



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO DO SERTÃO DA PARAÍBA**

Leonardo Martins de Araujo

**Recife
2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Leonardo Martins de Araujo

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO DO SERTÃO DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da UFPE, como requisito
para obtenção do título de Mestre.
Área de contração: Biotecnologia

Orientadora; Pr^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva
Coorientadora: Pr^a Dr^a Rosália Severo de Medeiros

**Recife
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araujo, Leonardo Martins de

Avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho do sertão da Paraíba. / Recife: O Autor, 2017.

72 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Rosália Severo de Medeiros

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2017.

Inclui referências e anexo

- 1. Queijo de coalho 2. Probióticos 3. Bactérias I. Silva, Márcia Vanusa da (orient.) II. Medeiros, Rosália Severo de (coorient.) III. Título**

641.373

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 454

LEONARDO MARTINS DE ARAUJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, como requisito para obtenção do título de Mestre.
Área de contração: Biotecnologia

Data de aprovação da Defesa 21 de julho de 2017

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Marcia Vanusa da Silva
Orientadora
(UFPE)

Profª. Drª Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Examinadora Titular
(UFRPE)

Profº Drº Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Examinadora Titular
(UFRPE)

**Recife
2017**

A Deus

Aos meu pais

Maria Nilda e Sinval de Sales

Dedico

“...tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4.13

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter me dado forças quando eu estava cansado e pensando em desistir, sempre esteve comigo em todos os momentos e me ajudou a concluir essa etapa da minha vida. Na tristeza sempre me deu alegria e em cada passo dessa jornada pôs em meu caminho muitos anjos aos quais me ajudaram a chegar até aqui. Obrigado, Deus!

À minha Família que é a razão pela qual estou aqui, sem eles não conseguiria chegar a escrever estas palavras.

À minha mãe, Maria Nilda e meu pai, Sinval de Sales, são meus exemplos de vida e sempre me apoiaram em minhas decisões. Para mim é um privilégio dedicar e agradecer-los neste trabalho.

Às minhas irmãs Ângela Paula, Daniele, Kelly, Shirlene e Viviane, as quais sempre me ajudaram com o seu apoio, suas orações e suas palavras de conforto.

Aos amigos que dividimos moradia Iwanne, Gerson, Danielly e Dayane.

Aos amigos da minha cidade Cajazeiras-PB, os quais sempre me acolhem bem e sempre estão dispostos a sentar um pouco, conversar e passear.

Às minhas amigas de Pós-Graduação Marcela, Nandara, e especialmente a minha amiga Daniela Barros a qual tenho um enorme carinho e afeto.

À minha Orientadora Professora Márcia Vanusa pelo apoio e a confiança.

À minha Coorientadora Professora Rosália Medeiros pelo seu apoio, confiança e paciência.

Aos Professores Ana Porto, Maria Taciana e Romero Brandão, a todos que compõem o LABTECBIO onde desenvolvi maior parte deste estudo.

À professora Viviane lansky pela ajuda prestada neste trabalho.

À Universidade Federal de Pernambuco e à Universidade Federal de Campina Grande.

A todos que contribuíram nesta jornada, direta ou indiretamente muito obrigado!

RESUMO

No Brasil o queijo de coalho é um produto bastante popular principalmente na região nordeste onde encontra-se a sua maior produção. No estado da Paraíba a região do sertão é a maior produtora de queijos de coalho, este produto é naturalmente produzido em sua maior parte de forma artesanal, com leite cru ou não pasteurizado. Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de coalho da Paraíba, Nordeste do Brasil. As cepas foram avaliadas quanto à tolerância ao pH baixo e a Ox bile em caldo MRS por 24 horas, como um critério de selecionar as cepas que apresentaram melhor resistência a estas condições. Das vinte cepas avaliadas 5 foram selecionadas, três *Lactobacillus plantarum plantarum* (L1, L2, L18) e dois *Lactobacillus fermentum* (L7, L8) as quais foram utilizadas aos demais testes de resistência e viabilidade ao pH baixo e Ox bile em solução Tampão Fosfato-salino (PBS) Suscetibilidade a Antibióticos pela técnica de difusão em disco, assim como o antagonismo frente às cepas bacterianas patogênicas de referência *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 e *Listeria innocua* ATCC 33090, auto agregação por cinco horas em PBS e hidrofobicidade no solvente Xilol por duas horas. Todas as cepas foram sensíveis a Penicilina, Ampicilina, Cefotaxima (inibidores da síntese da parede celular) e Cloranfenicol (inibidor de proteínas) a cepa L7 apresentou resistência a 4 antibióticos Oxacilina, Eritromicina, Gentamicina e Co-trimoxazol. As zonas de inibição frente às bactérias patogênicas foram superiores a 10 mm, com exceção da L7. Na autoagregação L1 e L2 obtiverem os maiores percentuais após as três horas de incubação, apenas a L7 apresentou fortes características hidrofóbicas. As Bactérias ácido lácticas, isoladas de queijo de coalho artesanal do sertão paraibano apresentam características favoráveis, *in vitro*, que as tornam promissoras candidatas a futuras aplicações probióticas

Palavras chave: Queijo de coalho. Probióticos. Alimentos funcionais. Produtos lácteos.

ABSTRACT

In Brazil, coalho cheese is a very popular product mainly in the northeast region where its highest production is found. In the state of Paraíba the region of the Sertão is the largest producer of coalho cheeses, this product is naturally produced mostly handmade, with raw or unpasteurized milk. This work aimed to evaluate the *in vitro* probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the rennet cheese of Paraíba, Northeast Brazil. The strains were evaluated for tolerance to low pH and Ox bile in MRS broth for 24 hours, as a criterion to select the strains that presented the best resistance to these conditions. From the twenty strains evaluated, three *Lactobacillus plantarum* (L1, L2, L18) and two *Lactobacillus fermentum* (L7, L8) were selected, which were used for the other tests of resistance and viability at low pH and Ox bile in solution Phosphate- Saline (PBS) Susceptibility to Antibiotics by disc diffusion technique as well as antagonism against the pathogenic bacterial isolates *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 and *Listeria innocua* ATCC 33090, aggregation for five hours in PBS and hydrophobicity in solvent Xylol for two hours. All strains were sensitive to Penicillin, Ampicillin, Cefotaxime (inhibitors of cell wall synthesis) and Chloramphenicol (protein inhibitor) L7 strain was resistant to 4 antibiotics Oxacillin, Erythromycin, Gentamicin and Cotrimoxazole. The zones of inhibition against the pathogenic bacteria were higher than 10 mm, except for the L7 in the autoaggregation L1 and L2 obtained the highest percentages after the three hours of incubation, only the L7 presented strong hydrophobic characteristics. The Lactic acid bacteria, isolated from artisanal coalho cheese from the Sertão Paraíba, have favorable characteristics, *in vitro*, that make them promising candidates for future probiotic applications.

Key words: Coalho cheese. Probiotics. Functional Foods. Dairy products.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Imagem esquemática das etapas de fabricação de queijo de coalho produzido no Estado da Paraíba (Imagem adaptada de Medeiros 2016) 18
- Figura 2.** Visão geral da classificação filogenética de Bactérias Ácido Láticas (imagem adaptado de Sauer et al., 2017) 20
- Figura 3.** Um esquema dos órgãos alvo de doenças, que podem ser tratados com terapêutica microbiana projetada. Além da associação do trato gastrointestinal, estas terapêuticas podem ser usadas em quase todos os órgãos e contra uma grande variedade de doenças (imagem adaptado de chua et al., 2017) 28

ARTIGO A SER SUBMETIDO

- Figura 1.** Número de células viáveis (log 10 UFC ml⁻¹) de bactérias ácido lácticas - BAL, incubadas em PBS a pH 2,5, durante três horas. 37
- Figura 2.** Número de células viáveis (log 10 UFC ml⁻¹) de bactérias ácido lácticas – BAL, incubadas por quatro horas, a 37 °C em aerobiose no tampão PBS acrescido de Ox bile 37
- Figura 3.** Percentual de auto agregação (%) de bactérias ácido lácticas – BAL, em solução tampão PBS à temperatura ambiente, durante cinco horas. 39
- Figura 4** Percentual de adesão (%) das cepas de bactérias ácido lácticas - BAL, sob ação do Solvente xilol após duas horas de incubação, em temperatura ambiente 40

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1.	Principais propriedades de BAL para serem utilizadas em produtos probióticos na indústria	24
Tabela 2.	Produtos alimentares fermentados de várias regiões como fonte de probióticos	25

ARTIGO A SER SUBMETIDO

Tabela 1.	Cepas de BAL isoladas de queijo de coalho Paraibano.	31
Tabela 2.	Percentual de sobrevivência das BAL incubadas por 24 horas nas concentrações de bile e pH baixo.	36
Tabela 3.	Suscetibilidade de BAL utilizando o método de difusão em disco após incubação de 24h a 37°C em aerobiose.	38
Tabela 4.	Diâmetro dos halos de inibição in vitro de BAL a <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP) e <i>Listeria innocua</i> (LI).	38

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µL – Microlitro

BAL – Bactérias ácido lácticas

BHI – *brain-heart infusion*

BSH – Hidrolase Salina Biliar

DO – Densidade Óptica

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

L. fermentum – *Lactobacillus fermentum*

L. fermentum – *Lactobacillus fermentum*

L. garviae – *Lactococcus garviae*

L. innocua – *Listeria innocua*

L. mesenteroides – *Leuconostoc mesenteroides*

L. p. plantarum – *Lactobacillus plantarum plantarum*

L. plantarum – *Lactobacillus plantarum*

L. rhammnosus – *Lactobacillus rhammnosus*

MRS – De Man, Rogosa e Sharpe

Mm – milímetros

nm – nanômetros

Ox bile – Ox bili, Bacteriological

P/V – Peso/volume

PBS – solução fosfato salina

S. infantarius – *Streptococcus infantarius*

S. infantarius infantarius - *Streptococcus infantarius infantarius*

S. macedonicus – *Streptococcus macedonicus*

TGI – Trato Gastrointestinal

W. paramesenteroisdes – *Weissella paramesenteroisdes*

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVOS	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 QUEIJO DE COALHO	17
2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	19
2.2.1 <i>Lactobacillus</i>	20
2.2.2. <i>Lactococcus</i>	21
2.2.3 <i>Streptococcus</i>	22
2.2.4 <i>Weissela</i>	22
2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS	23
2.3.1 Bactérias ácido lácticas: E sua importância em alimentos	24
2.4 PROBIÓTICOS	26
2.4.1 Probióticos, histórico e conceito	26
2.4.2 Probióticos e seus efeitos na saúde	27
3 ARTIGO: Avaliação <i>in vitro</i> de propriedades probióticas de bactérias ácido láctica isoladas de queijo de coalho no Nordeste do Brasil.	29
4. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS – Normas da revista <i>Food Microbiology</i>	57

1. INTRODUÇÃO

No Brasil o queijo de coalho é um produto bastante popular principalmente na região nordeste onde encontra-se sua maior produção. O queijo de coalho é obtido através da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias ácido lácticas, possui de média a alta umidade, de massa semicozida ou cozida e apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60% (BRASIL, 2001).

Amplamente distribuídas na natureza, as Bactérias ácido lácticas (BAL) predominam sobre a microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas (ex.: leite e o queijo), estão naturalmente presentes no leite cru, ou adicionadas intencionalmente em produtos industrializados (LOPEZ-DIAS et al., 2000).

As BALs têm importante função na melhoria e tecnologia da fabricação de derivados do leite, entre eles o queijo de coalho. Por possuírem, entre outras características, propriedades como: a adição de sabor, textura e aroma nos produtos lácteos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Além disso, são os microrganismos mais utilizados como probióticos (ZOUNPOPOULOU et al., 2017).

No estado da Paraíba, a região do Sertão é a maior produtora de queijos de coalho, devido a elevada produção de leite pela atividade pecuarista fornecido às queijeiras da região, este produto é naturalmente produzido em sua maior parte de forma artesanal, com leite cru (LUÍZ, 2014).

Os probióticos são comumente obtidos das matrizes de alimentos em que esses microrganismos são empregados (ABUSHELAIBI et al., 2017), neste contexto, o queijo de coalho artesanal paraibano caracteriza-se como uma excelente fonte de BAL (MEDEIROS et al., 2016).

Os probióticos promovem inúmeros efeitos de promoção de saúde, tais como: controle dos níveis de colesterol sérico, infecção intestinal, influenciam benéficamente o sistema imunológico, melhorando a utilização de lactose e atividade anticancerígena, influencia positivamente a microbiota intestinal, ajuda a redução de compostos tóxicos entre outros (DOMINGO, 2017).

Além disso os probióticos devem suportar as condições adversas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), como resistir ao pH ácido do estômago, ser tolerante a bile e

secreções pancreáticas, serem capazes de aderir à mucosa intestinal, produzir substâncias antimicrobianas, promover a exclusão de microrganismos patogênicos e transmitir os seus efeitos benéficos ao hospedeiro (SETTACHAIMONGKON et al., 2016; RATHER et al., 2017). Atualmente, as BAL ou bifidobactérias são os principais microrganismos probióticos utilizados na indústria alimentar (ABUSHELAIBI et al., 2017 e ZOUMPOPOULOU et al., 2017).

A importância prática dos microrganismos probióticos como as BAL dentro deste grupo é inquestionável, à medida que elas encontram aplicações nos campos relacionados com a indústria, a alimentação e a saúde. Na indústria alimentar, as BAL são amplamente utilizadas na fabricação de produtos fermentados, produtos lácteos, cárneos e vegetais, bem como na produção de vinho e fermento. Além disso, a produção de substâncias antimicrobianas ou bacteriocinas por determinadas espécies de BAL elevou seu uso como agentes biopreservadores em alimentos, (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

A grande variedade e o número de aplicações de BAL aumentam a necessidade de correlacionar características industriais e clinicamente importantes com informações genômicas para examinar as possibilidades de exploração de seu potencial metabólico, melhorando assim seu uso em aplicações biotecnológicas e relacionadas à saúde. (SINGH; MAL; MAROTTA, 2017; STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

O estudo do potencial probiótico e biotecnológico de cepas de BAL é interessante à indústria nutracêutica e alimentícia, pois, promovem várias informações sobre suas características que são avaliadas para empregar em seus produtos um uso adequado desses microrganismos garantindo a segurança em seus produtos funcionais em novas terapias (SHEKH 2016; MANGIAPANE 2015; SINGH; MAL; MAROTTA, 2017).

