

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

THICIANE CARVALHO DE ALBUQUERQUE

Isolamento, seleção e caracterização de Enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil

Recife

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

THICIANE CARVALHO DE ALBUQUERQUE

Isolamento, seleção e caracterização de enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Recife

2014

Ficha catalográfica

A345i Albuquerque, Thiciane Carvalho de
Isolamento, seleção e caracterização de Enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de coalho artesanal produzido nos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil / Thiciane Carvalho de Albuquerque. – Recife, 2014.
148 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Inclui referências e anexo(s).

1. Queijo de colho artesanal 2. Bactérias ácido lácticas
3. Bacteriocinas 4. Enterocinas I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 636.089

THICIANE CARVALHO DE ALBUQUERQUE

Isolamento, seleção e caracterização de enterococos produtores de enterocinas isolados do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Tese defendida e aprovada em 21 de Fevereiro de 2014

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora) - UFRPE

Dr^a Cynthia de Oliveira Nascimento - PNPB / UFRPE

Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki – UNICAP

Prof^a Dr^a Keila Aparecida Moreira - UAG/UFRPE

Prof^a Dr^a Tatiana Souza Porto - UAG/UFRPE

“Senhor,

Eu sei que me conheces e sabes dos meus problemas.

Eu sei que me acompanhas mesmo quando eu me perco.

Eu sei que quando tudo me falta o Senhor está comigo.

Eu sei que Tu me deste uma mãe, Maria.

A Tua mãe é a minha mãe.

Maria, na simplicidade de sua presença, nunca esteve ausente.

Nos momentos em que a angústia atormentava as celebrações da vida,

ela soube reconhecer e interceder.

Por isso eu peço, ó Mãe intercede por mim.

Quando alguma coisa acabar, intercede por mim.

Quando alguma coisa faltar, intercede por mim.

Quando eu pecar, intercede por mim.

Quando eu deixar de amar, intercede por mim.

Senhor amado, obrigado pela mãe que nos destes.

É mais uma prova de Teu imenso amor.

Cuida de nós.

Amém.”

Pe. Marcelo Rossi

DEDICATÓRIA

À minha mãe Fátima
Aos meus saudosos Avós Jorge e Edna
Ao meu marido Luiz
Aos meus filhos Puppy e Ringo
À minha irmã Thâmisa
À minha sobrinha Sophie

Porque família é tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo seu amor incondicional;

A minha amada Mãe, Maria de Fátima por todo amor, dedicação e educação;

A meus saudosos avós, Edna e Jorge;

.

A Luiz, luz da minha vida;

Às Thâmisa e Sophie, minhas amadas irmã e sobrinha;

Aos meus amados Puppy, Pequeno, Ringo, Miu, Zig, Xing;

A minha Orientadora Prof^a Ana Lúcia Figueiredo Porto e Co-orientadora Prof^a Taciana Cavalcanti Soares pela oportunidade, confiança e orientação;

Aos Componentes examinadores da Banca examinadora de Qualificação e Defesa, por todas as valiosas contribuições;

Aos amigos do LABTECBIO e CENAPESQ, em especial a equipe do Queijo de Coalho, cuja colaboração foi fundamental para a finalização deste trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, e todos os amigos de turma do Doutorado;

A UFRPE, minha segunda casa, que me acolheu tão bem desde 2001

A FACEPE, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	Vii
ABSTRACT	Viii
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Queijos	24
3.1.1 Queijos artesanais	25
3.1.2 Queijo de Coalho	29
3.1.2.1 Identidade e qualidade do queijo de Coalho	31
3.1.2.2 Perfil microbiano láctico do queijo de Coalho	34
3.2 Bactéria Ácido Lácticas	35
3.2.1 Enterococos	37
3.3 Bacteriocinas	39
3.3.1 Classificação das bacteriocinas	42
3.3.2 Aplicação das bacteriocinas em alimentos	46
3.3.3 Enterocinas	49
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
5. ARTIGOS	75
CAPÍTULO I. Perfil da microbiota láctica endógena do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde - PE, Brasil.	76
CAPÍTULO II. Atividade antagonista de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> isolados do queijo de Coalho artesanal dos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil.	93
CAPÍTULO III. Produção e caracterização de enterocinas obtidas a partir do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil.	105

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	131
6.1 Conclusão Geral	132
6.2 Sugestões para trabalhos futuros	134
7. Anexo – Notas para autores	135

LISTA DE ABREVIATURAS

ACNFP - *Advisory Committee on Novel Foods and Processors*

ADAGRO - Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco

ADPIC - Acordo sobre Aspectos Direitos de Propriedade Intelectuais Relacionados ao Comércio

APL - Arranjos Produtivos Locais

APT - *All Purpose Medium With Tween*

ATCC - American Type Culture Collection

BAL - Bactéria Ácido Láctica

CENAPESQ - Centro de Apoio a Pesquisa da UFRPE

DO - Denominação de Origem

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESPM - Estudos e Negócios do Varejo do SEBRAE

FDA - *Food and Drug Administrativo*

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GRAS - *Generally Recognized As Safe*

IG - Indicação Geográfica

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária

IN - Instrução Normativa

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IP - Indicação de Procedência

IPA - Instituto de Pesquisas Agropecuária do Estado de Pernambuco

ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco

LABTECBIO - Laboratório de Tecnologia de Bioativos

LDR - Leite desnatado reconstituído

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MRS - *Man, Rogosa e Sharpe*

