relação a parâmetro umidade (%), com 54,29% das amostras caracterizadas como queijos de alta umidade. Do restante, 1,43% das amostras foram consideradas como de baixa umidade, 40% como de média umidade, e 4,29% como de muito alta umidade.

Em relação à matéria gorda, nossos resultados não corroboram com os encontrados por Filho et al. (2012), quando analisaram queijos de Coalho artesanais produzidos na cidade de Calçados-Pernambuco, esses autores constataram que das 10 amostras de queijo estudadas 50% foram consideradas como queijos de Coalho semigordo e 50% foram

classificados como magros. Contudo, corrobora com os resultados obtidos para o teor médio de cloreto de sódio, os quais encontraram, em todas as amostras de queijo analisadas, uma concentração de sal abaixo de 2% o que pode tornar esse alimento susceptível à contaminação.

As diferenças de umidade e gordura em queijo de Coalho, observados em nossos resultados e nos resultados dos autores citados, podem ser explicadas por Nassu et al. (2001), que constataram que tais variações deve-se a matéria-prima utilizada e ao processamento do queijo em si. A formação e o manuseio da coalhada afeta a habilidade de reter gordura e umidade, que acaba por influenciar na sua composição centesimal. Outra etapa que pode influenciar os teores de umidade e gordura é o tempo de prensagem, que segundo estes autores diferem muito entre produtores.

O teor médio de cloreto de sódio verificado para as amostras de queijo de Coalho Artesanal de Venturosa foi de 0,92%. Segundo Guinee & Fox (2004), conteúdo de sal em queijos varia de aproximadamente 0,7% para o Emmental a 6,0% para o Domiati.

Em queijos de Coalho, a quantidade de sal usada para o tipo comum é 0,8-1,0% e para o queijo no espeto ou palito é 1,2% (CAVALCANTE et al., 2007). Entretanto, o teor de sal de amostras de queijo de Coalho não é padronizado e varia de acordo com o estado em que está sendo produzido. No Ceará, queijos de Coalho apresentam altos teores de sal com valor médio de 3,29% de NaCl (ARAÚJO & NASSU, 2002), no Rio Grande do Norte o conteúdo médio de NaCl do queijo de Coalho é de 2,51% (NASSU et al., 2006) e no Sertão alagoano queijo de Coalho produzidas a partir de leite cru e pasteurizado apresentou conteúdo médio de 4,5% de NaCl (SILVA et al., 2010).

A concentração de sal é um fator que exerce grande influência na qualidade do queijo, pois desempenha funções como preservação do alimento, por atuar reduzindo a atividade de água, que tem e como consequência direta inibição do crescimento microbiano, além da diminuir da umidade podendo também retardar a maturação e a atividade excessiva de enzimas, que podem afetar o sabor e a textura dos queijos (GUINEE & FOX, 2004).

Na relação entre o teor de sal e as BAL, baixos níveis de NaCl estimulam o crescimento das espécies de *Lactococcus*, porém concentrações acima de 5% inibem fortemente os micro-organismos desse gênero. A maioria das BAL associadas à fermentação pode crescer a 6%, mas não a 8% (FOX et al., 2000).

#### 4. Conclusão

A presença de BAL iniciadoras e secundárias que apresentam capacidade de produzir enzimas proteolíticas extracelulares, aroma de intensidade fraca, moderada e forte e alta tolerância ao sal, podem ser utilizados como critérios para seleção de culturas com potencial promissor para a elaboração de fermentos lácticos destinados a elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado. A manutenção da biodiversidade microbiana desses queijos deve ser considerada como valor fundamental na manutenção de características organolépticas típicas de sabor e aroma do produto.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Apoio a Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco.

#### 6. Referências Bibliográficas

ALBENZINO, M., CORBO, M.R., REHMAN, S.U., FOX, P.F., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A., SEVI, A., GOBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Cane Strato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology** 67, 35–48, 2001.

ALONSO-CALLEJA, C.; CARBALLO, J.; CAPITA, R.; BERNARDO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M. Comparason of the acidifying activity *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strains isolated from goat`s milk and Valdeteja cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 134-138, 2002.