Devido a importância dos efeitos benéficos e da promoção de saúde conferido pelo uso das BAL, este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades probióticas de bactérias ácido láticas isoladas do queijo de coalho da Paraíba, Nordeste do Brasil.

1.1. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar as propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de coalho da Paraíba, nordeste do Brasil

ESPECÍFICOS

Verificar a resistência das bactérias ácido lácticas ao pH ácido e na bile;

Analisar a suscetibilidade aos antibióticos, inibidores da síntese da parede celular - Penicilina, Ampicilina, Vancomicina, Oxacilina, cefotaxima; Inibidor da síntese de ácidos nucleicos - Norfloxacin; Inibidores da síntese de proteínas - Cloranfenicol, Eritromicina, Clindamicina, Gentamicina e Inibidor da síntese de folato - Cotrimoxazol.

Verificar a atividade antagonista frente às cepas patogênicas *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665 e *Listeria innocua* ATCC 33090;

Verificar a capacidade de autoagregação;

Analisar o potencial hidrofóbico com o uso solvente xilol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO DE COALHO

A grande parte da produção de queijos de coalho nos estados do Nordeste ainda é artesanal, utilizando leite de vaca cru, coalho natural e sal, sem adição de fermentos. Entre os queijos produzidos artesanalmente, o queijo de coalho é considerado um alimento de excelente valor nutritivo, com elevado conteúdo de cálcio, essencial à formação dos ossos, contribuindo ainda para funções de crescimento e função nervosa (AMARANTE, 2015; MEDEIROS, 2016).

De acordo com a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, entende-se por queijo de coalho, 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 em até dez dias (SDA, 2001).

O queijo de coalho é um produto elaborado a partir da coalhada de leite de animais, ou seja, um concentrado protéico-gorduroso, através da coagulação da caseína por ação de enzimas (AMARANTE, 2015), é um queijo de média a alta humidade, de massa semi-cozida ou cozida que possui um teor de gordura variável nos sólidos totais entre 35% e 60% (SDA, 2001).

Os queijos podem ser classificados de acordo com o grau de humidade em queijos frescos com massa mole ($> 55\%$) e massa macia (46-54,9%), massa semidura (36-45,9%) e massa dura ($<36\%$) segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 (BRASIL, 2001).

Na fabricação do Queijo de Coalho da Paraíba existem pequenas diferenças entre produtores ou queijeiras, tratadas como “segredos bem guardados”, que buscam dar uma especificidade ao produto (SDA, 2001). Em torno de 67% do processo produtivo é artesanal e 31% é semi-artesanal. Quanto ao leite, mais de 76% das queijeiras não pasteurizam o leite para fabricarem o queijo (SDA, 2001). Embora o produto seja bastante difundido regionalmente, não existem dados estatísticos oficiais para sua produção (MEDEIROS, 2016).

As etapas de fabricação do queijo de coalho da Paraíba são apresentadas por Medeiros (2016), em um fluxograma (**figura 1**). As etapas do processo de fabricação são recessão, filtragem e pesagem do leite integral cru; adição de coalho comercial; repouso por 40 minutos; corte da coalhada; repouso; aquecimento da coalhada (realizada por alguns

produtores); dessoragem; enformagem e prensagem; salga (podendo ser feita na massa da coalhada ou na superfície do queijo); embalagem e armazenamento (temperatura ambiente ou refrigeração), embora o produto seja bastante difundido regionalmente, não existem dados estatísticos oficiais para sua produção.

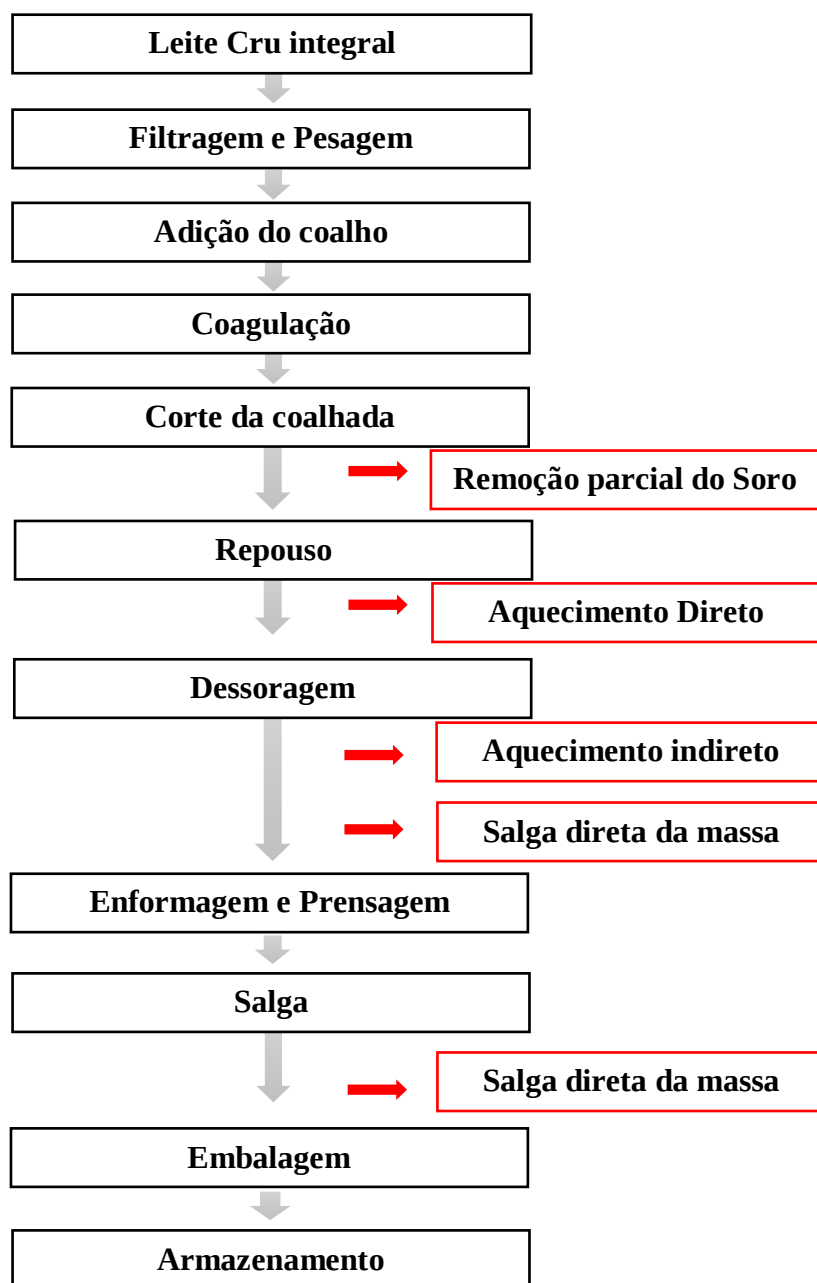


Figura 1: Imagem esquemática das etapas de fabricação de queijo de coalho produzido no Estado da Paraíba (Imagem adaptada de MEDEIROS, 2016).

2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As BAL compreendem um grupo de microrganismos com diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Estas bactérias podem apresentar forma de bacilos e cocos, e podem estar organizados em cadeia ou individualmente, Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbicas facultativas, capazes de realizar a fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose de uma forma mais lenta. Produtoras do ácido láctico, como o principal produto final da fermentação dos açúcares, estão envolvidas na acidificação dos produtos alimentares destinados quer a humanos, quer a animais (BURGAIN et al., 2014; TAMANG et al., 2016).

As bactérias lácticas são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de desenvolver-se em temperaturas de 5 a 45°C. Possuem a capacidade de crescer a pH de 3,8 e são proteolíticas fastidiosas em relação a alguns aminoácidos. Produzem elevado número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009). Também produzem vários fatores antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, nisinas, bacteriocinas, diacetilo e acetaldeído (FORSYTHE, 2002), que atuam positivamente nos produtos alimentares, fazendo parte dos microrganismos capazes de fornecer efeitos benéficos ao hospedeiro (OH et al., 2016).

De acordo com o produto final da fermentação, as bactérias lácticas se dividem em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. O grupo das bactérias homofermentativas abrange os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, que utilizam a via glicolítica para transformar os carboidratos principalmente em ácido láctico. Por outro lado, as bactérias heterofermentativas utilizam a via da fosfoacetolase para produzir além do ácido láctico, CO₂, etanol, acetato e citrato a partir da glicose. Os membros desse grupo incluem *Leuconostoc*, *Weissella* e alguns *Lactobacillus* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FORSYTHE, 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros é baseada na: configuração do ácido láctico produzido; crescimento em diferentes temperaturas; morfologia; modo de fermentação da glicose; capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas e tolerância às condições ácidas e básicas. Além disso, a taxonomia atual (**figura 2**) das BAL também leva em conta a relação filogenética entre os diferentes micro-organismos desse

grupo, elucidada através do sequenciamento do 16sRNA ribossômico (HOLZAPFEL et al., 2014; SAUER et al., 2017).

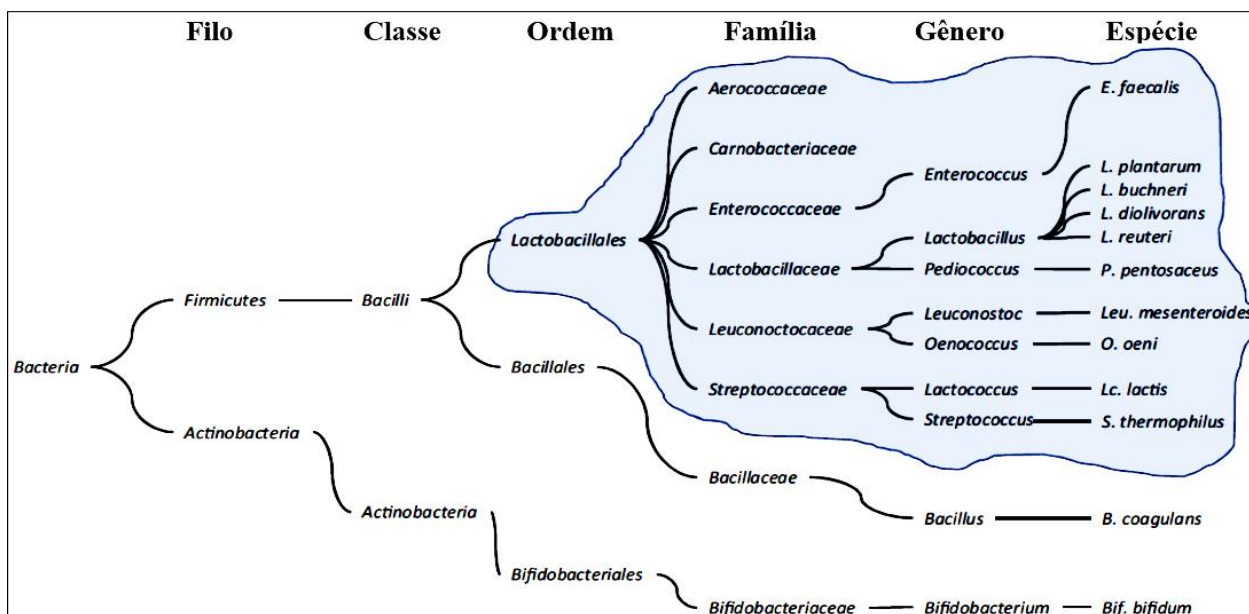


Figura 2. Visão geral da classificação filogenética de Bactérias Ácido Láticas (imagem adaptado de SAUER et al., 2017).

2.2.1 *Lactobacillus*

Os Lactobacilos são em partes responsáveis no desenvolvimento do aroma e sabor do queijo devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas (LÓPEZ-DÍAZ, 2000). O gênero contém cerca de 60 espécies, os *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* são as mais encontradas em alimentos (LÓPEZ-DÍAZ, 2000).

Os Lactobacilos sobrevivem em condições térmicas sendo único grupo que se desenvolve bem no ambiente adverso do interior do queijo, que possui um baixo pH, alto conteúdo de sal, ausência de carboidratos fermentáveis, é anaeróbico e pode conter bacteriocinas produzidas pelas bactérias iniciadoras (MARINO et al., 2003).

Os Lactobacilos podem ser divididos em três grupos, admitindo o produto final de sua fermentação: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios, que fermentam apenas hexoses a ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii lactis* e *Lactobacillus helveticus*); *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, CO₂, álcool e H₂O₂ (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus*

plantarum); e *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexose a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ e pentoses a ácido láctico e ácido acético (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) (FOX et al., 2000).

O grupo dos heterofermentativos facultativos não são comumente encontrados no fermento láctico, mas estão associados a fermentação secundária, benéfica durante a cura do queijo (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). São chamados de bactérias ácido lácticas não iniciadoras ou culturas adjuntas, geralmente encontrados em fermentos lácticos (KULLEN et al., 2001; FOX et al., 2000)

2.2.2. *Lactococcus*

Este gênero de BAL apresenta características como a capacidade de crescer a 10°C, em pH ótimo de 6,0-6,5, mas não a 45°C. Em temperatura ambiente de 20°-30°C, os *lactococcus* fazem o processo de fermentação entre de 10-20h (WALTHER, 2008). O *Lactococcus lactis* *lactis* e *Lactococcus lactis cremoris* são subespécies importantes para a produção de queijos. O que diferencia estas duas subespécies são as características relacionadas à capacidade de produzir NH₃ a partir da arginina, crescimento em diferentes temperaturas concentrações de sal. Enquanto o *Lactococcus lactis lactis* produz NH₃ a partir da arginina, cresce a temperaturas de 10, 15 e 40°C e em 4% de sal, o *Lactococcus lactis cremoris* não produz NH₃ a partir da arginina e cresce somente a temperaturas de 10° e 15°C e em 2% de sal (FOX et al., 2000).

Os *Lactococcus* são geralmente predominantes em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa (CARVALHO, 2007), sendo sua presença reduzida durante o processo de cura, como constatada por Fontán et al. (2001) e Lopez-Diaz et al. (2000), os quais verificaram seu desaparecimento em seis e oito semanas, respectivamente.