OMC - Organização Mundial do Comércio

SEBRAE - Serviço Brasileiro de apoio a micro e pequenas empresas

SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

SECTMA - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente

TRIPS - *Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights*

TSB - Caldo triptona de Soja

UA - Unidade Arbitrária

UFC - Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	Pg
Figura 1. Fluxograma de produção do queijo de Coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil (NETO, 2010).	33
Figura 2. Mecanismos de atuação das bacteriocinas que podem contribuir para a funcionalidade de Probióticos. Facilitando a introdução e / ou domínio de um produtor num nicho já ocupado através da eliminação de patógenos, atuando como peptídeos colonizadores e sinalizadores (DOBSON, 2011).	41
Figura 3. Modo de ação de bacteriocinas de Bactérias Ácido Láticas (COTTER, HILL E ROSS, 2005).	44
Figura 4. Evolução do uso da Nisina, desde sua descoberta até sua comercialização (COTTER, 2005).	48
5. ARTIGOS	
CAPÍTULO I	
Figura 1. Morfologia das Bactérias Ácido Láticas (BAL) isoladas de queijo de Coalho artesanal, produzidos em Cachoeirinha e Arcoverde – Pernambuco, Brasil, “ <i>sur-plate</i> ” no meio All Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “ <i>pour-plate</i> ” no meio Man, Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), nas temperaturas de 30 e 42°C. Morfologia de Cocos (■) e morfologia de bacilos (□).	83
Figura 2. Frequência dos gêneros de Bactérias Ácido Láticas (BAL) isoladas de queijo de Coalho artesanal, produzido em Cachoeirinha e Arcoverde – PE, “ <i>sur-plate</i> ” no meio All Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “ <i>pour-plate</i> ” no meio Man, Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), nas temperaturas de 30 e 42°C. <i>Enterococcus</i> (■), <i>Streptococcus</i> (■), <i>Lactococcus</i> (■), <i>Lactobacillus</i> (■), <i>Leuconostoc</i> (□)	85

Figura 3. Perfil microbiano láctico dos Queijos de Coalho Artesanais produzidos em Cachoeirinha e Arcoverde – PE. *Enterococcus* (■), *Streptococcus* (■), *Leuconostoc* (■), *Lactococcus* (■), *Lactobacillus* (■).

87

CAPÍTULO III

Figura 1. Quantificação* da atividade antimicrobiana (UA/mL)** das enterocinas produzidas por *E. faecalis* (A) e *E. faecium* (B), isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (■).

116

Figura 2. Atividade antimicrobiana residual (%) após tratamento térmico* de enterocinas produzidas por *Enterococcus faecalis* (A) e *E. faecium* (B) isolados do queijo de Coalho de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (■).

118

Figura 3. Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por *Enterococcus faecalis* (A) e *E. Faecium* (B) isolados do queijo de Coalho de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, estocadas por dois meses sob refrigeração*(4°C), frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (■).

119

Figura 4. Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, em estoque congelado (-20°C)* frente as bactérias indicadoras *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (■).

120

Figura 5. Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, em variados pH, frente as bactérias indicadoras *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□).

Figura 6. Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por *Enterococcus faecalis* (A) e *E. faecium* (B) isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, submetidas a presença de Lisozima (à 0,1mg/ML e 1mg/mL), frente as bactérias indicadoras *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□).

LISTA DE TABELAS

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.	37
Tabela 2. Presença enterococos em queijos de diferentes origens e tipos de leite.	38
Tabela 3. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos (Adaptado de ROSA, FRANCO, 2002).	40
Tabela 4. Classificação das Bacteriocinas segundo Klaenhammer (1993)	43
Tabela 5. Estudos envolvendo enterocinas de diferentes origens de isolamento	50

5. ARTIGOS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Bactérias isoladas do queijo de Coalho artesanal fabricado nos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil.	82
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Frequência de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>E. faecium</i> isolados do queijo de Coalho artesanal, com atividade antagonista total*, parcial** e não antagonistas a <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	99
--	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Espectro de ação de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>E. faecium</i> , isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090), e <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).	114
---	-----

RESUMO

Os *Enterococcus* são parte da microbiota natural de muitos queijos artesanais, influenciando no desenvolvimento de características sensoriais destes produtos. Além disto, os *Enterococcus* são capazes de produzir peptídeos com atividade antimicrobiana chamados de enterocinas, destacando seu potencial uso como bioprotetor em alimentos, sendo necessárias pesquisas que elucidem e possibilitem sua utilização de modo eficiente e seguro. Assim, o presente trabalho objetivou isolar e selecionar e caracterizar enterococos produtores de enterocinas isoladas a partir do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – PE / Brasil. Para isso foram isoladas, purificadas e identificadas por método clássico 609 Bactérias Ácido Láticas (BAL) dos gêneros: *Enterococcus* (50,7%), *Streptococcus* (20,5%), *Lactococcus* (17,8%), *Lactobacillus* (9,1%) e *Leuconostoc* (1,9%). Do total de 309 amostras do gênero *Enterococcus*, 205 (66,34%) foram identificadas como *E. faecalis* e 104 (33,66%) como *E. faecium*. A atividade antagonista esteve presente em 79,93% dos *Enterococcus* frente a *Listeria innocua* ATCC 33090, em 57,60% frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e em 27,18% frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922). Na produção e seleção de enterocinas, 102 (41,29%) *Enterococcus* foram considerados produtores, sendo 43,8% dos *E. faecalis* testado e 35,5% dos *E. faecium*. Os resultados à caracterização das enterocinas produzidas demonstraram atividade antimicrobiana estável a temperatura, pH e presença de enzimas proteolíticas. revelaram a potencial aplicação destas enterocinas como conservantes biológicos, melhorando a qualidade microbiológica e a segurança alimentar.