ANTUNES, L. A. F. *et al.* Resfriamento do leite e suas conseqüências na produção de lácteos. **Ha-La Biotec: Chr Hansen**. Valinhos, n. 95, p. 2-3, 2006.

ARAÚJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; PAIVA, F. F. de A.; MARINHO, P. F. A. DE P.; VASCONCELOS, H. E. M. Pesquisa participativa e novo modelo de produção de queijo Coalho artesanal da comunidade de Tiasol, em Tauá, CE. **Caderno de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 29, n.1, p. 213-241, 2012.

AROURI, A., DATHE, M., BLUME, A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1788 (3) 650-9, 2009.

ARUNACHALAM, K.D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v.19, n.10, p. 1559-1597, 1999.

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

BADIS, A., GUETARNI, D., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., HENNIC, D.E., TORNADIJOD, M.E., KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v. 21, p. 343-349, 2004.

BADIS, A., GUETARNI, D., MOUSSA-BOUDJEMÂA, B., HENNIC, D.E., TORNADIJOD, M.E., KIHAL, M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. **Food Microbiology**, v. 21, p. 579-588, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 3977-3978, 11 março 1996.

BEGOVIC, J., BRANDSMA, J. B., JOVCIC, B., TOLINACKI, M., VELJOVIC, K., MEIJER, W. C., TOPISIROVIC, L. Analysis of dominant lactic acid bacteria from artisanal raw milk cheeses produced on the Mountain Stara Planina, Serbia. **Archives of Biological Science Belgrade**, 63 (1), 11-20, 2011.

BALLESTEROS, C.; POVEDA, J. M.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; CABEZAS, L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheese. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 249-255, 2006.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

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

BOWER, C.K., PARKER, J.E., HIGGINS, A.Z., OEST, M.E., WILSON, J.T., VALENTINE, B.A., BOTHWELL, M.K., MCGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**. v. 25, p.81-90, 2002.

CARPINÉ, D., DAGOSTIN, J. L. A., SANTA, H.S.D., ALVAREZ, D.C., TERRA, N.N., SANTA, O. R. D. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.6 n.1 p.125-132, 2010.

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

FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L O. ELARDI, E. Processamento do queijo de Coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctea endógena. **Ciência e Tecnologia dos alimentos**, Campinas, v.27, n. 1, p. 205-214, 2007.

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

CENTENO, J.; MENÉNDEZ, S. RODRÍGUEZ-OTERO, J. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.307-313, 1996.

CITTI, J.E.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. Comparison of slow and fast acid producing *Streptococcus lactis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.48, n.1, p.14-18, 1965.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.64, n.3, p.409-421, 1997.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p.172- 207, 1982.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Chapman & Hall, v. 2. 1995.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.

DE ROISSART, H.B., 1986. Bactéries lactiques. In Laits et produits laitiers: vache, brebis et chèvre. Tome 3. Ed. **Technique et documentation Lavoisier**, Paris, pp. 343-408, 1986.

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

EL-GHAISH, S.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, I.; SITOHY, M.; IVANOVA, I.; HAERTLE, T.; CHOBERT, J. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, n. 4, p. 635-643, 2010.

ESTEPAR, J.; SÁNCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Peñamellera' cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 10, p. 737-746, Oct., 1999.

FRANCIOSI, E., SETTANNI, L., CAVAZZA, A., POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. **International Dairy Journal**.v.19, p.3-11, 2009.

FEREIRA, W. L.; FILHO, J. R. F. Avaliação da qualidade físico-química do queijo de Coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, n. 01, p. 127-133, 2008.

FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados – Aspectos bioquímicos e tecnológicos**, 2º Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 112p. (Cadernos Didáticos, 43).

FORSYTHE, S.J. 2002. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados (eds Tondo. E. C.). Artmed Editora. pp. 132-147;

FONTAN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M.E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in San Simon cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, v. 18, p. 25-33, 2001.

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

FURTADO, M. M. Leite de búfala: Características e Fabricação de Queijos. EPAMIG 125 (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), **Instituto de Laticínios, Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, 1990.