Os microrganismos deste gênero são considerados as principais bactérias responsáveis pela acidificação do leite (LOPEZ-DÍAZ et al., 2000). Devido à sua capacidade em converter rapidamente a lactose em ácido láctico, estes microrganismos mesofílicos são os mais usados para a fabricação de ácido nas fermentações lácticas. Além de ácido láctico, formam também diacetil, dióxido de carbono e outros compostos de aroma.

2.2.3 *Streptococcus*

Das espécies de *Streptococcus*, a única utilizada nas fermentações lácticas é o *Streptococcus thermophilus* (HASSAN; FRANK, 2001). Sua diferenciação das demais é devida a sua resistência ao aquecimento, crescendo bem a 45°C e a 52°C e conseguindo, inclusive, sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995). Esta propriedade faz com que queijos, como o queijo Cheddar, caracterizados pelo emprego de altas temperaturas no processamento, requeiram o uso de fermento termofílico que inclua estes microrganismos em sua composição (MICHEL; MARTLEY, 2001).

Os *Streptococcus* têm a capacidade de fermentar um pequeno número de carboidratos e possuem atividade proteolítica limitada. O pH ótimo para o crescimento de *Streptococcus thermophilus* é de 6,5 (HASSAN; FRANK, 2001), sendo capazes de suportar uma concentração de até 2,5% de NaCl (FOX et al., 2000). Ele é frequentemente utilizado em combinação com *Lactobacillus spp.* que desempenha o importante papel de utilizar a galactose, porção de lactose, que não é utilizada pelo *Streptococcus thermophilus* complementando a acidificação do queijo e reduzindo o fenômeno de *browning* que ocorre com o aquecimento (MICHEL; MARTLEY, 2001).

2.2.4 *Weissella*

Collins e Martinez-Murcia, entre os anos de 1990 e 1993, ao trabalharem com isolamento de microrganismos em um tipo de salsicha grega, descreveram o gênero *Weissella*, ao observarem que o *Leuconostoc paramesenteroides* continha diferenças filogenéticas do *Leuconostoc mesenteroides* e se enquadrava filogeneticamente com lactobacilos das espécies *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus haloterans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor* e *Lactobacillus viridescens*. Foi então descrito o gênero *Weissella*, que integrou os microrganismos mencionados além de outro descoberto no estudo em questão, *Weissella hellenica*. A espécie *Weissella thailandensis* foi descoberta e descrita alguns anos depois, assim como *Weissella cibaria* e *Weissella confusa* (BJORKROTH et al., 2002).

O gênero *Weissella* é considerado um grupo de bactérias do ácido láctico, incluído nos microrganismos heterofermentativos obrigatórios, apresentando formas cocos ou bastonetes, gram positivo, catalase negativo, não esporulantes, microaerófilos e geralmente imóveis (PAPAGIANNI; PAPAMICHAEL, 2014). As bactérias desse gênero se adequam na definição clássica fornecida para probióticos e têm origem diversificada, em produtos cárneos *in natura* e nas variações de produtos fermentados. (BJORKROTH et al., 2002).

Weissella Paramesenteroides é uma das espécies predominantes de BAL em produtos fermentados. Foi constatado que Cepas de *W. Paramesenteroides* são capazes de produzir Peptídeos antimicrobianos com características interessantes para aplicação biotecnológica, por exemplo, a *Leuconocin S*, uma glicoproteína estável ao calor, é produzida em quantidades significativas em fermentações controladas pelo pH. Algumas bacteriocinas já foram relatadas em cepas de *W. Paramesenteroides*, como a *Weissellin A*, uma bacteriocina de classe IIa, 4,45 kDa, isolada de salsicha, assim como peptídeo antimicrobiano de 3,74 kDa foi purificado a partir de caldos de cultura do isolado de pepino, estes relatos comprovam a Importância biotecnológica dessas cepas (PAPAGIANNI; PAPAMICHAEL, 2014).

Outra espécie deste gênero a *Weissella confusa* é significativa em culturas de iniciação, na fermentação do leite e alimentos fermentados em geral, tem sido um alvo de atenção por possuir a capacidade de produzir exopolissacarídeos ou peptídeos antimicrobianos, os quais podem ser explorados para aplicações probióticas. (FAIRFAX; LEPHART; SALIMNIA. 2014; FUSCO et al 2015).

Foi relatado que a *W. confusa* produz a *Weissellicin MBF* uma bacteriocina de espectro restrito, o que confere à bactéria a ser uma forte candidata em estudo quanto ao seu potencial probiótico, conseqüentemente, todas as bactérias deste gênero, portanto, sendo necessário mais estudos sobre as características probióticas deste gênero assim como estudos moleculares (HENG; YEH; AMARILA, 2017).

2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS UTILIZADAS COMO PROBIÓTICOS

O mercado mundial de produtos probióticos está em crescimento, sendo necessário satisfazer às necessidades dos consumidores que buscam fontes alternativas para melhorar a saúde e seu bem-estar. As BAL com propriedades probióticas são usados numa grande variedade de produtos lácteos e fermentados (queijos, leite fermentados, iogurte, kefir, bebidas lácteas) em vegetais fermentados (azeitonas, chucrute), em carne e produtos de carnes fermentadas e pão fermentado (FRAQUEZA, 2015).

Para serem utilizados na indústria de alimentos os probióticos devem ser capazes de suportar as condições de estresse no TGI, e permanecer viáveis sendo capazes de se proliferar, colonizar o intestino e garantir a transferência dos efeitos benéficos ao hospedeiro. (PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017). Além de passar por diversas observações de várias

características (**tabela 1**), os produtos devem seguir um parâmetro de segurança alimentar, que estabeleça a boa qualidade do produto ao consumidor (FAO/WHO 2002).

Tabela 1: Principais Propriedades de BAL para serem utilizadas em produtos probióticos na indústria.

Propriedades	Benefícios
Resistência às enzimas pancreáticas, ácido e bile	Sobrevivência a passagem pelo trato gastrointestinal
Adesão à mucosa intestinal	Modulação imune Exclusão dos patógenos Melhora a cicatrização dos danos na mucosa Prolonga a colonização intestinal
Origem humana	Interações específicas entre espécies e o anfitrião
Efeitos sobre a saúde documentados	Os efeitos propostos são verdadeiros
Segurança	Nenhum risco ao consumidor
Boas propriedades tecnológicas	Estabilidade Produção em grande escala Tolerância ao oxigênio

Fonte: Adaptado de OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002.

2.3.1 Bactérias ácido lácticas: E sua importância em alimentos

A linhagens de BAL usadas em alimentos não tem potencial patogênico, além de serem excelentes produtoras de substâncias antimicrobianas, as criando um microambiente desfavorável a diversos micro-organismos, inclusive aqueles com potencial patogênico, sendo esta característica a base de inúmeros métodos de conservação de alimentos por fermentação. As condições ácidas do meio melhoram a competitividade das BAL, que apresentam maior tolerância ao baixo pH extra e intracelular, comparado às demais bactérias (SETTACHAIMONGKON et al., 2016; FRAQUEZA, 2015; PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017).

As BAL desempenham um papel benéfico essencial na maioria dos alimentos fermentados como fontes probióticas (**tabela 2**), sendo estas utilizadas em uma ampla variedade de cepas na produção de derivados lácteos, cárneos, de vegetais e produtos de panificação. Além da importância de inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes, esse grupo de bactérias também auxilia na melhora da textura e das propriedades sensoriais dos alimentos (SETTACHAIMONGKON et al 2016; SHORI, 2015). Nas indústrias de alimentos a adição de cepas de BAL ou subprodutos dessas bactérias está sendo muito utilizada na bioconservação dos produtos (GARCIA et al., 2004; KYUNGWHA; AZLIN, 2007).

Tabela 2: Produtos alimentares fermentados de várias regiões como fonte de probióticos.

Microrganismos	Alimentos Fermentados
Cepas <i>Lactobacillus acidophilus</i> 16A, brevis 14G, <i>fermentum</i> 6E, <i>plantarum</i> DC400	Soro italiano
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> and <i>L. plantarum</i>	Soro de fermentado-batata de batata irlandesa
<i>L. acidophilus</i> BS, <i>L. casei</i> 1 K, <i>L. casei</i> DSM20011, <i>L. fermentum</i> DSM 20052, <i>L. plantarum</i> 110	Leite fermentado comercial, queijo, Beterrabas fermentadas, alimentos vegetais fermentados
<i>L. acidophilus</i> 1C5, 4C1 and 1C3 and 5C2, <i>L. casei</i> Immunitass 4D2, 4D1 e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 4C3, 2C2, T, 3C15 and 3C23, <i>L. casei</i> Shirota 6D1, 6D2, <i>Bifidobacterium longum</i> T, <i>Lactobacillus delbreuckii</i> 5D1, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF, <i>L. plantarum</i> 6C1, 1D1, 3C12, 1D2, 6C3, 1C1, 6C4, 6C5	Produtos lácteos e farmacêuticos
<i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>Pediococcus pentosaceus</i>	(Eragostis tef) Atmit
<i>L. casei</i> NRRL B-1445, <i>L. delbrueckii</i> NRRL B-445, <i>L. fermentum</i> NRRL B-4524, <i>L. fermentum</i> NRRL B-4524, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F, <i>P. pentosaceus</i> NRRL B-14009 and <i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	Fermentação natural de vegetais
<i>L. casei</i> MF50, 54, <i>L. fermentum</i> MF25, <i>P. pentosaceus</i> MF32, 33 e 35 e <i>L. plantarum</i> MF79	Injera etíope (panqueca africana suave)
<i>Enterococcus sp. hirae</i> , <i>faecium</i> e <i>durans</i>	Alimentos de soja fermentados indianos
<i>E. faecium</i> RJ16	Queijo de cabra
<i>E. faecium</i> A86, <i>L. plantarum</i> H5, <i>L. plantarum</i> L3	Massa de pizza, fermento, salsichas
<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>	Sementes do sul da Itália
<i>L. brevis</i>	Hatay queijo cozido
<i>Lactobacillus reuteri</i> e <i>L. plantarum</i>	Pão iraniano Sangak
<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> and <i>L. plantarum</i> Lb 29, L10	Carper barry
<i>L. brevis</i> G11, G25, <i>L. fermentum</i> N33, N25 and <i>L. plantarum</i> A6	Milho Fermentado
<i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i>	Pão de açougueiro marroquino
<i>L. plantarum</i>	Salsichas fermentadas secas em grego
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> and <i>L. mesenteroides</i>	Pão Sangak iraniano
<i>L. plantarum</i>	Comida fermentada (Shalgam)
<i>L. plantarum</i> , <i>L. mesenteroides</i>	Italian Cornetto di Matera sourdough
<i>P. pentosaceus</i> KTU05-8 and KTU05-9	Pão de trigo integral
<i>L. acidophilus</i> EF7, <i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. rhamnosus</i> GG B103, <i>L. reuteri</i> M14-C, CF2 7-F, DSM 20016, SD 2112, MM7 e MM2-3	Batata doce
<i>L. plantarum</i> DPC2739, <i>L. plantarum</i> W723	Produtos lácteos, Sorghum-Ogi

Fonte: adaptado de PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017.

Com o objetivo de melhorar e atribuir propriedades funcionais, a indústria alimentícia tem adicionado aos seus produtos as culturas probióticas (ANTUNES, 2007). Os principais produtos comercializados no mundo contendo probióticos são os fabricados especialmente pela indústria láctea como: os leites fermentados, iogurtes, sorvetes, sobremesas à base de leite, leite em pó destinado aos recém-nascidos, maionese, manteiga, diversos tipos de queijos, alimentos de origem vegetal fermentados e na Indústria nutracêutica como os produtos em cápsulas ou em pó para serem dissolvidos em bebidas frias (DOMINGO, 2017; PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017).

2.4 PROBIÓTICOS

2.4.1 Probióticos, histórico e conceito

O microbiologista russo chamado Eli Metchnikoff¹, ao estudar os efeitos benéficos do leite fermentado no século XX, postulou a teoria em que o consumo diário deste produto proporcionava a longevidade dos camponeses búlgaros (EPIFANIO, 2012). O primeiro estudo científico sobre o tema, realizado por Metchnikoff, foi publicado em 1907, e as observações foram feitas a partir do leite fermentado contendo *Lactobacillus spp.* Ele sugeriu que a “auto-intoxicação intestinal” e o envelhecimento resultante poderiam ser suprimidos modificando a flora intestinal e utilizando micróbios úteis para substituir os micróbios proteolíticos como *Clostridium* e dessa forma, desenvolveu uma dieta com leite fermentado com a bactéria, à qual denominou “Bacilo búlgaro” (ANTUNES et al., 2007).

Lilly e Stillwell, em 1965 empregaram pela primeira vez o termo “probióticos” e o definiram como “aquele fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos” (LILLY; STILLWELL, 1965). Em 1989, foi introduzida a ideia de que os probióticos têm um efeito benéfico para o hospedeiro, enfatizando os requisitos de viabilidade desses microrganismos (COSTA; VARAVALLO, 2011). O primeiro produto probiótico comercialmente disponível foi um leite fermentado contendo *Lactobacillus casei*., comercializado apenas em 1935, aproximadamente três décadas após a descoberta de Metchnikoff (RUTAVA; WALKER, 2011).

Derivado do grego, o termo “probiótico” tem o significado de “pró-vida”, sendo contrário a palavra “antibiótico” que significa “contra a vida”. Quando Lilly se referiu aos probióticos, acreditava-se que eles eram “qualquer organismo ou substância produzida por um

micróbios com um efeito positivo no balanço microbiano intestinal” Os probióticos também foram definidos por Fuller como “um suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, com efeitos benéficos no equilíbrio intestinal” (FULLER, 1989).

É importante ressaltar que os probióticos deixaram de ser reconhecidos como “substâncias secretadas por microrganismos”, como se acreditava na década de 1965, para serem reconhecidos hoje como “microrganismos vivos e em quantidades adequadas” (ANTUNES, 2007).