Palavras chave: Queijo de Coalho artesanal, *Enterococcus*, Bacteriocinas

ABSTRACT

Enterococcus are part of the natural microflora of many artisan cheeses, influencing the development of sensory characteristics of these products. Moreover, *Enterococcus* are capable of producing peptides with antimicrobial activity called enterocins, its potential use as bioprotector in food research is needed to elucidate and to enable their use in an efficient and safe manner . Thus, this study aimed to isolate, select and characterize enterocins produced by *Enterococcus* isolated from artisanal “Coalho” cheese produced in the Cachoeirinha and Arcoverde - PE / Brazil. To this were isolated, purified and identified by classical method 609 lactic acid bacteria (LAB) of the genera: *Enterococcus* (50.7 %), *Streptococcus* (20.5 %), *Lactococcus* (17.8%), *Lactobacillus* (9.1 %) and *Leuconostoc* (1.9%). Of the total of 309 samples of the genus *Enterococcus*, 205 (66.34 %) were identified as *E. faecalis* and 104 (33.66 %) as *E. faecium*. The antagonist activity was present in 79.93 % of *Enterococcus* against *Listeria innocua* ATCC33090 at 57.60 % against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and 27.18% against *Escherichia coli* (ATCC 25922). In the production and selection, 102 (41.29%) were considered *Enterococcus* enterocins producers, with 43.8 % of *E. faecalis* tested and 35.5 % of *E. faecium*. The results of the characterization enterocins demonstrated antimicrobial activity produced stable temperature, pH and the presence of proteolytic enzymes. revealed the potential application of these enterocins as biological preservatives, improving the microbiological quality and food safety. The technology assessments, the ability to acidification and proteolytic qualitative , producers of *Enterococcus* enterocins show that the evaluated crops were considered slow acid producers and producers of proteolytic activity and can be used in preparing a lactic starter for the manufacture of cheese rennet .

Keywords: Artisanal “Coalho” cheese, *Enterococcus*, Bacteriocins

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um dos alimentos mais antigos de que se tem registro (HARBUTT, 2010). No Brasil os primeiros queijos foram fabricados no Estado de Minas Gerais, (SEBRAE, 2008) estando sua produção em curva crescente em território nacional (ABIQ, 2011; PAULA et al., 2012).

No Nordeste do Brasil, o queijo de Coalho artesanal recebe destaque (SEBRAE, 2008). Produzido há mais de 150 anos (CAVALCANTE et al., 2007) este queijo é uma representação genuína da tradição e cultura do estado de Pernambuco (ALMEIDA et al.; 2010).

O conhecimento sobre a microbiota láctica dos queijos artesanais é importante para o desenvolvimento de processos que melhorem a qualidade higiênico-sanitárias, assegure a autenticidade e a rastreabilidade do produto artesanal (GIANNINO et al., 2009), possibilitando ainda o desenvolvimento de fermentos lácticos que melhoram a qualidade organoléptica dos queijos produzidos industrialmente (; LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; MEDINA et al., 2001; CARVALHO, 2007).

A microbiota láctica dos queijos é composta por Bactérias Ácido Lácticas (BAL), grupo de bactérias Gram-positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos e que crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os gêneros de BAL são *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissela*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998).

O gênero *Enterococcus* é descrito como parte da microbiota láctica endógena de muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa. A influência positiva dos enterococos no queijo se dá no desenvolvimento de características sensoriais, através de reações bioquímicas durante a cura: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis (HUGAS, 2003; JAMET, 2012). Além disto, os Enterococos são capazes ainda de produzir substâncias com atividade antagonistas, dentre eles as bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de patógenos e micro-organismos deterioradores sem provocar alterações sensoriais nos alimentos, despertando grande interesse pela indústria alimentícia (GIRAFFA, 2003; HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007; SETTANNI, 2008).

A primeira bacteriocina foi descoberta em 1925 (GRATIA, 1925 apud COTTER, 2005) e em 1953 foi proposta a utilização destas em alimentos (HIRSCH et al., 1953). Sendo aprovada para uso comercial em alimentos em 1969 pela Food and Agriculture Organization e World Health Organization (COTTER, 2005). Seu desenvolvimento bem sucedido é um modelo que tem estimulado a pesquisa de novas bacteriocinas nos últimos anos. No entanto, se faz necessário primeiro entender a biologia de novas bacteriocinas, elucidando suas relações estrutura-função, produção, imunidade, regulação e modo de ação (COTTER, 2005).

As bacteriocinas são peptídeos com atividade antimicrobiana (SCHULZ et al., 2003; ZACHAROF, LOVITT, 2012; MARTINEZ et al., 2013). A utilização de bacteriocinas de origem láctea na indústria de alimentos tem sido amplamente relatada nos últimos anos, este fato se deve principalmente pela ocorrência natural de BAL em muitos alimentos, incluindo leite e produtos lácteos, ovos, vegetais e produtos de carne (ZACHAROF, LOVITT, 2012). O potencial de aplicação de bacteriocinas em alimentos inclui benefícios na qualidade e segurança alimentar. Apresentando-se como uma alternativa para satisfazer a crescente demanda dos consumidores por alimentos seguros e minimamente processados (ARQUES, 2011).

As bacteriocinas produzidas por enterococos são chamadas de enterocinas, que apresenta atividade antimicrobiana contra estirpes estreitamente relacionadas com o micro-organismo produtor (POETA, 2008). Franz et al. (2008) afirmaram que enterocinas, à semelhança dos enterococos, são notáveis por sua diversidade e presença entre os isolados de diferentes fontes, aumentando a possibilidade de encontrar um determinado tipo de bacteriocina adequada para cada produto alimentar.