GIRAFFA, G., CARMINATI, D., NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732-738, 1997.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003. Review.

GOBBETTI, M. The sourdough microflora: interactions between lactic acid bacteria and yeast. **Trends Food Sci. Technol.** 9:267–274, 1998.

GOBBETTI, M., SMACCHI, E., FOX, P., STEPANIAK, L., CORSETTI, A. The sourdough microflora. Cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in acid lactic bacteria. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, 29, 561-569, 1996a.

GOBBETTI, M., SMACCHI, E., CORSETTI, A. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: Purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. **Applied and Environmental Microbiology** 62,03220-3226, 1996b.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

HASSAN, A.N., FRANK, J.F. Starter cultures and their use. In. MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2<sup>o</sup> ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HOORDE, K. V.; LEUVENC, I. V.; DIRINCK, P.; HEYNDRICKX, M.; COUDIJZER, K.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. **International Journal of Food Microbiology**. 144 (2010) 226–235.

HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; STARRENBURG, M. DELCOUR, J.; DE VOS, W.; HOLS, P. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl-production. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66(9): 4112-4114.

HUTKINS, R.W., NANNEN, N. L. pH homeostasis in lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2354-2365, 1993.

KABADJOVA-HRISTOVA, P., BAKALOVA, S., GOCHEVA, B., MONCHEVA, P. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from Kefir Grains. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** 20/2006/2

KIHAL, M., PREVOST, H., LHOTTE, M.E., HUANG, D.Q., DIVIÈS, C. Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. **J. Appl. Microbiol.** 22, 219–223, 1996.

LIMA, C.; LIMA, L., CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; Rosa, C.. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootécnica.**, v.61, 1: 266-272; 2009.

LIU, M.; BAYJANOV, J. R.; RENCKENS, B.; NAUTA, A.; SIEZEN, R. J. The proteolytic system of lactic acid bacteriarevisited: a genomic comparison. **BMC genomics**. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/36>. Acesso:12:26 p 1-15, 2010.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK – PIEKARCZYK, T., FERNANDÉZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ - MARTÍN, P., BARDOWSKI, J. **Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria**. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, USA, p. 3-33, 2010.

MOULAY, M., AGGAD, H.; BENMECHERNENE, Z.; GUESSAS, B.; HENNI, D.E., & KIHAL, M. Proteolytic Activity of Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk, **World Journal of Dairy & Food Sciences**, 1:12-18, 2006.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. dos S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. de A. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físicoquímica de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Agroindústria Tropical, n. 11, p. 24, 2003.

OGIER, J.C.; LAVAFARGE, V.V.; GIRARD, V.V.; RAULT, A.A.; MALADEN, V.V.; GRUSS, J.Y.; LEVEAU; DALACROIX-BUCHET, A.A. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Environ Microbiology** v.70, n.9, p.5628-43, 2004.

PAILIN, T., KANG, D.H., SCHMIDT, K.; FUNG, D.Y.C. Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. **Applied Microbiology**. v. 33, p 45–49, 2001.

PARDI, MIGUEL CIONE; IACIR FRANCISCO DOS; SOUZA, ELMO RAMPINI DE; PARDI, HENRIQUE SILVA. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. Volume II. Editora da UFG. p. 720-785. Goiânia. 1996.

QUEIROZ, A. A. M. **Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de queijo de Coalho no Ceará. Fortaleza – Ceará, 2008.** 54p. Dissertação de Mestrado: Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará.

RANDAZZO C. L.; CAGGIA, C.; NEVIANI, E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. **Journal Microbiol Methods**. 78 (1): 1 -9, 2009.

RENNA, M.; GARDA, A.; LUSSIANA, C.; AMBROSOLI, R.; BATTAGLINI, L.M. Chemical, nutritional and microbiological characterization of organic Fontina PDO cheese. **Italian Journal Food Science**, vol. 21, n. 3, 2009.

SARANTINOPOULOUS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M.D., REA, M.C., LOMBARDI, A., COGAN, T.M., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 621-647, 2001.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 581-608, 1998.