Apesar de várias definições publicadas, a definição aceita pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) bem como a Organização Mundial de Saúde (WHO) para o termo probiótico “São microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas são capazes de produzir efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (FAO/WHO 2002)

2.4.2 Probióticos e seus efeitos na saúde

Os benefícios atribuídos aos probióticos podem incluir: redução da concentração do colesterol, atenuação de reações alérgicas; aumento da biodisponibilidade de determinados nutrientes, sérico, melhora da saúde do trato urogenital, aumento da quantidade de anticorpos IgA circulantes, bloqueio da adesão de bactérias patogênicas a tecidos epiteliais, tratamento de doenças inflamatórias intestinais como a síndrome do intestino irritado, constipação intestinal, tratamento de câncer no intestino e controle de infecções orais (CASAROTTI et al 2017; CHIANG; PAN, 2012; FUSCO et al 2015).

Outro benefício atribuído às bactérias probióticas é o alívio dos sintomas da intolerância à lactose, pois essas bactérias lácticas presentes em produtos probióticos produzem a enzima β -D-galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, resultando em menor teor de lactose nos produtos fermentados e no intestino dos humanos (GHEYTANCHI et al., 2010).

O probióticos descritos na literatura possuem diversas propriedades anticancerígenas que são desempenhadas pelos seguintes mecanismos:(1) modificação temporária da Composição de microbiota do intestino; (2) mudanças na atividade metabólica da microbiota intestinal; (3) vinculação e degradação de Compostos cancerígenos presentes no lúmen intestinal; (4) Produção de compostos com atividade anticancerígena, tais como: ácidos

graxos de cadeia curta (SCFAs) e conjugados Ácido linoléico (CLA); (5) imunomodulação; (6) melhoria da barreira intestinal; (7) mudanças na fisiologia do hospedeiro; e (8) inibição da proliferação celular e indução apoptose em células cancerosas. (REIS et al., 2017).

As Bactérias probióticas podem ser usadas para auxiliar várias terapias, por exemplo um determinado antígeno pode ter seu efeito benéfico reduzido durante a passagem do TGI, entretanto, se for coadministrado com bactérias probióticas a chegada deste medicamento (Citocinas, fragmentos de anticorpos, Antígenos, peptídeos, etc.) ao local da infecção pode ser bastante promissora, portanto, contornando os efeitos colaterais associados à administração sistêmica de drogas (SINGH; MAL; MAROTTA, 2017).

O surgimento da biologia sintética permitiu a engenharia de probióticos comensais desempenhar novas funções terapêuticas (**figura 3**). Ao longo dos anos, os cientistas projetaram probióticos direcionados para o tratamento de doenças como a obliteração, o diabetes, bem como as infecções por HIV, a utilização destas técnicas terapêuticas à saúde oferta uma grande vantagem e uma melhor segurança ao indivíduo (CHUA et al., 2017).

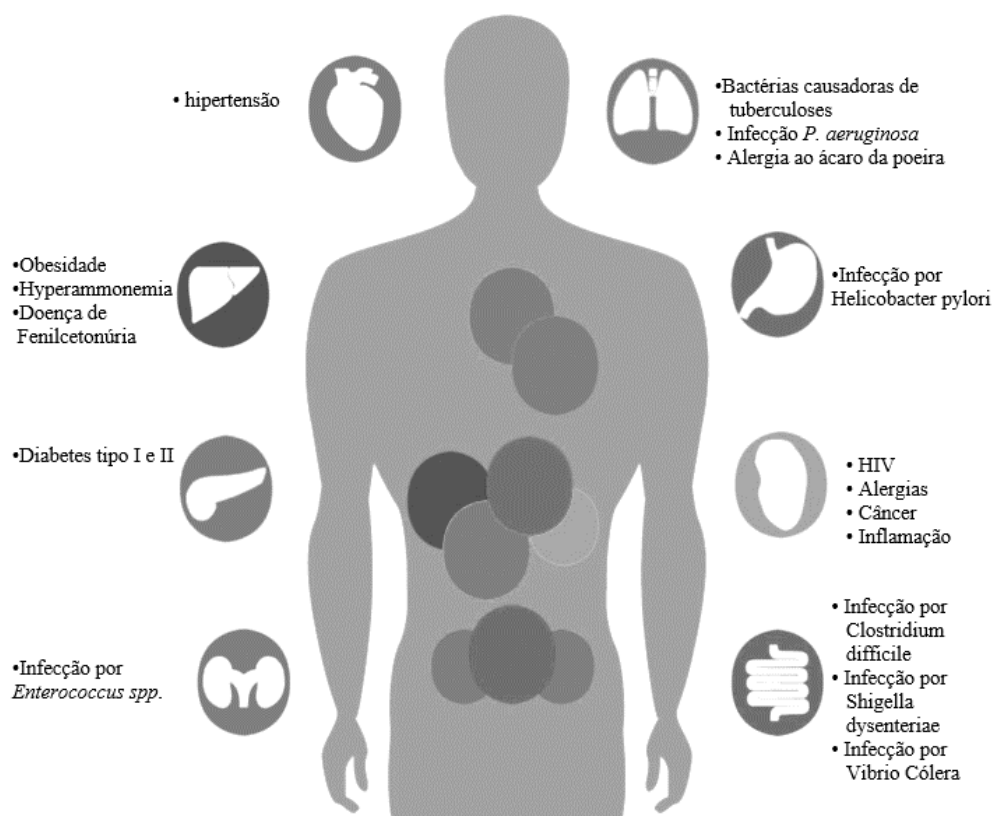


Figura 3 Um esquema dos órgãos alvo de doenças, que podem ser tratados com terapêutica microbiana projetada. Além da associação do trato gastrointestinal, estas terapêuticas podem ser usadas em quase todos os órgãos e contra uma grande variedade de doenças (imagem adaptado de CHUA et al., 2017)

3 ARTIGO: Avaliação *in vitro* de propriedades probióticas de bactérias ácido láctica isoladas de queijo de coalho no Nordeste do Brasil.

Leonardo Martins de Araujo ^{a*}; Rosália Medeiros de Severo^b; Priscilla Régia de Andrade Calaça^c, Meire dos Santos Falcão de Lima^a, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares^c, Ana Lucia figueiredo Porto^c, Márcia Vanusa da Silva^a.

^a Universidade federal de Pernambuco - UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 Tel: +55 (81) 2126.8000.

^b Universidade Federal de Campina Grande- UFCG. Avenida Universitária S/N - Bairro Santa Cecília - Cx Postal 61 - Patos/PB CEP:58708-110 Tel: +55 (83) 3511-3000

^c Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE. Rua Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900 Tel: +55 (81) 3320-6000

Abstract

The objective of this study was to evaluate probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from curd cheese from the Paraíba Backwoods, a food made from raw or unpasteurized cow's milk that is very common in the region. Based on the acid resistance and the presence of bile, five strains of *Lactobacillus* all strains underwent *in vitro* tests of low pH and bile resistance, antibiotic susceptibility, antimicrobial, autoaggregation and hydrophobicity. In general, *L. plantarum* (L2 and L18) and *L. fermentum* (L8), obtain better probiotic properties, including acid tolerance and bile, antimicrobial property and autoaggregation. Aiming at future biotechnological and industrial applications, the strains must undergo thorough testing for feasibility and evidence of benefits to human health.

key words: Dairy products, probiotics, Functional food, curd cheese, Northeast Brazil

1. Introdução

A busca crescente na indústria alimentícia e nutracêutica por fontes alimentares funcionais e pela melhoria da qualidade dos alimentos de produtos já existentes, impulsionam progressivamente os estudos relacionados à obtenção e desenvolvimento biotecnológico de cepas com propriedades probióticas (Hashemi, 2016).

O uso de Bactérias Ácido Láticas (BAL), que apresentem propriedades probióticas em alimentos funcionais, desperta um alto interesse às indústrias biotecnológicas, nutracêutica e alimentícias, principalmente por serem facilmente encontradas em alimentos que fazem parte de nossa dieta, tais como: leite de vaca, ovelha, cabra (Avaiyarasi et al., 2016) e produtos fermentados como queijos, iogurtes dentre outros (Foligné et al., 2016).

Algumas BAL foram amplamente utilizadas como probióticos em produtos lácteos, pois os seus produtos metabólicos promovem efeitos positivos ou incrementam melhorias nas características organolépticas dos alimentos como o sabor e textura, ou ainda, a vida útil alimentar, além disso outra característica atrativa são as bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos sintetizados por ribossomos) que são capazes de promover a morte de microrganismos indesejáveis (Avaiyarasi et al., 2016).

Probióticos são microrganismos vivos e quando administrados em quantidades adequadas, conferem vários benefícios para saúde do receptor. Os efeitos provenientes do consumo desses microrganismos estão relacionados à manutenção da flora intestinal, redução dos níveis de colesterol, propriedades imunoreguladoras, ajuda na prevenção de diarreias, aumento da tolerância aos alimentos contendo lactose e, possivelmente, atua na prevenção ao câncer de colon (Azat et al., 2016; Zhang et al., 2016; Abushelaibi et al., 2017; Astashkina, 2014; Bakr, 2015). Atualmente, as BAL ou bifidobactérias são os principais microrganismos probióticos utilizados na indústria alimentar (Abushelaibi et al., 2017 e Zoumpopoulou et al., 2017).

Geralmente, os probióticos são obtidos a partir de matrizes de alimentos em que esses microrganismos são empregados (Abushelaibi et al., 2017), neste contexto, o queijo de coalho artesanal paraibano configura-se como uma excelente fonte de BAL, principalmente por ser produzido naturalmente com leite cru ou não pasteurizado (Medeiros et al., 2016).

Segundo Rather et al. (2017), a capacidade de transmissão de efeitos benéficos ao hospedeiro confere as BAL um bom potencial probiótico. Esse potencial está relacionado à resistência dessas bactérias às condições fisiológicas intestinais como pH ácido, sais biliares,

aderência às células epiteliais e produção de substâncias antimicrobianas *in vivo* e *in vitro* (Zhang et al., 2016). Cada cepa probiótica é única e, portanto, a avaliação criteriosa e independente dessas características benéficas torna-se necessária (Salminen et al., 2016).

Diante da alta relevância dos efeitos benéficos e promotores de Saúde conferidos pelas BAL ao seus hospedeiros e sua importância biotecnológica na indústria nutracêutica e alimentícia, este estudo teve por objetivo caracterizar e avaliar as propriedades probióticas de 20 cepas de BAL, isoladas de queijo de coalho artesanal Paraibano

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção e manutenção das cepas.

As cepas bacterianas foram recuperadas, da coleção do laboratório de microbiologia na Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas - UACB da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos-PB. Originalmente, obtidas a partir de amostras de queijo de coalho artesanal do Sertão Paraibano, 20 cepas, passaram pelas etapas de coloração de Gram, teste de catalase, extração de DNA, PCR convencional, sequenciamento da região 16SRna e criopreservadas a -20°C em glicerol e caldo De Man, Rogosa e Sharpe-(MRS) (Tabela 1).

Tabela 1. Cepas de BAL isoladas de queijo de coalho Paraibano

Microrganismos	Código Id. GenBank	Cod. Id.
<i>Lactobacillus fermentum</i>	KT990036	L7
<i>L. fermentum</i>	KT990035	L8
<i>L. plantarum</i>	KT990038	L4
<i>L. plantarum</i>	KT990039	L5
<i>L. plantarum</i>	KT990040	L6
<i>L. plantarum plantarum</i>	KT990043	L1
<i>L. plantarum plantarum</i>	KT990044	L2
<i>L. plantarum plantarum</i>	KT990045	L3
<i>L. plantarum plantarum</i>	KT990046	L8
<i>L. plantarum plantarum</i>	KT990047	L19
<i>L. rhamnosus</i>	KT990052	L14
<i>L. garvieae</i>	KT990057	L9
<i>L. garvieae</i>	KT990054	L10
<i>L. garvieae</i>	KT990053	L16
<i>L. garvieae</i>	KT990061	L17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KT990093	L20
<i>Streptococcus infantarius</i>	KT990074	L13
<i>S. infantarius infantarius</i>	KT990067	L15
<i>S. macedonicus</i>	KT990090	L12
<i>Weissella paramesenteroides</i>	KT990094	L11

Código Id. GenBank; Número de acesso ao GenBank

Cod. Id: código de identificação pessoal das cepas

As cepas foram reativadas por semeio e incubações sucessivas em caldo MRS durante 24 h, em placas com ágar MRS por 48 h e novamente em caldo MRS por 24 h, todos com a 37°C em condições de aerobiose (Medeiros et al., 2016). Posteriormente, as cepas foram submetidas a nova criopreservação, em criotubos com glicerol e caldo MRS a -20°C. Após o processo de reativação, as 20 cepas foram utilizadas para os testes de avaliação de propriedades probióticas *in vitro*.

2.2. Seleção das cepas

Todas as 20 cepas foram submetidas ao teste da tolerância ao pH gástrico, de acordo com Kumar e Kumar (2015). 0,5 ml de inóculo (10^8 CFU/ml⁻¹), de cada isolado, foi transferido para 4,5 ml de caldo MRS nas concentrações de pH 2 e 3, respectivamente. Após 24 horas de incubação a 37°C em condições de aerobiose foi verificado a densidade óptica - DO em absorbância de 600nm com relação ao pH 7, utilizado como controle.

A resistência aos sais biliares foi determinada segundo Vinderola e Reinheimer (2003), com adaptações. 0,5 ml de suspensão (10^8 UFC/ml⁻¹) de cada isolado foram inoculados em nos respectivos caldos MRS contendo 4,5 ml, nas contrações de 0,3% e 0,5% (p/v) de Ox bili, Bacteriological (himedia), e caldo MRS sem bile como controle e incubadas a 37°C por 24 horas. A (D.O.) em absorbância foi registrada em 600nm, após a incubação, e comparadas com o controle.

O cálculo da porcentagem de resistência a pH baixo e Ox Bile foi descrito pela fórmula:

$$\% \text{ Resistencia} = \frac{\text{D.O. no caldo MRS com bile/ Ph 2,3}}{\text{D.O. no caldo MRS com bile/ Ph 7}} \times 100$$

Para os demais testes, foram selecionadas as cepas que obtiveram melhor resistência ao pH baixo e Ox bile, tendo como referência o intervalo de 24h. Ambos os testes foram realizados duas vezes em triplicata.