Embora exista uma preocupação sobre a segurança alimentar na utilização dos *Enterococcus*, a utilização de micro-organismos isolados a partir de produtos tradicionais fermentados tem se revelado segura para serem utilizadas como culturas iniciadoras, proporcionando a preservação natural através da produção de enterocinas *in vivo* (DE VUYST et al., 2003). Estes estudos destacam a grande importância de enterococos em alimentos e do potencial de aplicação de sua

enterocina, sendo novas pesquisas essenciais para elucidar e possibilitar sua utilização de modo eficiente e seguro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolar, selecionar e caracterizar os enterococos produtores de enterocinas obtidos do queijo de Coalho artesanal produzidos nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde, Pernambuco – Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar as Bactérias Ácido Láticas a partir do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil;
- Identificar as espécies de *Enterococcus* isolados através de provas bioquímicas;
- Selecionar *Enterococcus* produtores de atividade antagonista e produtores de enterocinas frente a *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Avaliar e quantificar a capacidade antimicrobiana das enterocinas obtidas frente à *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Caracterizar as enterocinas produzidas através da avaliação da estabilidade ao pH, temperatura e suscetibilidade a enzimas proteolíticas.
- Avaliar a capacidade tecnológica das amostras dos *Enterococcus* produtores de enterocinas, em relação à capacidade de acidificação e proteolítica qualitativa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Queijos

Segundo a Portaria nº 146 de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do Coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O queijo é um dos alimentos mais antigos de que se tem registro. Porém, não se sabe com precisão a data de sua origem, mas acredita-se que tenha surgido por volta de 11.000 a.C., antes mesmo da manteiga (ALBUQUERQUE, 2007). Harbutt (2010) cita que a antiga mitologia Grega creditou a Aristeu, um dos filhos de Apolo, a descoberta do queijo. Citando também o pensamento de Hipócrates, 450 a.C., ajudando a elucidar a origem do queijo:

“...És forte porque estás próximo da origem da criatura. És nutritivo porque manténs o melhor do leite. És quente, porque és gordo...” (HARBUTT, 2010).

Descreve-se que a descoberta do queijo teria sido o resultado de um acidente afortunado, no qual algum leite teria sido armazenado em um saco feito com estômago de animal, o que causou a coagulação dos sólidos (a coalhada) e a separação do líquido (o soro) dando ao homem a oportunidade de conhecer um produto tão valioso (HARBUTT, 2010).

Inicialmente, Roma era um rico mercado para os queijos, no reinado dos Césares a fabricação de queijo floresceu e rapidamente se estendeu por toda a Europa, mas foi na Suíça que a produção de queijos teve seu maior desenvolvimento, graças à vegetação e às pastagens abundantes dos Alpes. Bem alimentadas, as vacas produziam mais leite e de melhor qualidade, sendo este um dos fatores que fez com que a indústria suíça prosperasse e se tornasse mundialmente famosa (SEBRAE, 2008).

No Brasil os primeiros queijos foram fabricados no Estado de Minas Gerais, com a produção do queijo Prato por imigrantes dinamarqueses. Posteriormente, em Seritinga-MG, iniciava a produção do queijo Gorgonzola, inspirado no *Blue Cheese* dinamarquês. Seguindo essa tendência, muitos são os tipos de queijos de origem estrangeira produzidos no Brasil, tais como Brie, Gruyère, Emmental, Parmesão, Provolone, entre outros. Esses queijos de origem estrangeira, produzidos localmente, devem apresentar a expressão “*tipo*” em sua denominação, para indicar que se trata de formulação e processo originalmente estrangeiros. Os queijos considerados brasileiros, por terem sido desenvolvidos localmente são Prato, Minas Frescal, Minas Padrão, Minas Meia Cura, Reino, Requeijão (cremoso e culinário) e Queijo de Coalho (SEBRAE, 2008).

A produção de queijos no Brasil está em uma curva crescente. Em 2011 foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país, 9,4% mais que em 2010, segundo os últimos dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2011; PAULA et al., 2012).

De acordo com o relatório completo do Núcleo de Estudos e Negócios do Varejo (ESPM) do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2008), a produção de queijo no Brasil é liderada pela região Sudeste (42,5%), seguida pelas regiões Sul e Nordeste, respectivamente com 26,5% e 24,8%. As demais regiões, Centro-Oeste e Norte, apresentam produção pouco expressiva, com menos de 6,3%. O referido relatório ressalta ainda que 60% dos queijos produzidos no Brasil são de origem industrial, os demais 40% correspondentes a produção de forma artesanal, por pequenos e micro laticínios.

3.1.1 Queijos Artesanais

Embora se tenha sempre o “mesmo ingrediente”, o leite, a diversidade de texturas, sabores e aromas dos queijos é enorme, existindo mais de 1000 tipos de queijos produzidos em todo o mundo (IRLINGER E MOUNIER, 2009).

O caráter singular de cada queijo é resultante de uma complexa combinação de fatores locais denominado de *terroir* (em francês) ou *tipicità* (em italiano). Estas

características peculiares do local de origem do queijo como clima, solo, umidade, vegetação, raça animal, processo tecnológico de fabricação do queijo e a microbiota láctica endógena, influenciam de maneira singular o produto final (BERESFORD et al., 2001; BROOME, 2007; CASALTA et al., 2009).

Para o Programa SEBRAE de Artesanato, produtos alimentícios típicos e/ou artesanais são os processados segundo métodos tradicionais, em pequena escala, muitas vezes em família ou por um determinado grupo (SEBRAE, 2004). Em relação ao queijo artesanal refere-se à preservação da forma tradicional de preparo com o leite cru, que lhe confere a característica de sabor próprio (SEBRAE, 2008).

Com o intuito de eliminar a possível veiculação de patógenos através do queijo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, estabelece que o leite deve ser submetido à pasteurização ou a tratamento térmico equivalente para a fabricação de queijos em escala industrial (BRASIL, 1996).

Porém, segundo Grappin e Beuvier (2007) a pasteurização não representa garantia de segurança alimentar em queijos, uma vez que pode ocorrer contaminação pós-pasteurização. Furtado (2005) e Cavalcante (2005) citam que a segurança alimentar nos queijos artesanais, feitos com leite cru, depende de vários fatores, sobretudo a adoção de Programas de Autocontrole na obtenção da matéria-prima, na água de abastecimento utilizada na produção, bem como nas condições gerais durante a fabricação e maturação dos queijos.