SETTANNI, L., CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetablefood bio-preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123 -138, 2008.

SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691-697, 2010.

SILVA, R. A.; LIMAC, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?. **Food Chemistry**. 135, 1533–153, 2012.

SOUZA, J. P.; JONG, E. V.; GOULART, H. H. R. **Aumente o tempo de conservação dos alimentos e obtenha mais lucros**. Porto Alegre: Imprensa Livre, 112p., 2001.

STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspective on the contribution of acid lactic bacteria to cheese flavor development. **Current Opinion in Biotechnology**. 24, 135-141, 2013.

SUZZI, G.; CARUSO, M.; GARDINI, F.; LOMBARDI, A.; VANINNI, L.; GUERZONI, M.E.; ANDRIGHETTO, C.; LANORTE, M.T. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-274, 2000.

TEUBER 1995, M. Fermented Milk products. In: LUND, B.M.; BAIRD-PARKER, T.C.; GOULD, G.W. **The microbiological safety and quality of food**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. v. 1, p. 535-589, 2000.

THAMER, K.G., PENNA, A.L.B. Effect of whey, sugar and fructooligosaccharides on the probiotic lactic acid bacteria population in fermented beverages. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.3, p. 393-400, 2005.

ZOTTA, T., RICCIARDI, A., PARENTE, E. Enzymatic activities of acid lactic bacterial isolated from Cornetto di Matera sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, p.165-172, 2007.

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que há uma grande variedade de bactérias lácticas autóctones no queijo de Coalho artesanal com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas.

A manutenção da biodiversidade microbiana desses queijos deve ser considerada como fator fundamental, uma vez que as BAL autóctones auxiliam na qualidade sanitária e microbiológica desse produto e mantêm características organolépticas típicas de sabor e aroma que caracteriza esse produto artesanal.

A presença de BAL iniciadoras e secundárias, na matriz queijo Coalho, com potencial tecnológico podem ser utilizados como critérios para seleção de culturas com potencial promissor para a elaboração de fermentos lácticos destinados a elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

# **ANEXO I**

(Normas de submissão da revista *Journal of Applied Microbiology*)

## **Author Guidelines**

*Journal of Applied Microbiology* publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, *Journal of Applied Microbiology* updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research. Click here to read the Editorial announcing the new Aims and Scope.

## **CONTACTS AND QUICK LINKS**

Author submission checklist

Contact the Editorial Office

Contact the Production Editor

Submit your manuscript now to *Journal of Applied Microbiology*

Click here to download the Colour Work Agreement Form

Guidelines for Electronic Graphics.

## **ARTICLE TYPES**

### **Original Articles**

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

### **Review Articles**

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

### **Letters to the Editor**

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper in the Journal. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

## **EDITORIAL PROCESS**

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a

decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

### **EDITORIAL POLICY**

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's publication ethics policies, which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics.

### **Authorship**

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

### **Conflict of interest disclosure**

*Journal of Applied Microbiology* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Ethics of experimentation**

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the ARRIVE guidelines before submission of a manuscript.

### **Potential threat to security**

The Journal expects that all authors will conform to the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

### **Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance**

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

### **Data availability**

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction

on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. “E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)”. Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

### **Copyright Transfer Agreement**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### **OnlineOpen**

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition***

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to [www.microbiologyopen.com/info](http://www.microbiologyopen.com/info) and [www.foodscience-nutrition.com/info](http://www.foodscience-nutrition.com/info).

### **SUBMISSION**

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

#### **Cover letter**

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer): 1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal? 2. In what way is this work novel? The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

### **Suggesting reviewers**

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

### **MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION**

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the author submission checklist to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available here).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but

focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;

- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

### **References**

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be

quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus ([http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

## Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, †† etc. For an example of table style, click [here](#).

## Figures

Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of figure style, click [here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

### **Colour figures**

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from here and should be sent to the provided address on acceptance.

### **English usage, abbreviations and units**

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l<sup>-1</sup> not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l<sup>-1</sup> (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (*g*). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' [www.biochemj.org/bj/bji2a.htm](http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm).