2.3 Resistência ao pH baixo

O teste de resistência ao pH baixo foi realizado segundo Argyri et al. (2012) , as células bacterianas foram incubadas meio líquido MRS a 37°C por 18-24h, posteriormente, 2ml das suspensões celulares foram padronizadas para 10^8 UFC ml⁻¹ transferido para tubos de

ependorfs e centrifugado em 10 000g por 5 min a 4°C, lavadas duas vezes em solução Tampão PBS (pH 7,2) e ressuspensas na mesma solução Tampão, com pH ajustado de 2,5. A resistência bacteriana foi avaliada duas vezes, em duplicata para cada intervalo de incubação, pela contagem do número de colônias viáveis, após semente de 100µL em placas de Petri contendo ágar MRS após a incubação a 37°C durante 0, 1 e 3h, sendo o último intervalo representativo ao tempo médio que o bolo alimentar permanece no estômago.

2.4 Resistência à Bile

As cepas bacterianas foram incubadas meio líquido MRS por 18-24h, posteriormente 2ml das suspensões celulares foram padronizadas para 10^8 UFC ml⁻¹, centrifugadas a 10 000g por 5 min a 4°C, lavadas duas vezes em solução Tampão PBS (pH 7,2) e ressuspensas na mesma solução tampão (pH 8,0, contendo 0,5% (P/V) de Ox Bile, Bacteriological (Himedia). A resistência bacteriana foi avaliada duas vezes em duplicata pela contagem do número de colônias viáveis em placas com Agar MRS após a incubação por 24h a 37°C durante 0, 2 e 4h, sendo o último intervalo representativo do tempo de permanência dos alimentos no intestino delgado (Argyri et al., 2012).

2.5 Suscetibilidade a Antibióticos

A suscetibilidade das colônias bacterianas a antibióticos foi determinada em ágar MRS, por método de difusão em disco (Turchi et al., 2013). Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos: inibidores da síntese da parede celular - Penicilina G (P; 10 Unidades), Ampicilina (A; 10 µg), Vancomicina (VA; 30 µg), Oxacilina (OXA; 1 µg), cefotaxima (CTX; 30 µg); Inibidor da síntese de ácidos nucleicos - Norfloxacin (NX; 10 µg); Inibidor da síntese de proteínas - Cloranfenicol (C, 30 µg), Eritromicina (E; 15 µg), Clindamicina (CD; 2 µg), Gentamicina (GEN; 10 µg); Inibidor da síntese de folato - Cotrimoxazol (COT, 25 µg). As zonas de inibição (mm) foram medidas, após incubação a 37 ° C durante 24 h, e as cepas classificadas quanto à resistência, segundo os parâmetros da CLSI 2015.

2.6 Antagonismo *in vitro*

O teste de antagonismo foi realizado segundo adaptações de Guedes Neto et al. (2005) e Thirabunyanon, M.; Thongwittaya, N. (2012), utilizando as cepas bacterianas patogênicas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 Gram negativa e *Listeria innocua* ATCC 33090 Gram positiva, cedidas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

As BAL foram cultivadas em meio líquido MRS e incubadas a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose, as cepas bacterianas patogênicas de referência *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria innocua*, foram incubadas em caldo brain-heart infusion -BHI (Himedia), a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. Após 24 horas de crescimento as cepas de BAL foram padronizadas em 10^8 UFC ml⁻¹ e 5µL foram pipetados em discos de papel filtro 2mm na superfície de placas de Petri contendo ágar MRS e essas placas incubados em aerobiose, 37°C por 24 horas.

Após este período de incubação, um inóculo em ágar semissólido BHI com aproximadamente 10^7 UFC ml⁻¹ de bactérias patogênicas foi despejado sobre placas de petri, formando uma sobrecamada. Para o controle negativo foi utilizado o um disco com caldo MRS pH 6,5. Após 24h de incubação a 37 °C, em aerobiose, os diâmetros dos halos foram aferidos.

2.7 Autoagregação

No teste de autoagregação, segundo Kos et al. (2003), as cepas bacterianas foram cultivadas em meio líquido MRS, incubadas por 24 h a 37 ° C., centrifugadas a 5000g durante 15 min a 4°C, lavadas duas vezes em solução tampão PBS, ressuspensas no mesmo tampão e ajustadas para 10^8 UFCml⁻¹.

As suspensões celulares (4 ml) foram misturadas, por agitação com vórtex durante 10s, e, a cada 1 h, mediu-se a absorvância (A) a 600 nm, em triplicata, durante 5 h de incubação à temperatura ambiente. O teste foi realizado duas vezes, nas mesmas condições experimentais. O percentual de auto agregação é expresso como: $[1 - (A_t / A_0)] \times 100$, onde A_t Representa a absorvância no instante t= 1, 2, 3, 4 ou 5 h e A_0 representa a absorvância no instante $A_t= 0$.

2.8 Hidrofobicidade

O teste foi realizado segundo Rosenberg et al. (1980), após 18h de incubação em meio líquido MRS, as cepas bacterianas foram centrifugadas a 5 000g durante 15 min a 4°C, lavadas duas vezes em solução tampão PBS (pH 7,2), ressuspensas no mesmo tampão, ajustado para aproximadamente 10^8 UFC ml⁻¹ e a absorvância da suspensão celular foi medida a 600 nm (A_0). Adicionou-se um mililitro de solvente xilol a 3 ml de suspensão celular e a densidade da fase aquosa resultou da mistura completa da suspensão bacteriana com o Xilol por vórtex durante 60s. Após 2 h de incubação, a temperatura ambiente (A_1), aferiu-se a absorvância (a 600 nm) de uma alíquota (1mL) e foi determinada a porcentagem de adesão bacteriana pela fórmula: $(1 - A_1 / A_0) \times 100$.

2.9 Análise estatística

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando-se o software estatístico Assistat Version 7.7 (Silva, F. de A. S. e.; Azevedo, C. A. V. 2016). Para o teste de médias, foi aplicado o Teste de Tukey p ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), em arranjo fatorial ou delineamento inteiramente casualizado (DIC), segundo cada experimento.

3. Resultados

3.1 Seleção das cepas

No presente estudo, os testes de tolerância a Ox bile bacteriological (0,3 e 0,5%) e as concentrações ao pH (2 e 3), foram utilizados como critério para selecionar as cepas a serem incluídos nas experiências adicionais (Tabela 2). Entre as 20 BAL's, avaliadas com a presença de Ox bile, as cepas L3 e L4 obtiveram os melhores percentuais de crescimento, superando o tratamento controle. L1, L2, L5 e L17 também apresentaram elevado percentual de crescimento, em relação às demais, principalmente na concentração de Ox bile a 0,5%.

Na avaliação quanto ao pH 2 e 3, foi observado que todas as cepas bacterianas apresentaram melhor percentual de crescimento ao pH 3, evidenciando que o valor de pH mais baixo influencia em seu crescimento. Quatro cepas no pH 3, L1, L2, L8 e L18, destacaram-se com os melhores resultados significativos em relação às demais, sendo L1 e L2 representantes de um percentual de crescimento superior a 60% as demais cepas revelaram grande sensibilidade em ambas concentrações de pH.

As cepas bacterianas L1, L2, L7, L8 e L18 foram selecionadas, aos demais testes, com base nos resultados conjuntos de percentual de crescimento em Ox bile e pH baixo.

Tabela 2. Percentual de sobrevivência das BAL incubadas por 24 horas nas concentrações de bile e pH baixo.

Microrganismos	Id	Ox bile (%) ²		pH ³	
		0,3	0,5	2	3
<i>L. plantarum plantarum</i>	L1	81,88 ^{cb}	92,39 ^{cdA}	4,79 ^{aB}	66,44^{aA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L2	86,37 ^{cb}	96,39 ^{dA}	5,01 ^{aB}	60,63^{aA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L3	127,04^{aB}	141,58^{aA}	4,31 ^{aA}	4,32 ^{cdA}
<i>L. plantarum</i>	L4	124,73^{abB}	134,89^{aA}	3,81 ^{aA}	5,71 ^{cdA}
<i>L. plantarum</i>	L5	118,43 ^{bbB}	126,30 ^{bbA}	3,50 ^{aA}	5,53 ^{cdA}
<i>L. plantarum</i>	L6	11,37 ^{iB}	30,14 ^{iA}	0,81 ^{aA}	2,29 ^{dA}
<i>L. fermentum</i>	L7	7,73 ^{ijB}	65,93 ^{efA}	3,15 ^{aB}	9,09 ^{cdA}
<i>L. fermentum</i>	L8	8,88 ^{iB}	33,60 ^{hiA}	2,76 ^{aB}	12,37^{bcA}
<i>L. garvieae</i>	L9	21,07 ^{hB}	69,34 ^{eA}	0,97 ^{aA}	2,18 ^{dA}
<i>L. garvieae</i>	L10	10,73 ^{iB}	37,13 ^{hA}	0,72 ^{aA}	2,17 ^{dA}
<i>W. paramesenteroides</i>	L11	33,64 ^{gA}	32,52 ^{hiA}	1,54 ^{aA}	2,15 ^{dA}
<i>S. macedonicus</i>	L12	85,55 ^{eB}	92,71 ^{cdA}	2,68 ^{aA}	3,07 ^{cdA}
<i>S. infantarius</i>	L13	2,04 ^{ilA}	0,48 ^{iA}	1,37 ^{aA}	1,79 ^{dA}
<i>L. rhamnosus</i>	L14	53,71 ^{eB}	61,50 ^{fA}	2,27 ^{aA}	2,97 ^{cdA}
<i>S. infantarius infantarius</i>	L15	1,57 ^{jlA}	3,76 ^{jA}	1,61 ^{aA}	2,08 ^{dA}
<i>L. garvieae</i>	L16	0,05 ^{iB}	5,69 ^{iA}	1,28 ^{aA}	2,19 ^{dA}
<i>L. garvieae</i>	L17	86,72 ^{cA}	86,57 ^{dA}	2,29 ^{aB}	2,50 ^{cdA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L18	73,98 ^{dA}	70,11 ^{eB}	2,26 ^{aB}	20,72^{baA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L19	74,27 ^{dA}	66,14 ^{efB}	1,24 ^{aA}	2,00 ^{dA}
<i>L. mesenteroides</i>	L20	42,74 ^{fA}	46,25 ^{gA}	1,10 ^{aA}	2,11 ^{dA}

¹Os resultados foram expressos em valor médio do percentual de sobrevivência de células bacterianas, em meio concentração de Ox bile bacteriological e pH baixo. Valores seguidos por letras em negrito representam os melhores percentuais de sobrevivência;

²Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,01$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, em arranjo fatorial 5x5;

³Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas diferentes, são significativamente diferentes entre si ($p \leq 0,01$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, em arranjo fatorial 5x5.

3.2 Resistência ao pH baixo

Os resultados relacionados à resistência das cepas à condições de baixo pH, estão demonstrados na figura 1. Observa-se que a contagem de colônias viáveis, em pH 2,5 durante três horas de avaliação, apresenta uma tendência decrescente, ou seja, há uma redução na sobrevivência das células, como passar do tempo. Apesar disso observa-se valores viáveis de UFC.mL⁻¹, expresso em log₁₀ (Figura 1).

As bactérias expressaram viabilidade similar, entre as horas de exposição ao pH baixo, em média entre 7,23 e 6,71 log₁₀ UFC ml⁻¹ no tempo inicial. No tempo final, os valores de

viabilidade, variaram entre 2,5 e 3,5 log₁₀ UFC mL⁻¹. Entre as cinco cepas analisadas, L7 apresentou maior resistência ao pH 2,5, em três horas.

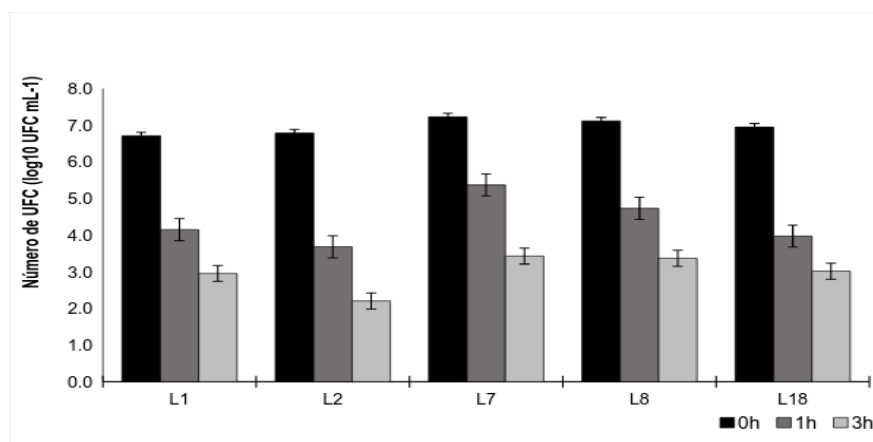


Figura 1. Número de células viáveis (log 10 UFC mL⁻¹) de bactérias ácido lácticas - BAL, incubadas em PBS a pH 2,5, durante três horas.

3.3 Resistência a Ox bile

Em Ox bile 0,5 %, durante quatro horas de avaliação, as cepas apresentaram um comportamento de crescimento gradativo com exceção da L7, que demonstrou uma pequena regressão de desenvolvimento pela exposição a Ox bile. A cepa L2 apresentou, em quatro horas, o maior número de colônias viáveis (Figura 2).