Além disso, o tratamento térmico como método de conservação afeta o teor nutricional e provoca mudanças nas características sensoriais do leite e seus derivados (NETO et al., 2002) e possui também a desvantagem de promover a eliminação da microbiota láctica natural do leite, que é responsável pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos artesanais (GRAPPIN, BEUVIER, 2007).

Macedo e colaboradores (2004) citam que uso de fermento láctico na fabricação dos queijos industriais resulta na perda das características típicas encontradas nos queijos artesanais, e isto ocorre em consequência da substituição

da complexa microbiota endógena presente no leite cru por fermentos lácticos comerciais, conduzindo a padronização cega do produto.

Os queijos feitos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado, devido às Bactérias Ácido Lácticas originárias do leite cru, responsáveis pela sua diferenciação (FRANCIOSI et al., 2009).

A fim de conseguir que o queijo artesanal brasileiro obedeça à legislação vigente sem perder as características tradicionais de sua origem, o Estado brasileiro, no âmbito Legislativo Nacional, tem recebido implementos visando facilitar a produção e comercialização dos queijos artesanais, ao estimular a certificação de regiões produtoras e ao reconhecer as já tradicionais, inicialmente com a Instrução Normativa nº 57/2011 do MAPA (BRASIL, 2011) que fora revogada pela Instrução Normativa MAPA nº 30/2013, que define requisitos para sua produção, garantindo a qualidade do produto e atendendo aos aspectos de sanidade e saúde pública (BRASIL, 2013).

Em paralelo, vários projetos veem sendo desenvolvidos com o apoio de instituições como SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio a Micro e Pequenas Empresas), SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) e EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Tais projetos visam implantar um selo de certificação geográfica aos queijos artesanais nacionais agregando valor ao produto e gerando uma valorização geral da região onde os produtores estão inseridos, beneficiando toda a comunidade (SEBRAE, 2008).

De acordo com Almeida et al. (2010), no Brasil o processo de Indicação Geográfica (I.G.) foi regulamentada pela Lei de Propriedade Industrial (Lei n. 9.279, de 14 de maio de 1996) e no âmbito internacional são reconhecidas pelo Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio (ADPIC), em inglês, *Trade Related Aspects of Intellectual Property Rights* (TRIPS) da Organização Mundial do Comércio (OMC).

Nos termos do art. 176 da Lei de Propriedade Industrial (BRASIL, 1996b) constitui Indicação Geográfica a Indicação de Procedência (I.P.) ou a Denominação

de Origem (D.O.), a distinção entre as espécies de identificação geográfica se encontra nos artigos 177 e 178 da indigitada lei, que assim define os institutos respectivamente:

Art. 177. Considera-se indicação de procedência o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que se tenha tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação de determinado produto ou de prestação de determinado serviço (BRASIL, 1996b).

Art. 178. Considera-se denominação de origem o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que designe produto ou serviço cujas qualidades ou características se devam exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos (BRASIL, 1996b).

Ainda segundo Almeida et al. (2010) a indicação de procedência e a denominação de origem se diferenciam uma vez que a Indicação de Procedência é atribuída à região ou localidade que adquiriu fama por causa de seus produtos ou serviços. Nessa modalidade de IG, o centro de extração, produção ou fabricação é indicado, mas não são realçadas as qualidades ou características únicas de um produto ou serviço vinculadas com o meio geográfico. Por outro lado, a Denominação de Origem (D.O.) tem por obrigação destacar qualidades ou características de um produto ou serviço, que se devem essencialmente ao meio geográfico. Isso significa que para as D.O. não basta o estabelecimento no local designado, mas também a comprovação de que os fatores naturais (clima, solo, temperatura, água, fauna, flora) e humanos (práticas e técnicas típicas empregadas pelos moradores do lugar e da região) atribuem uma característica ímpar ao produto.

Em queijos a questão de D.O. está ligada ao conceito de “sabor da terra”, conforme explica Benoit Paquereau, Gerente de Inovação do APL (Arranjos Produtivos Locais – Pecuária Leiteira) da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente de Pernambuco (SECTMA), e refere-se a um produto com características

visuais e sensoriais bastante específicas, relacionadas a uma determinada região geográfica e cuja certificação de denominação de origem objetiva principalmente agregar valor ao produto. Este conceito vem sendo desenvolvido no Brasil à luz do sistema de denominação de queijos existente na França, precursora desse tema (RANGEL, 2009).

No Brasil dois trabalhos para a obtenção do D.O. se destacam: no Nordeste, o Queijo de Coalho e, em Minas Gerais, o Queijo Minas. Estes trabalhos têm como objetivo agregar valor ao queijo artesanal e desenvolver todo um conceito de produção e comercialização que dará ao produtor maior oportunidade de ganhos e, sobretudo, valorização do seu produto (SEBRAE, 2008).

3.1.2 Queijo de Coalho

Produzido há mais de 150 anos (CAVALCANTE et al., 2007), o queijo de Coalho artesanal é um produto típico do Nordeste Brasileiro, representando um importante patrimônio para a Região (SILVA et al., 2012^a; FREITAS, 2013).

O queijo de Coalho artesanal é produzido tradicionalmente com leite cru, sem adição de ácido láctico ou fermento, tendo a microbiota endógena como fator predominante no desenvolvimento do sabor (MACHADO, 2011). É um queijo com tecnologia de fabricação simples e não exige equipamentos sofisticados (NASSU, 2006). Sua fabricação inicialmente utilizava estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros para a coagulação do leite (GONDIM, 1995; LIMA, 1996).