Please click [here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

### **Microbial nomenclature**

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please click [here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

### **Gnotobiotic animals**

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

### **Statistics**

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

### **Footnotes**

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

### **Experimental hazards**

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

### **English-language editing service**

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found here. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

### **Early View**

*Journal of Applied Microbiology* is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that

they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

### **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

### **Disclaimer**

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

# **ANEXO II**

(Normas de submissão da revista *Journal of Dairy Research*)

## **Author Guidelines**

### **Journal of Dairy Research**

#### **General**

The Journal of Dairy Research publishes reports in English on all aspects of dairy science from any country. Material for publication should be sent to the Editor, Dr David Chamberlain, Journal of Dairy Research, Hannah Research Park, Mauchline Road, Ayr, KA6 5HL, UK. Receipt of all material will be acknowledged by email. Submission of a paper will be taken to imply that it reports original unpublished work, that it is not under consideration elsewhere, and that if accepted by the Journal it will not be published elsewhere in any language without the consent of the editors. Authors should indicate that they accept the conditions in these Directions to Contributors. Authors of accepted articles will be asked to assign their copyright, under certain conditions, to the Journal to help protect their material.

#### **Submission of papers**

Authors should submit the full paper in electronic form. An electronic version of the summary should be included as a Word file suitable for distribution to potential referees. Electronic submission may be on disc or as an e-mail attachment ([jdr@hannahresearch.org.uk](mailto:jdr@hannahresearch.org.uk)). The format should be as a Word document (for the PC not MAC). Authors of accepted papers are required to supply a copy of the final version as a Word document. Submitted manuscripts must be concise and limited in length to a maximum of 6000 words, including an allowance of 250 words per fig or Table. This is approximately the equivalent of a Word document of 18 A4 pages of double-spaced 12pt Times New Roman font.

#### **Layout of papers**

Papers should be presented with wide margins on one side of A4 or similar paper. Each page should be numbered in sequence, preferably with line numbering. Text should be double spaced throughout, including References, Figure Legends and Table headings and footnotes. Papers should be written in English and should as far as possible be

comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise, but without omitting necessary material, and contain sufficient detail to allow repetition of the work. Spelling should be that of the Concise Oxford Dictionary, Oxford: Clarendon Press. Exceptions will be indicated during technical editing. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text. Authors should consult a recent issue of the Journal of Dairy Research to familiarize themselves with Journal conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication. The paper should generally be divided as follows. (a) Cover sheet should give the title of the article, names of the authors each with one forename, together with their affiliations in any non-Cyrillic European language, a shortened version of the title of not more than 45 letters and spaces suitable as a heading, and the name and address of the author to whom correspondence and proofs should be sent. (b) A Summary, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly the new knowledge acquired. Individual results are rarely necessary. (c) The Introduction, which should not have a heading, should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, and why the authors have chosen the approach described. (d) The Materials and Methods section should contain adequate descriptions of procedures or appropriate references; sources of all materials (including address, with postal code) and sources or strains of animals and microorganisms should be indicated. (e) Results should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. (f) The Discussion should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly. Acknowledgements of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph without heading. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified. (g) References. For some types of paper, other divisions may be preferable.

## **Reviews of dairy science**

These are normally invited, but the editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors.

## **References**

References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura et al. 1989); the first author with et al. is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov et al. 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Authors should refer to the most recent issue for the format of references. (Note that the Journal uses the minimum of punctuation.) Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. Authors are reminded that they are responsible for checking references.

## **Units**

SI and metric units should be used whenever possible (see Quantities, Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences, 1971 London: The Royal Society and Specification for SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units, London: British Standards Institution publication BS 5555). Note that cm, 100 g and 100 ml do not form the basis of SI units. However, for the present solutions should be given in terms of molarity (M) rather than mol/l, e.g. 0.5 M-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Give compositions based on mass or volume as (e.g.) mg/l or mg/kg and not percentage. Normality should not be used. Buffers should be given clearly, e.g. 30 mM-Tris--50mM-boric acid buffer, pH 8.