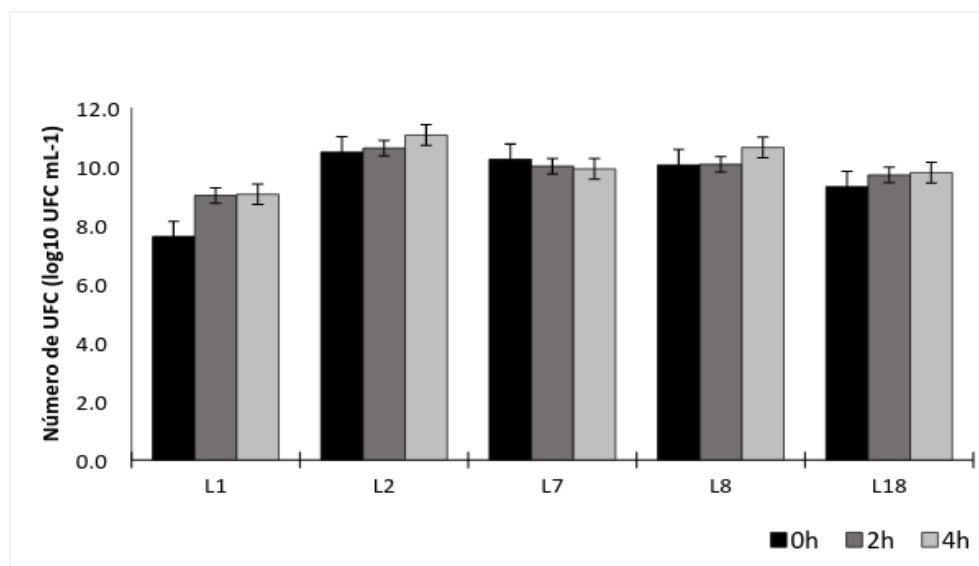


Figura 2 Número de células viáveis (log 10 UFC mL⁻¹) de bactérias ácido lácticas – BAL, incubadas por quatro horas, a 37 °C em aerobiose no tampão PBS acrescido de Ox bile

3.4 Suscetibilidade a Antibióticos

Todas as bactérias foram sensíveis à Penicilina, Ampicilina, Cefotaxima (inibidores da síntese da parede celular) e cloranfenicol (inibidor de proteínas). A cepa L2 apresentou maior sensibilidade sendo resistente apenas a Gentamicina, em geral, as cepas apresentaram resistência a dois tipos de antibióticos, exceto L7, resistente a quatro antibióticos (Tabela 3).

Tabela 3 Suscetibilidade de BAL¹ utilizando o método de difusão em disco após incubação de 24 h a 37°C em aerobiose.

Microrganismos ¹	Antibióticos ²										
	P	A	V	OXA	CTX	NX	C	E	CD	GEN	COT
L1	S	S	S	R	S	I	S	I	S	I	R
L2	S	S	S	I	S	S	S	I	S	R	S
L7	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R
L8	S	S	R	R	S	I	S	S	I	I	S
L18	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S

¹As zonas de inibição (mm) foram classificadas em: resistente R, intermediárias I e sensível S de acordo com a NCCLS 2015;

² P: Penicilina G (10 Unidades); A: Ampicilina (10 µg); V: Vancomicina (30 µg); OXA: Oxacilina, (1 µg); CTX: cefotaxima (30 µg); NX: Norfloxacin (10 µg); C: Cloranfenicol (30 µg); E: Eritromicina (15 µg); CD: Clindamicina (2 µg); GEN: Gentamicina (10 µg); COT: Co-trimoxazol (25 µg).

3.5 Antagonismo *in vitro*

Todas as bactérias apresentaram atividade antagonicas frente às bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria innocua*. As zonas de inibição foram superiores a 10mm, com exceção da L7 que apresentou em média halos de 8,67, o que não exclui sua atividade antagonica. As maiores zonas de inibição foram reveladas pela L8 sobre bactéria patogênica *Listeria innocua* (Tabela 4).

Tabela 4 Diâmetro dos halos de inibição *in vitro* de bactérias ácido lácticas (BAL) ¹ a *Klebsiella pneumoniae* (KP) e *Listeria innocua* (LI)

Microrganismos ²	Id	Diâmetro de halo (mm)	
		KP	LI
<i>L. plantarum plantarum</i>	L1	12,17 ^{bcA}	12,83 ^{bcA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L2	12,17 ^{bcA}	13,67^{abA}
<i>L. plantarum plantarum</i>	L18	14,67^{aA}	11,17 ^{cB}
<i>L. fermentum</i>	L7	10,17 ^{cA}	8,67 ^{dA}
<i>L. fermentum</i>	L8	13,50^{abB}	15,67^{aA}

¹Os resultados foram expressos em valor médio do diâmetro do halo de inibição *in vitro* entre antagonista e patógeno. Valores seguidos por letras em negrito representam os melhores valores de inibição;

²Médias na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, são significativamente diferentes entre si (p ≤ 0,01), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, em arranjo fatorial 5x5;

³Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas diferentes, são significativamente diferentes entre si (p ≤ 0,01), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, em arranjo fatorial 5x5.

As BAL's L1, L2 e L7 mantiveram um parâmetro de inibição similar quando comparadas às inibições desempenhadas sobre as patogênicas Gram positiva e Gram negativa. Destacaram-se, estatisticamente, L8 e L18 sobre *K. pneumoniae* e L2 e L8 sobre *L. innocua*, evidenciando a cepa L8 como antagonista efetiva sobre as duas cepas patogênicas.

3.6 Autoagregação

Os melhores percentuais de autoagregação foram observados nos intervalos de três a cinco horas, com destaque a L1 e L2. (Figura 4).

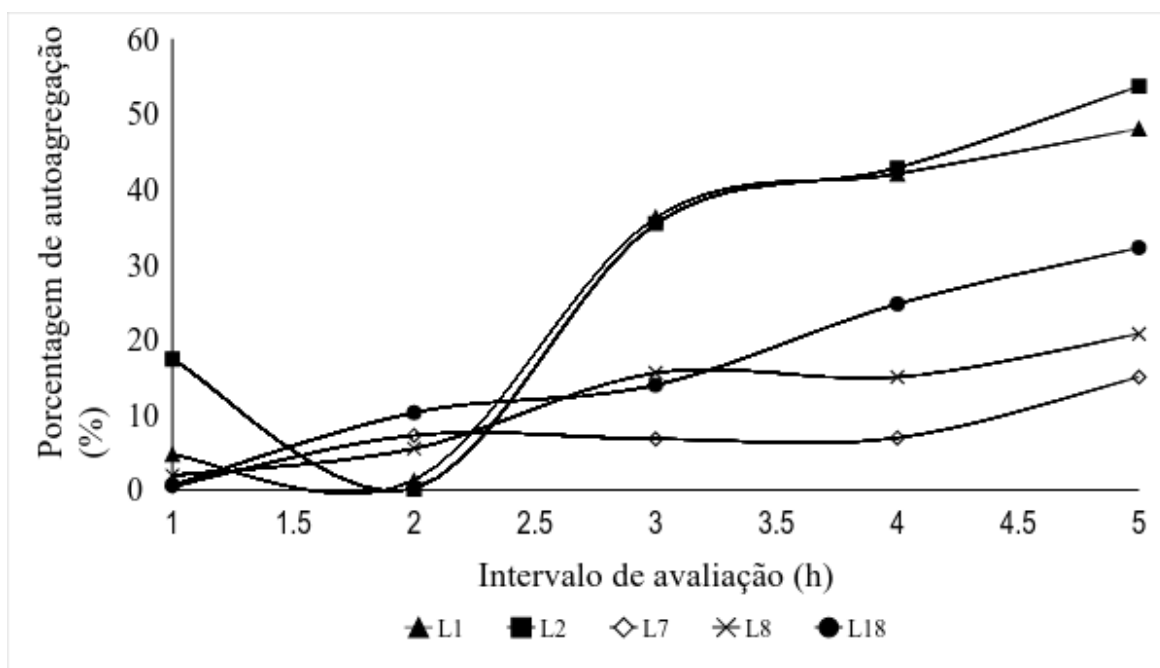


Figura 3. Percentual de autoagregação (%) de bactérias ácido lácticas – BAL, em solução tampão PBS à temperatura ambiente, durante cinco horas.

Em geral, as cepas apresentaram um comportamento crescente de autoagregação, a L7 apresentou um pequeno decréscimo na terceira hora, mas manteve-se estável nos outros intervalos.

3.7 Hidrofobicidade

Os resultados de Hidrofobicidade, segundo análise estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, revelaram que a maioria das cepas obtiveram valores médios de 20 a 30 % de adesão. Apenas L07 diferiu estatisticamente das demais, apresentando elevado índice

(acima de 70%) de adesão ao solvente Xilol, sendo caracterizada como hidrofóbica. (Figura 5).

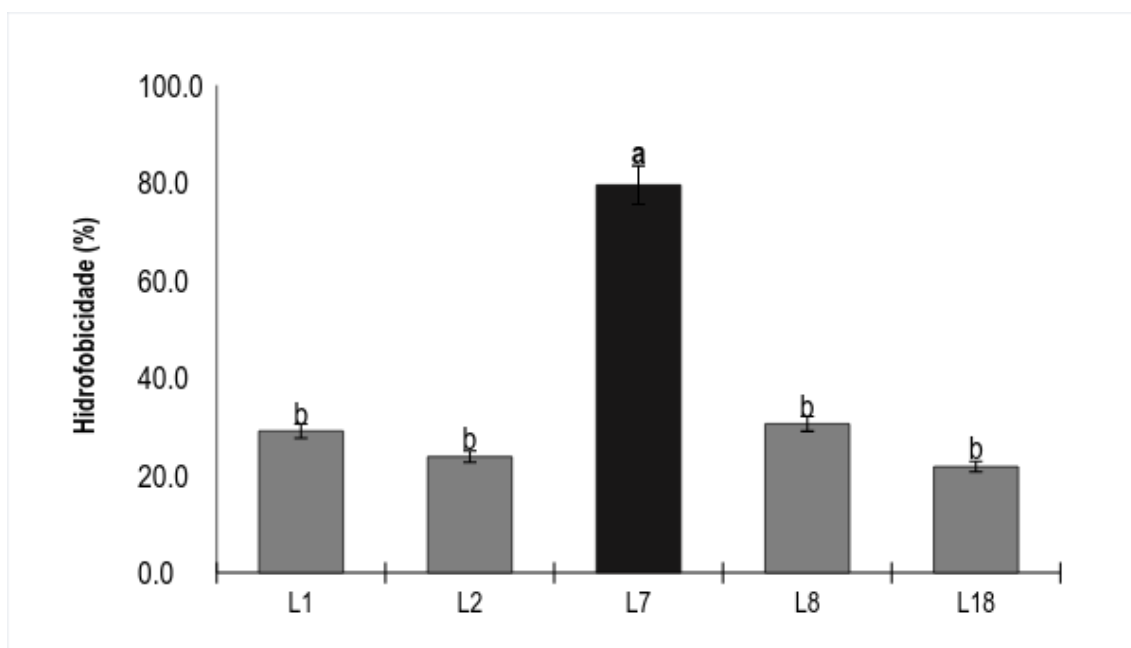


Figura 4. Percentual de adesão (%) das cepas de bactérias ácido lácticas - BAL, sob ação do Solvente xilol após duas horas de incubação, em temperatura ambiente.

4. Discussão

A caracterização das propriedades probióticas das BAL's foram baseados nos testes clássicos descritos na literatura tais como: sobrevivência ao pH baixo, resistência à bile e antibióticos; atividade antimicrobiana em relação aos microrganismos patogênicos, bem como em testes que remetem a capacidade de adesão à mucosa do intestino como os índices de auto agregação e hidrofobicidade.

Aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico, com pH em torno de 2,5, é segregado pelo nosso organismo durante a digestão, resultando na morte da maioria dos microrganismos ingeridos (Kimoto et al., 2000). Desta forma, a resistência ao suco gástrico, durante a digestão, é um importante critério de seleção de cepas probióticas (Avaiyarasi et al., 2016), pois a capacidade de resistir às condições ácidas no estômago e aos sais biliares no intestino delgado implica em uma alta probabilidade de sobrevivência no Trato Gastrointestinal- TGI (Saarela et al., 2000; Vinderola e Reinheimer, 2003).

Os resultados dos testes de seleção das BAL, sob concentrações de pH 2 e 3, apresentados na tabela 2, demonstraram que nenhuma das cepas apresentaram resistência

significativa quando expostas ao pH 2 e incubadas a 37°C por 24 h. Informações similares podem ser observadas em quatro horas de avaliação dos lactobacilos nos trabalhos de Makete et al. (2016); Gupta (1996), e Kumar, Kumar (2015). Duas cepas de *Lactobacillus* neste estudo foram classificadas como ácido tolerantes por ter apresentado percentual > 60%(Kumar, Kumar, 2015; Sieladie et al., 2011), duas ácidos tolerantes moderadas mostrando uma resistência de $\geq 12\%$ e $\geq 20\%$.

Na exposição a concentração de Ox bile 0,5 %, de forma generalizada, obteve-se as melhores taxas de tolerância, semelhantemente aos resultados obtidos por Makete et al, (2016).

Após a seleção das cepas de BAL, apenas três cepas de *Lactobacillus plantarum* (L1, L2 e L18) e dois do *Lactobacillus fermentum* (L7 e L8), foram submetidas aos demais testes por apresentarem os melhores resultados na exposição por 24h ao pH ácido e Ox bile. Esta seleção foi realizada com a finalidade de destacar, inicialmente, BAL's que melhor suportaram a essas condições de estresse (Bao et al, 2010).

Quando submetidas aos testes de viabilidade celular, após período de incubação em pH 2,5 por 1, 2 e 3 horas, as cinco cepas de Lactobacilos avaliadas apresentaram valores de crescimento semelhantes aos Lactobacilos observados por Argyri et al. (2012), e Zoumpopoulou et al., (2008). Entretanto, outros autores obtiveram um maior crescimento de células bacterianas quando expostas ao pH 3 (Kumar, Kumar, 2015; Handa e Sharma, 2016).

Idoui (2012), comparando cepas de Lactobacilos isolados do TGI de humanos, indica *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* como as melhores tolerâncias acídicas. No estudo realizado por Idoui et al. (2007), *Lactobacillus Plantarum* BJ0021 apresentou melhor resistência ao pH 3. É comum que as cepas de origem animal possam apresentar melhores características probióticas do que as cepas isoladas de outros ambientes, porque elas podem expressar melhor suas funções em um ambiente similar ao que foi originalmente isolada (Saarela et al., 2000).