Por ser o principal queijo consumido na região (FONTENELE et al., 2010) trata-se de um produto artesanal com importância expressiva para a cultura e para o contexto econômico do Nordeste (PERRY, 2004), principalmente nos Estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco (SILVA et al., 2012a). Não obstante, a cada ano, o queijo de Coalho vem se popularizado em outras regiões do país (SOBRAL, 2007).

Em Pernambuco, a maior parte da produção do queijo de Coalho artesanal se dá nos municípios localizados na Região Agreste, bacia leiteira do Estado (ESCOBAR, 2001), área que abrange 44 municípios e que produz 70% do leite de

Pernambuco, e está historicamente ligada a criação de gado bovino (SEBRAE, 2008).

A produção do queijo de Coalho artesanal pernambucano se dá em pequenas fazendas rurais e em pequenas queijarias urbanas ou rurais (ESCOBAR, 2001), representando importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar, uma vez que em determinadas localidades é a principal fonte de renda e sobrevivência para produtores que não têm acesso às usinas de beneficiamento (SILVA et al., 2012a, ALMEIDA et al., 2010, EMBRAPA, 2008).

Infelizmente, diante do caráter predominantemente informal de sua fabricação, há escassez de dados estatísticos sobre a produção de queijo de Coalho nos Estados e no país como um todo (MENEZES, 2011). Segundo Escobar (2001), cerca de 30% do leite produzido em Pernambuco é destinado para esta finalidade, atingindo 40 a 50% em algumas microrregiões.

De acordo com Almeida et al. (2010) e Silva et al. (2013), o queijo de Coalho é uma representação genuína da tradição e cultura do Estado de Pernambuco, e por esta razão está passando por um processo de obtenção de certificação de indicação geográfica, com a finalidade de lhe atribuir uma identidade própria que irá diferenciá-lo dos demais produzidos na região Nordeste, como uma maneira de agregar valor a um produto tipicamente regional.

O projeto para obtenção do selo de Indicação Geográfica do queijo de Coalho Pernambucano envolve produtores locais, pesquisadores e instituições públicas e de apoio. Este projeto começou a ser desenvolvido em 2001 através da parceria entre o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP) e do SEBRAE de Garanhuns, para desenvolver melhorias na produção do queijo de Coalho local (SEBRAE, 2008).

Em 2003 o SEBRAE promoveu o primeiro seminário sobre qualificação de queijos, em Garanhuns. No ano seguinte, 2004, promoveu uma missão internacional a região de *Auvergne*, na França. Na ocasião, oito produtores e sete técnicos institucionais visitaram fazendas francesas que possuem forte tradição na produção de queijos. Como resultado, houve a criação de um plano de trabalho denominado “Carta de *Auvergne*”, que possibilitou ao SEBRAE fornecer orientações técnicas aos produtores para a criação de uma associação e para a melhoria do processo

produtivo do queijo de Coalho do Agreste de Pernambuco. Em 2005 este projeto foi aprovado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), em 2008 pelo SEBRAE (SEBRAE, 2008) e em 2009 foi solicitado o selo IP junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), primeiro passo para a obtenção do selo de Indicação Geográfica (RANGEL, 2009).

Segundo Rangel (2009) o queijo de Coalho Pernambucano tem tudo para conseguir essa obtenção do selo DO, uma vez que o agreste de Pernambuco apresenta em seu *terroir* características específicas para a produção deste tipo de queijo, como a cultura secular da produção e consumo de laticínios, o clima e a alimentação do gado, que consome ração tradicional e palma forrageira, cacto de origem mexicana, que é hoje um complemento indispensável na alimentação do gado do Agreste.

3.1.2.1 Identidade e qualidade do queijo de Coalho

As características do queijo de Coalho fabricado industrialmente no Brasil devem seguir os padrões oficiais designados no seu Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001, que institui os padrões de identidade e qualidade a estes produtos, inclusive no que concerne importância da qualidade da matéria-prima (BRASIL, 2001).

Conforme esta norma o queijo de Coalho é aquele obtido por coagulação do leite por meio de Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado, normalmente, com até 10 dias de fabricação. Devendo apresentar consistência semi-dura, elástica, textura compacta (sem olhaduras mecânicas) ou aberta (com olhaduras mecânicas), cor branca amarelada uniforme, odor ligeiramente ácido de coalhada fresca, casca fina e não muito definida, formato e peso variáveis. Ao queijo de Coalho podem ser adicionados condimentos e a sua forma de apresentação pode ser tanto em retângulos já com o espeto para ser assado como em barra. O leite utilizado como matéria-prima deve ser obrigatoriamente pasteurizado (BRASIL, 2001).

Os requisitos físico-químicos e microbiológicos para este tipo de queijo correspondem às características de composição e qualidade dos queijos de média a alta umidade, conforme estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos – Portaria No 146/96 – MAPA (BRASIL, 1996).

Sem prejuízo aos critérios microbiológicos oficiais federais estabelecidos pela Portaria No 146/96 – MAPA (BRASIL, 1996), a fabricação dos queijos artesanais, aqueles produzidos com leite cru, é permitida através da Instrução Normativa Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº. 30, de 07 de agosto de 2013, que institui os critérios de produção e comercialização deste tipo de queijo (BRASIL, 2013).

O queijo de Coalho artesanal, por sua vez, pode apresentar diferentes características organolépticas dependendo do estado produtor. Uma vez que, segundo Silva (2012b) o fluxograma de produção difere em cada região como, por exemplo, em Pernambuco é produzido com massa crua e tradicionalmente consumido fresco, enquanto que no Ceará e Rio Grande do Norte é fabricado com massa semi-cozida e consumido fresco ou maturado.

Em Pernambuco, o queijo de Coalho artesanal segue os padrões oficiais estabelecidos pela Lei Estadual 13.376 (PERNAMBUCO, 2007) que regulamenta a fabricação e comercialização deste tipo de queijo dentro do Estado.