## **Microorganisms**

The organism should be described unambiguously, with genus, species and subspecies (if any) in italic and strain number or source in roman. Usage should conform to current international rules. Shortened forms or synonyms may be used after the first mention if desired.

## **Chemical formulae**

These should be unambiguous. It is permissible but not required to use symbols for inorganic formulae.

## **Enzymes**

The recommendations of the International Union of Biochemistry (Enzyme Nomenclature, 1984, London: Academic Press) should be followed, and the EC number given where known.

## **Tables**

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed on a separate sheet and not included in the text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark: e.g. Table 1 near here. Symbols for footnotes should be in the order, †, ‡, §, ¶, ††. The use of \*, \*\*, etc, should be limited to indicating levels of significance.

## **Illustrations**

Since June 2011, all colour figures submitted to Journal of Dairy Research will be published online free of charge on Cambridge Journals Online. Colour figures for the print version will result in a charge to the authors.

### **How to Ensure Colour Online**

To maximize the probability that figures will be published in colour online authors are encouraged to follow these figure submission guidelines:

- Submit a colour graphic as either TIFF or EPS files
- Submit figures at approximately the size at which they are to reproduce so that reduction or enlargement is not necessary.
- Line artwork should be supplied in black and white mode at a resolution of 1200 dpi; combination artwork (line/tone) at a resolution of 800 dpi; black and white halftone artwork should be saved in 'grayscale' mode at a resolution of 300dpi; colour halftone artwork should be saved in CMYK mode at a resolution of 300 dpi.
- Submit multipart figures in one single electronic file.

It is the responsibility of the author to ensure that any figures provided for colour online will reproduce well when converted to black and white for the print version. Figures such as graphs must be supplied in an editable file format, such as Excel. The use of histograms and bar graphs should be restricted, as the information can often be better presented in a table. In the presentation of results, curves or lines should not extend beyond the experimental points, which should be indicated by symbols, used in order: ○, ●, □, ▲, ◻, ■, x, +. Scale marks should be on the inside of the axes. Each Figure should be provided with a legend such that with the Figure it is comprehensible without reference to the text. Figure legends should be typed on a separate sheet or sheets, beginning Fig. 1. Halftone artwork should be accompanied by a legend as above. In case of size alteration in printing, scale bars on the photograph should be used, not magnifications in the legend.

### **Other nomenclature, symbols, abbreviations and conventions**

Authors should consult a current issue for guidance. Useful information on biochemical nomenclature and permitted acronyms can be found in *Biochemical Journal* 169, 11-14 and on nutrient nomenclature in the *British Journal of Nutrition*. If authors use other abbreviations or acronyms, they should be defined at first mention, and their number restricted to ensure that the text is readable. Always use Arabic numerals with units; otherwise use words for 1-10 and figures for more than 10, (e.g. 3 weeks, three cows, 34 sheep) but avoid mixed lists. Time should be given by the 24 h clock, e.g. 14.15, without h or hours.

### **Statistical treatment**

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved, as a single or range of Pvalue: (P=0.008) or (P <0.01). Differences should not be claimed or implied if P> 0.05.

### **Ethics of experiments**

Authors are expected to adhere to the relevant codes covering human subjects and the use of animals (British Medical Journal (1964) ii, 177-178; Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations 1987 London: The Biological Council).

### **Revision of papers**

If a paper is returned to authors for possible amendment or revision, a period of 6 months will normally be allowed. The editors are ready to consider a revised or rewritten paper at any time, but after 6 months it will be considered a new paper and given a new submission date.

### **Proofs**

Authors will be advised when to expect proofs, which should be returned without delay to the appropriate editor. Proofs are sent for the correction of any printer's or editorial errors, not for addition of new material or revision of the text. Excessive alteration may have to be disallowed or made at the authors' expense, and may delay publication. Order forms for paid offprints are sent with proofs and should be returned directly to Sue Perkins, Journals Production Department, Cambridge University Press, The Edinburgh Building, Shaftesbury Road, Cambridge CB2 2RU, UK

(Revised 16/8/11)