A capacidade de tolerância à bile é outro fator importante, indispensável aos microrganismos probióticos, é, para que consigam sobreviver, se desenvolver e manter suas atividades no TGI (Dunne C. et al, 2001; Makete et al, 2016; Prasad J. et al, 1998). A bile é um componente tóxico e pode causar estresse oxidativo, embora a concentração da bile no organismo seja estática, variando de 1,5% a 2% na primeira hora de digestão, a média da bile no organismo é de 0,3% a 0,5% (p/v) (García-Ruiz et al., 2014) e o tempo de permanência é de 4 horas (Noriega et al., 2004). Em lactobacilos, e algumas BAL, por

exemplo, essa variabilidade da resistência deve-se à presença da Hidrolase Salina Biliar (BSH), uma enzima que atua na quebra dos sais biliares e reduz os efeitos tóxicos da bile conjugando (Toit et al., 1998).

Os resultados dos testes de viabilidade em exposição a 0,5% de Ox bile Bacteriological, durante 4 horas, indicam que as cinco cepas de *Lactobacillus* apresentaram tolerância significativa à bile, estes resultados estão de acordo com Casarotti et al, (2017); Bao et al, (2010) e Argyri et al., (2012). Gilliland (1979), relatou que os lactobacilos isolados de intestinos de animais mostraram alta tolerância a sais biliares quando comparados aos isolados de produtos lácteos. A capacidade de crescimento apresentada pelas duas cepas de *Lactobacillus fermentum*, utilizadas nesse estudo, pode ser comparado ao resultado obtidos por Lin et al. (2007), ao avaliar *L. fermentum* SGM3, isolado de frango.

Os *Lactobacillus*, utilizados neste estudo, apresentaram suscetibilidade variada aos antibióticos testados. Para algumas cepas probióticas, a resistência a determinados antibióticos pode ser considerada uma característica positiva (Charteris et al., 1998) quando esta cepa for coadministrada com um antibiótico ao qual seja resistente, essa característica garantirá sua sobrevivência e transferência dos efeitos benéficos ao receptor no TGI. (Shivram e Vishwanath, 2012; Dixit et al., 2013).

Todos os isolados de BAL avaliados por Makete et al. (2016), apresentaram resistência à gentamicina e vancomicina estes resultados foram semelhantes aos observados neste estudo, onde, pelo menos duas cepas, foram resistentes a ambos antibióticos. Vera-Pingitore et al (2016), indica como resistentes à gentamicina, estreptomicina e kanamicina as cepas *L. reuteri* Q221, *L. sakei* Q41 e *L. plantarum* Q8212 a, respectivamente.

A principal preocupação com a segurança no uso cepas probióticas à saúde, está relacionada com a possível transferência de genes resistentes a antibióticos para os microrganismos patogênicos presentes no habitat intestinal, o que pode representar um sério risco para o tratamento de pacientes infectados (Lee et al., 2014). Por outro lado, a resistência do gênero *Lactobacillus* à vancomicina e alguns outros antibióticos são intrínsecos, esses genes são codificados cromossomicamente, e não serão transferidos para os microrganismos patogênicos (Ammor et al., 2007; Honi et al., 2014). Vale ressaltar ainda, que em consideração a estes relatos, as cepas utilizadas neste estudo não apresentam riscos à saúde.

A atividade antibacteriana de BAL é habitualmente mais eficaz contra bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocitogenes* (Almeida Junior et al., 2015; Dias et al., 2015; Saraoui et al., 2016). Neste estudo, as BAL inibiram o crescimento tanto Gram positiva

quanto Gram negativa, sendo esses resultados semelhante aos relatados por Jones et al. (2009); Calix-Lara et al. (2014) e Olnood et al. (2015). Pode-se assumir que as atividades antagonistas das BAL's, observadas neste trabalho foram significativas, e apresentaram valores de zonas de inibição superiores, quando comparadas aos microrganismos estudados por Ferrari et al., (2016), García-Almendaréz (2008) e Azat et al., (2017).

As expressões de ações antagônicas, mesmo entre cepas de uma mesma espécie, podem ser complexas e variáveis. Casarotti et al. 2017, avaliando o antagonismo de *Lactobacillus fermentum* (SJRP30), *Lactobacillus casei* (SJRP37, SJRP66, SJRP141, SJRP145, SJRP146 e SJRP169) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* sobre *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, verificou que nenhum de seus isolados apresentaram atividade antimicrobiana. Enquanto que a média dos halos inibição produzidos pelas cepas de Lactobacilos utilizadas no trabalho de Shekh et al. (2016), variou entre 27 a 30 mm para *L. monocytogenes* e *K. pneumoniae*, respectivamente.

As BAL que possuem características antagônicas são extremamente importantes para a saúde, pois podem atuar como agentes inibitórios de infecção gastrointestinal (Kanmani et al., 2013). A capacidade de inibir agentes patogênicos pode ser explicada pela produção de compostos antimicrobianos, que, segundo Amenu (2013), deve-se, principalmente, à produção de metabólitos, como o ácido láctico, o ácido acético e as bacteriocinas.

A autoagregação é uma importante característica probióticas, altamente relacionada à capacidade de formar biofilmes durante a passagem pelo TGI, bem como a capacidade de colonização e a maior resistência a possíveis remoções causadas pelos movimentos peristálticos (Vizoso-Pinto et al., 2006; Jones e Verasolvic, 2009).

A autoagregação varia significativamente com o tempo, o *L. pentosaceus* e *L. fermentum*, analisados por Han et al. (2017), agregaram rapidamente entre as 4 primeiras horas, entretanto, cepas de *Lactobacillus plantarum* agregaram entre 4 e 8 horas após a incubação. García-Cayuela et al. (2014), Gil-Rodríguez et al. (2015) e Peres et al. (2014), também mostraram que autoagregação aumenta proporcionalmente ao tempo de incubação.

Os percentuais de autoagregação, observados neste estudo, assemelham-se aos descritos por Shekh et al. (2016), demonstrando que a capacidade de agregação aumentou significativamente com o tempo, de 1 a 19%, em duas horas; 5 a 46%, em 4 horas e 33 a 92%, em 24 h. Ainda nos ensaios de Shekh et al. (2016), *Lactobacillus rhamnosus* GG,

Lactobacillus plantarum , cepas RC e OR, exibiram 86, 85 e 92% de autoagregação, respectivamente, após 24 h a 37 ° C. Ramosa et al., 2013, mostrou a alta capacidade de autoagregação de *L. plantarum* SAU96 e *L. fermentum* CH58 (61,9 e 55,1%, respectivamente ($p < 0,05$), em comparação com os outros isolados que apresentam apenas autoagregação moderada (12,1 e 21,0 %).

A capacidade de aderência entre células está relacionada à carga da superfície celular e à hidrofobicidade das bactérias, e a capacidade de aderir aos hidrocarbonetos também pode ser expressa como a hidrofobicidade da superfície celular (Ehrmann et al., 2002). A hidrofobicidade da parede celular oferece uma vantagem competitiva no processo de adesão de BAL e pode ser considerada como um fator crítico no processo de aderência dessas bactérias às células epiteliais intestinais humanas (García-Cayuela et al., 2014).

O percentual de hidrofobicidade desempenhado pelas BAL's utilizadas neste trabalho foi moderado, entre 20 a 30%, com exceção da cepa de *L. Fermentum* L7 que apresentou um alto grau de hidrofobicidade. Estes resultados estão de acordo com Lee e Yii (1996) e García et al., (2017).

Ao estudar a hidrofobicidade de BAL em solventes Han et al. (2017), observou que a maioria das BAL, que apresentaram alta hidrofobicidade, também apresentaram alto índice de adesão a células Caco-2. A hidrofobicidade não é o único fator influente na adesão de BAL (García-Cayuela et al., 2014), esta assertiva retrata o comportamento de *L. fermentum*, que mesmo apresentando baixa hidrofobicidade, não diferenciou das outras 3 cepas que apresentaram maior adesão (*P. pentosaceus* R1, *L. plantarum* ou *L. pentosaceus*), segundo resultados obtidos por Han et al. (2017).

5. Conclusões

Bactérias ácido lácticas, isoladas de queijo de coalho artesanal do sertão paraibano, apresentam características favoráveis, *in vitro*, que as tornam promissoras candidatas à aplicações probióticas.

As cinco cepas selecionadas, variam quanto suas características probióticas e nenhuma delas apresentaram o melhor desempenho na totalidade das propriedades avaliadas. De forma

geral, *L. plantarum* (L2) e *L. fermentum* (L8), obtiverem melhores propriedades probióticas, incluindo tolerância ácida e a bile, propriedade antimicrobiana e autoagregação.

Para assegurar o potencial probiótico, visando aplicações biotecnológicas e industriais, as cepas devem ser submetidas a testes minuciosos de viabilidade e comprovação de benefícios à saúde humana.

6. Referencias

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 316-325.
- Almeida Junior, W.L., Ferrari, I.S., Souza, J.V., Silva, C.D.A., Costa, M.M., Dias, F.S., 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food control*. 53, 96e103.
- Amenu, D., 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.*, 1(6):278-284.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., Mayo, B., 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 24(6), 559-570.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2012). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291.
- Astashkina, A. P., Khudyakova, L. I., Kolbysheva, Y.V., 2014. Microbiological quality control of probiotic products. *Procedia Chemistry*, 10, 74-79.
- Avaiyarasi, N. D., Ravindran, A. D., Venkatesh, P. Arul V., 2016. In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control* 69, 124 e133.
- Azat, R., Yan LIU., Wei LI., Abdurihim KAYIR., Ding-bo LIN., Wen-wen ZHOU., Xiao-dong ZHENG., 2016. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 17(8):597-609.
- Bakr S. A., 2015. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4, 423–431.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Zhang, H., 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-701.
- Calix-Lara, T.F., Rajendran, M., Talcott, S.T., Smith, S.B., Miller, R.K., Castillo, A., Sturino, J.M., Taylor, T.M., 2014. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on

spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. Food Microbiol. 38, 192e200.

Casarotti S.N., Carneiro B.M., Todorov S.D., Nero L.A., Rahal P., Penna A.L.B., 2017. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. Ann Microbiol.

Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K., 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species, J. Food Prot. 61 (12) 1636e1643

Dias, F.S., Santos, M.R.R.M., Schwan, R.F., 2015. Enumeration, identification and safety proprieties of lactic acid bacteria isolated from pork sausage. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot 67, 918e926

Dixit G., Samarth D., Tale V., Bhadekar R., 2013. Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains, Eurasian J. Biosci. 7: 1 e 9.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Kiely, B., 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. The American journal of clinical nutrition, 73(2), 386s-392s.

Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., Vogel, R.F., 2002. Characterization of *Lactobacilli* towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology, 92, 966–975.

Ferrari S.I., Souza, J. V., Ramos, C. L., Costa, M. M., Schwan, R. F., Dias, F.S., 2016. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. Food microbiology, 60, 29-38.

Foligné, B., Parayre, S., Cheddani, R., Famelart, M. H., Madec, M. N., Plé, C., Deutsch, S. M., 2016. Immunomodulation properties of multi-species fermented milks. Food microbiology, 53, 60-69.

García, A., Navarro, K., Sanhueza, E., Pineda, S., Pastene, E., Quezada, M., González, C., 2017. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. Electronic Journal of Biotechnology, 25, 75-83.

García-Almendárez, B. E., Cann, I. K., Martin, S. E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C., 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control, 19(7), 670-680.

García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., de Cadiñanos, L. P. G., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. Food research international, 57, 44-50.

García-Ruiz A, González de Llano D., Esteban-Fernández A., Requena T., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V., 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiol 44:220–225.

Gilliland S.E., 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and human: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts, J. Food Prot. 42: 164 e167.

- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., Requena, T., 2015. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 1156–1162.
- Guedes Neto, L., Souza, M. R., Nunes, A. C., Nicoli, J. R., Santos, W. L. M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(supl 2), 245-250.
- Gupta, P.K, Mital, B.K, Garg, S.K., 1996. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. *Int J FoodMicrobiol* 29:105–109.
- Han Q., Kong B., Chen Q., Sun F., Zhang H., 2017. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods* 32: 391–400.
- Handa S., Sharma N., 2016. In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 14: 91–97.
- Hashemi, S. M. B., 2016. Chapter 14 - Probiotic Lactobacillus Strains from Traditional Iranian Cheeses A2 - Watson, Ronald Ross. In: PREEDY PREBIOTICS, AND SYNBIOTICS, V. R. B. T.-P. (Ed.) [s.l.] Academic Press, p. 215–225
- Honi, U., Sabrin, F., Islam, T., Islam, E., Billah, M., Islam, K. D., 2014. Enzymatic activity and antibiotic resistance profile of *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*- 1 isolated from regional yogurts of Bangladesh. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 3(3), 235e239.
- Idoui T., 2012. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from human gut, *TOJSAT*. 2: 47 e 51.
- Idoui T., Leghouchi E., Karam N.E., 2007. Selection of *Lactobacillus plantarum* BJ0021 for rabbit probiotic adjuncts, *Int. J. Prebiotics Probiotics* 2: 188 e 193.
- Jones, R.J., Zagorec, M., Brightwell, G., Tagg, J.R., 2009. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during pro-longed storage. *Food Microbiol.* 26, 876e881.
- Jones, S. E., Versalovic, J., 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 9,35.
- kanmani P, kumar R. S., Yuvaraj N., Paari k. A., Pattukumar V., Arul V., 2013. Probiotics and Its Functionally Valuable Products—A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:6, 641-658.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M., e Okamoto, T., 2000. In vitro studies on probiotic properties of Lactococci. *Milchwissenschaft*, 55(5), 245 e249.
- Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S., 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.

- Kumar A., Kumar D., 2015. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe* 33: 117e123
- Lee K.W, Park J.Y, Sa H.D, Jeong J.H, Jin D.E, Heo H.J, Kim J.H., 2014 Probiotic properties of *Pediococcus* strains isolated from jeotgals, salted and fermented Korean sea-food. *Anaerobe* 28:199–206.
- Lee, K.-K., Yii, K.-C., 1996. A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 343-346
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., e Tsen, H. Y., 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3–4), 107–113.
- Makete, G., Aiyegoro, O. A., Thantsha, M. S. (2016). Isolation, identification and screening of potential probiotic bacteria in milk from South African Saanen goats. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-9.
- Medeiros, R. S., Araújo, L. M., Queiroga Neto, V., Andrade, P. P., Melo, M. A., Gonçalves, M. M. B. P. 2016. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. *CyTA-Journal of Food*, 14(4), 613-620.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., 2004. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1), 79–86.
- Olnood, C.G., Beski, S.S.M., Choct, M., Iji, P., 2015. Use of *Lactobacillus johnsonii* in broilers challenged with *Salmonella* sofia. *Anim. Nutr.* 1, 203e212.
- Peres, C. M., Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M. R., Malcata, F. M., 2014. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 234–246.
- Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK., 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *Int Dairy J* 8:993–1002.
- Ramosa C.L., Thorsen L., Schwana R.F., Jespersen L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology* 36: 22 e 29.
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., Wani, S. M., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E., 1980 Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29–33.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Matilla, S.T., 2000. Probiotic bacteria, safety, function and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197–215.