Este regulamento define o queijo de Coalho artesanal pernambucano como queijo produzido em Pernambuco, a partir do leite fresco e cru de bovinos e bubalinos, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas (PERNAMBUCO, 2007).

A **Figura 1** mostra o fluxograma de produção do queijo de Coalho artesanal fabricado tradicionalmente a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste do Estado de Pernambuco (NETO, 2010).

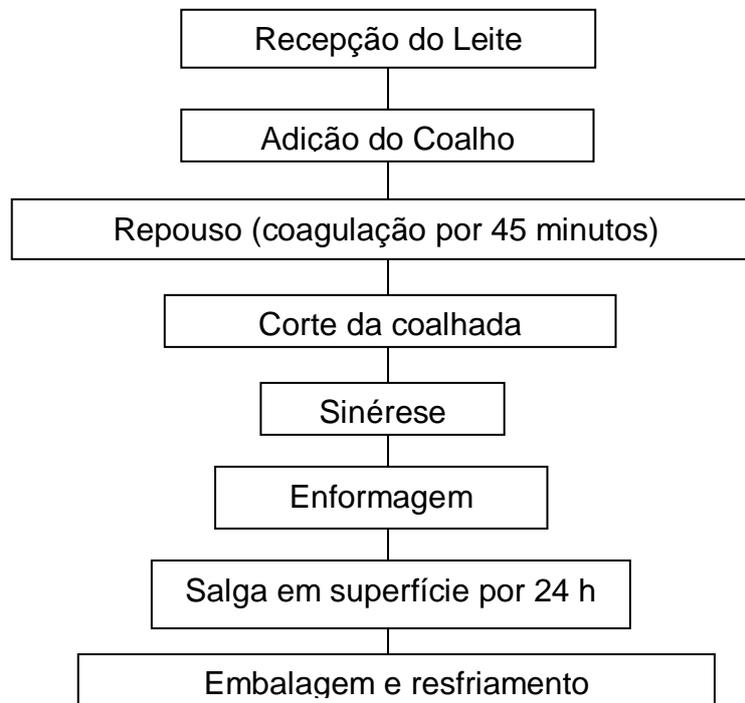


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo de Coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil (Adaptado de NETO, 2010).

A qualidade do queijo de Coalho artesanal pernambucano e sua adequação para o consumo são asseguradas, nos termos da Lei Estadual nº 13.376/2007, por meio de produção com leite proveniente de rebanho sadio devidamente inspecionado; que não apresente sinais clínicos de doenças infectocontagiosas e cujos testes oficiais de zoonoses, tais como brucelose e tuberculose, apresentem resultados negativos, de acordo com as normas estabelecidas pela legislação estadual vigente, certificados de registro do estabelecimento e registro do produto, ambos emitidos pela Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO) e, por fim, os produtores deverão integrar os programas de qualificação dos produtos, instituídos pelo Instituto de Pesquisas Agropecuária do Estado de Pernambuco (IPA) e pela ADAGRO, para o cumprimento das exigências necessárias à obtenção dos Certificados (PERNAMBUCO, 2007).

Além destes requisitos determinantes para a produção de um queijo de Coalho de qualidade e adequado ao consumo humano, a supramencionada Lei estadual, estabelece condicionantes de sanidade e higiene também relacionadas à produção e ligadas à qualidade da água, higiene do estabelecimento, equipamentos, transporte e embalagem do produto (PERNAMBUCO, 2007).

3.1.2.2 Perfil microbiano láctico do queijo de Coalho

Embora muitos trabalhos relatem as características microbiológicas do ponto de vista higiênico-sanitário do queijo de Coalho em Pernambuco (DUARTE et al., 2005; FERREIRA, 2008; FILHO et al., 2009) na Paraíba (DANTAS, 2012; FREITAS, 2013), em Sergipe (SANTANA et al., 2008) e no Ceará (BENEVIDES et al., 2000), pouco se sabe a respeito do perfil microbiano láctico do queijo de Coalho artesanal, informação de importância fundamental para a obtenção de DO, garantindo qualidade sanitária e tecnológica deste tipo de queijo.

Várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de caracterizar o perfil microbiano láctico dos queijos artesanais em outros países, tais como Peñamellera - Espanha (ESTEPAR et al., 1999), Valdeón de León - Espanha (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000), Sán Simon - Espanha (FONTÁN et al., 2001), Aspromonte - Itália (CARIDI et al., 2003), Genestoso - Espanha (ARENAS et al., 2004), Manchego - Espanha (BALLESTEROS et al., 2006), Terrincho - Portugal (MALCATA, 2008), Raschera - Itália (DOLCI et al., 2008).

Carvalho (2007) estudou o perfil microbiano láctico do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará, isolando os gêneros *Enterococcus* (59,6%), *Lactobacillus* (22%), *Lactococcus* (1,7%), *Leuconostoc* (0,6%) e *Streptococcus* (12,8%). Descrevendo como um perfil termofílico e atribuindo o resultado encontrado ao tipo processamento do queijo de Coalho local, decorrente do cozimento da massa (CARVALHO, 2007).

Apenas recentemente foi estudado o perfil microbiano láctico no queijo de Coalho artesanal pernambucano. Silva et al. (2012c) descrevem que o perfil Ácido Láctico deste queijo é constituído por *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*,

Streptococcus thermophilus e *Lactococcus lactis* e sugere que as características organolépticas do produto estão baseadas em um ecossistema heterogêneo com a interação de todos os gêneros testados. O conhecimento sobre a microbiota ácido láctica dos queijos artesanais é importante para auxiliar no desenvolvimento de processos que melhorem a qualidade, assegurem autenticidade e rastreabilidade do produto artesanal (GIANNINO et al., 2009), possibilitando ainda, o desenvolvimento de fermentos lácticos que melhorem a qualidade organoléptica dos queijos produzidos industrialmente (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; MEDINA et al., 2001; CARVALHO, 2007).