- Salminen, S., Kneifel, W., Ouwehand, A. C., 2016. Probiotics: Application of probiotics in dairy products: Established and potential benefits. Reference module in food science Elsevier.
- Saraoui, T., Fall, A.P., Leroi, F., Antignac, J.P., Chereau, S., Pilet, M.F., 2016. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Food Microbiol. 53, 70 e 78.
- Sharma P, Tomar SK, SangwanV., Goswami P., Singh R., 2015. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. J Food Saf 36: 38–51
- Shekh S. L., Dave J. M., Vyas B.R.M., 2016. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and g-amino butyric acid production. LWT - Food Science and Technology 74. 234 e 241.
- Shivram, P.L., Vishwanath, P.P., 2012. Assessment of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. isolated from cheese and preparation of probiotic ice cream, Int. J. Res. Ayurveda Pharm. 3 (4) 532e536.
- Sieladie D.V., Zambou N.F., Kaktcham P.M., Cresci A., Fonteh F., 2011. Probiotic properties of *Lactobacilli* strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon, Innov. Rom. Food Biotechnol. 9: 12e28.
- Silva, F. D. A. S., & de Azevedo, C.A.V., 2016. The Assistat software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. African Journal of Agricultural Research, 11(39), 3733-3740.
- Thirabunyanon, M., Thongwittaya, N. 2012. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. Research in veterinary science, 93(1), 74-81.
- Toit M. D., C. Franz, M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger U., Haberer P., Warlies B., Ahrens F., Holzapfel W.H., 1998. Characterisation and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. International Journal of Food Microbiology 40: 93–104.
- Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Cerri, D., 2013. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29(10), 1913-1922.
- Vera-Pingitore, E., Jimenez, M. E., Dallagnol, A., Belfiore, C., Fontana, C., Fontana, P., Plumed-Ferrer, C., 2016. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. LWT-Food Science and Technology, 71, 288-294.
- Vinderola, C. G., Reinheimer, J. A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36 (9 e 10), 895 e 904.
- Vizoso-Pinto, M., Franz, C., Schillinger, U., Holzapfel, W., 2006. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology, 109, 205 e 214.

Wayne, P. A. (2015). CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, Clinical and Laboratory Standards Institute.

Zhang, Z., Tao, X., Shah, N. P., Wei, H., 2016. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. *Journal of dairy science*, 99(4), 2666-2674.

Zoumpopoulou G., Foligné B., Christodoulou K., Granette C., Pot B., 2008. Effie Tsakalidou *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology*.

4. CONCLUSÃO

As Bactérias Ácido Láticas *L. plantarum* (L2) e *L. fermentum* (L8) utilizadas neste foram capazes de resistir ao pH Baixo, se desenvolverem na presença de bile, assim como produzir substâncias que inibiram o desenvolvimento das bactérias patogênicas *Klebsiella pneumoniae* e *Listeria innocua* e apresentaram um bom potencial de autoagregação.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho as Bactérias isoladas de queijo de Coalho da Paraíba podem desempenhar excelentes atividades biotecnológicas por apresentam características probióticas interessantes ao mercado atual.

O estudo da diversidade microbiana de queijos de coalho deve ser considerado como um fator essencial na qualidade biotecnológica deste produto, pois, a microbiota natural a ele empregada conferem excelentes benefícios aos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ABUSHELAIBI, A.; AL-MAHADIN, S.; EL-TARABILY, K.; SHAH, N. P. Mutamed Ayyash Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. **LWT - Food Science and Technology**, v 79, p. 316-325, 2017.
- AMARANTE, J.O. **Queijos do Brasil e do Mundo: para iniciantes e apreciadores**, Mescla, 2015.
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probiotics: health promoting agents. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, v 1, p.287-318, 2004.
- BJOKROTH, K. J.; SHCILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B., HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52. p.141-148, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de (2001). Anexo II- Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº135-E, segunda-feira, 16 de julho de 2001.
- BURGAIN, J; SCHER, J; FRANCIUS, G; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOL-JUNELLES, A. M.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in colloid and interface science**, v. 213, p. 21-35, 2014.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.
- CARVALHO, J. D. G. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.182 f. **Tese (Doutorado)** - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.
- CASAROTTI S. N; CARNEIRO B. M; TODOROV S. D; NERO L. A; RAHAL P; PENNA A.L.B. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 289-301, 2017.
- CHIANG, S. S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n.3, p. 903-916, 2012.

- CHUA, K. J.; KWOK, W. C.; AGGARWAL, N.; SUN, T.; CHANG, M. W. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 40, p. 8-16, 2017.
- COSTA, E. S; VARAVALLO, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**. V.4. N.2.2011.
- DOMINGO, J.J.S. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 40, n. 6, p. 417-429, 2017.
- EPIFANIO, M. Prebióticos e probióticos nas fórmulas infantis: o que temos de evidência? **Boletim Científico de Pediatria**, v.1, n. 1, p. 8-12, 2012.
- FAIRFAX, MARILYNN R.; LEPHART, PAUL R.; SALIMNIA, Hossein. *Weissella confusa*: problems with identification of an opportunistic pathogen that has been found in fermented foods and proposed as a probiotic. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.
- FONTÁN, M. 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**, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2001.
- FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. **A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados** (eds Tondo. E. C.). Artmed Editora. pp. 132-147, 2002.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. **Fundamentals of cheese science**. 2000.
- FRAQUEZA J. M. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International journal of food microbiology**, v. 212, p. 76-88, 2015.
- FULLER, R. probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FUSCO, V.; QUERO, G. M.; CHO, G. S.; KABISCH, J.; MESKE, D.; NEVE, H.; FRANZ, C. M. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- GARCIA, M. T.; CANAMERO, M. M.; LUCAS, R.; OMAR, N. B.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **International Journal Food Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 161-170, 2004.
- GHEYTANCHI, E.; HESHMATI, L.; SHARGH, B.K.; NOWROOZI, J.; MOVAHEDZADEH, F. Study on b-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 454-458, 2010.
- HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The genus *Streptococcus*. In: The genera of lactic acid bacteria. **Springer US**, 1995. p. 55-124. Hassan, A. N., Frank, J. F. 2001.
- HASSAN, A. N.; FRANK, J.F. Starter cultures and their use. **FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-**, p. 151-206, 2001.

- HENG, N.C.K.; YEH, CHIA-WEN.; AMARILA M. Draft Genome Sequence of *Weissella confusa* MBF8-1, a Glucansucrase-and Bacteriocin-Producing Strain Isolated from a Homemade Soy Product. **Genome announcements**, v. 5, n. 4, p. e01497-16, 2017.
- HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. (New York, NY: Wiley-Blackwell), 632, 2014.
- JOINT, FAO/WHO. working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London, Ontario, Canada**, v. 30, 2002.
- KULLEN, M. J.; SANOZKY-DAWES, R.B.; CROWELL, D.C.; KLAENHAMMER, T.R. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 3, p. 511-516, 2000.
- KYUNGWHA, L.; AZLIN, M. Inhibition of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 89- 94, 2007.
- LILLY, D, M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.
- 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 Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p. 266-272, 2009.
- LOPEZ-DIAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMAN, C.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p.23-32, 2000.
- LUÍZ, Y. **Geografia-nos caminhos da Paraíba** (3th ed.). João Pessoa, PB: Vento Nordeste, 2014.
- MANGIAPANE, E.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, A.; SVENSSON, B.; RIEDEL, K.; PESSIONE, E. Ten years of subproteome investigations in lactic acid bacteria: A key for food starter and probiotic typing. **Journal of Proteomics** v. 127, p. 332–339. 2015.
- MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1, p. 133-140, 2003.
- MEDEIROS, R. S. Parâmetros de qualidade do Queijo de Coalho produzido na Paraíba: indicadores químicos e microbiológicos. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa. 2016.
- MICHEL, V.; MARTLEY, F. G. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese—production and fate of galactose. **Journal of dairy research**, v. 68, n. 2, p. 317-325, 2001.
- OH, N. S.; JOUNG, J. Y.; LEE, J. Y.; KIM, S. H.; KIM, Y. Characterization of the microbial diversity and chemical composition of Gouda cheese made by potential probiotic strains as an

adjunct starter culture. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 39, p. 7357-7366, 2016.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. In: **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. Springer Netherlands, 2002. p. 279-289.

PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. M. Plasmid transformation of *Weissella paramesenteroides* DX by electroporation. **Anaerobe**, v. 30, p. 60-64, 2014.

PRIYODIP, P.; PRAKASH, P. Y.; BALAJI, S. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. **Indian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2017.

RATHER, S. A.; AKHTER, R.; MASOODI, F.A., GANI, A.; WAN S.M. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT-Food Science and Technology**, v. 83, p. 50-58, 2017.

REIS, S.A.; CONCEIÇÃO, L. L.; SIQUEIRA, N. P.; ROSA, D. D.; SILVA, L. L.; PELUZIO M. C. G. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. **Nutrition Research**, v. 37, p. 1-19, 2017.

RUTAVA, S.; WALKER, W. In: Nutrition and Health: Probiotics in Pediatric Medicine (Michail S and Sherman PM, ed), **Humana Press**. p 41-52.. 2009

SAUER, M.; RUSSMAYER, H.; GRABHERR, R.; PETERBAUER, C. K.; MARX, H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, 2017.

SDA. 2001. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, Queijo de Coalho e queijo Manteiga**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.13, 16 de julho de 2001.

SETTACHAIMONGKON, S.; VALENBERG, V.H. J.; GAZI, I., NOUT, M. R.; HOOIJDONK, V.T. C.; ZWIETERING, M. H.; SMID, E. J. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. **Food microbiology**, v. 59, p. 14-22, 2016.

SHEKH, S. L.; DAVE, J. M.; VYAS, B. R. M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and g-amino butyric acid production, **LWT - Food Science and Technology**, v 74, p, 234-241, 2016.

SHORI, A. B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423-431, 2015.

SINGH, B.; MAL, G.; MAROTTA, F. Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. **Trends in Biotechnology**, 2017.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology** v. 61, p 33 – 49, 2017.

TAMANG J.P.; SHIN D. H.; JUNG S. J.; CHAE, S.W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

VASILJEVIC, Todor; SHAH, Nagendra P. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

WALTHER, C; ROSSANO, A; THOMANN, A; PERRETEN, V. Antibiotic resistance in *Lactococcus* species from bovine milk: presence of a mutated multidrug transporter mdt (A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. **Veterinary microbiology**, v. 131, n. 3, p. 348-357, 2008.

ZOUMPOPOULOU, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E.; PAPADIMITRIOU, K. Beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 46-60, 2017.

FOOD MICROBIOLOGY



TABLE OF CONTENTS

Description

Impact Factor

Abstracting and Indexing

Editorial Board

Guide for Authors

ISSN: 0740-00

DESCRIPTION

Food Microbiology publishes original research articles, short communications, review papers, letters, news items and book reviews dealing with all aspects of the **microbiology of foods**. The editors aim to publish manuscripts of the highest quality which are both relevant and applicable to the broad field covered by the journal. Studies must be novel, have a clear connection to **food microbiology**, and be of general interest to the international community of food microbiologists. The editors make every effort to ensure rapid and fair reviews, resulting in timely publication of accepted manuscripts.

Papers relating to the following topics will be considered:

Physiology, genetics, biochemistry, and behavior of **microorganisms** that are either used to make foods or that represent safety or quality problems

Effects of preservatives, processes, and packaging systems on the microbiology of foods

Methods for detection, identification and enumeration of foodborne microorganisms or **microbial toxins**

Microbiology of **food fermentations**

Predictive microbiology

Microbial ecology of foods

Microbiological aspects of **food safety**

Microbiological aspects of food **spoilage** and **quality**

Database coverage includes Biological Abstracts (BIOSIS); Chemical Abstracts; Current Contents/ Agriculture, Biology, and Environmental Science; Dairy Science Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Maize Abstracts; and Research Alerts.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please [click here](#) for more information on our author services .

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

IMPACT FACTOR

2016: 3.759 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of article

Original **research papers** for *Food Microbiology* should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short **research notes** describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short **reviews** on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the Editor before preparing a manuscript. **Book reviews** and **letters to the editor** are welcome.

Questions regarding content of a proposed submission may be sent to the Chief Editor:

M.L. Tortorello

US Food and Drug Administration

National Center for Food Safety and Technology 6502 S. Archer Road

Summit-Argo, IL 60501, USA Fax: +1(708) 728 4177

E-mail: mlt@cfsan.fda.gov

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

E-mail address

Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

Include keywords

All figures (include relevant captions)

All tables (including titles, description, footnotes)

Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts* / *Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare

Journal policies detailed in this guide have been reviewed

Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.

No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Additional information

Nomenclature and Descriptions of Organisms

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address')

may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork *Electronic artwork General points*

Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

Embed the used fonts if the application provides that option.

Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.

Number the illustrations according to their sequence in the text.

Use a logical naming convention for your artwork files.

Provide captions to illustrations separately.

Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

Supply files that are too low in resolution;

Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Appropriate indications of replication and variability should be included.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeg W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from

these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-microbiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

Two authors: both authors' names and the year of publication;

Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.
Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link

articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive Phylogenetic Trees

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. More information.

R code viewer

You can enrich your online article by including R code and underlying data sets, which will be displayed in your article on ScienceDirect. All R code and data files should be submitted as part of a single ZIP file. This ensures the code and data files that depend on each other are stored and made available together. R code should be saved as a plain text ASCII file. In your manuscript, you can indicate where the material should appear in

the article, by including a note such as "Insert file Rcode.ZIP here". When your article is published on ScienceDirect, readers will be able to interactively explore highlighted R code next to the article page. More information.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>