3.2 Bactérias Ácido Lácticas

Bactérias Lácticas ou Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são um grupo de microorganismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os gêneros mais importantes de BAL são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998).

O grupo de BAL pode ser agrupado em homofermentativas ou heterofermentativas, dependendo do produto final da fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glucose, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (CARR et al., 2002).

As BAL podem, ainda, ser classificadas de acordo com a temperatura de crescimento em mesofílicas e termofílicas, com temperaturas ótimas de 30 e 42°C, respectivamente (FOX et al., 2000).

A importância das BAL na fermentação de alimentos se dá primeiramente por contribuírem tecnologicamente para a produção e formação das propriedades organolépticas do produto. Posteriormente, as BAL possuem importância sanitária

na conservação do alimento, através da diminuição do pH devido a degradação dos carboidratos presentes na matéria prima, o que torna o meio inóspito para a maioria dos micro-organismos deterioradores e patogênicos. Adicionalmente algumas BAL também produzem peptídeos com atividade antimicrobiana (MADERA et al., 2003).

É interessante também ressaltar que, no caso específico das BAL heterofermentativas, sua utilização em alimentos é, sobretudo, pela sua capacidade de produzir compostos flavorizantes, muito mais do que pela sua habilidade acidificante. Isto ocorre porque os micro-organismos heterofermentativos utilizam na fermentação de hexoses, via pentose monofosfato, produzindo, durante o processo de conversão de hexose em pentose, substâncias aromáticas, como aldeído e diacetil (CARR et al., 2002).

O emprego de BAL, na forma de fermento láctico, para elaboração de produtos lácteos fermentados é muito conhecido, principalmente na fabricação de leite acidificado, iogurte e queijos. No entanto, elas também são usadas no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais (BRUNO, CARVALHO, 2009).

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de BAL. Sua principal função é promover uma acidificação rápida durante o processo fermentativo e assim garantir a segurança do alimento. O fermento láctico também tem a finalidade de contribuir para o desenvolvimento das características sensoriais desejadas do produto e pode ainda oferecer benefícios à saúde do consumidor, como os proporcionados pelos probióticos (BERESFORD, WILLIAMS, 2004).

Os fermentos lácticos procuram reproduzir a microbiota láctica de queijos e, portanto, são compostos de BAL iniciadoras ou são culturas *starters* e micro-organismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas. As BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante a elaboração do queijo e contribuem para o processo de cura. Enquanto que os micro-organismos secundários geralmente estão envolvidos na definição das características sensoriais do queijo (BERESFORD et al., 2001).

Os gêneros de BAL mais encontrados em queijos são os *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (FOX et al., 2000; BERESFORD et al., 2001). A Tabela 1 apresenta a classificação dos gêneros de BAL de acordo com sua morfologia, temperatura de crescimento e produto formado.

Tabela 1. Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.

Gênero	Morfologia	Temperatura ótima de crescimento	Tipo de ácido láctico formado	Fermentação de açúcar
<i>Lactococcus</i>	Cocos/cadeias	30°C	L(+)	Homofermentativa
<i>Streptococcus</i>	Cocos/cadeias	42°C	L(+)	Homofermentativa
<i>Enterococcus</i>	Cocos/cadeias	42°C	L(+)	Homofermentativa
<i>Leuconostoc</i>	Cocos/pares	30°C	D(-)	Homofermentativa
<i>Lactobacillus</i>	Bastões/pares	30°C e 42°C	D(-), L(+) e DL	Homo e Hétero

Fonte: Adaptado de Fox et al. (2000) e Carr et al. (2002).

3.2.1 Enterococos

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* foram descritos pela primeira vez por Thiercelin (1899 apud DOMIG et al., 2003). Inicialmente classificados como pertencentes ao grupo de estreptococos, proposto por Sherman (1937 apud DOMIG et al. 2003), teve sua classificação revista após estudos bioquímicos, imunológicos e genéticos, indicando que os enterococos deveriam ser separado do gênero *Streptococcus*. O novo gênero *Enterococcus* foi oficialmente estabelecido por Schleifer e Kilpper-Balz (1984).

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo o *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* os dois mais frequentes em alimentos (GIRAFFA, 2003). Este gênero sobrevive em condições adversas como pH, temperatura e salinidade extremos (CARIDI et al., 2003) e fazem parte da microbiota láctica secundária dos produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2009).

Nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano (FONTÁN et al., 2001; MEDINA et al., 2001). Sendo

descritos como parte da microbiota natural de muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa, como os queijos Feta, Kasseri, Manchego e Majonero (BRUNO, CARVALHO, 2009). No Brasil, o gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Ceará (CARVALHO, 2007) e no Rio Grande do Norte (BRUNO et al., 2007). A Tabela 2 apresenta uma lista de queijos nos quais os *Enterococcus* foram citados como parte da microbiota láctica endógena.

Tabela 2. Presença enterococos em queijos de diferentes origens e tipos de leite.

Origem	Queijo	Tipo de leite	Referência
Brasil	Coalho	Bovino	Carvalho et al.(2007)
Brasil	Coalho	Bovino	Bruno et al. (2007)
França	Roquefort	Bovino	Devoyod (1969)
França	Comté	Bovino	Bouton et al. (1998)
França	Venaco	Ovino/caprino	Casalta e Zennaro (1997)
Grécia	Feta	Ovino	Sarantinopoulos et al. (2002)
Grécia	Kefalotyri	Ovino	Litopolou-Tzanetakiet al. (1990)
Grécia	Orinotyri	Ovino	Prodromou et al. (2001)
Irlanda	Cheddar	Bovino	Gelsomino et al. (2001)
Itália	Montasio	Bovino	Basso et al. (1994)
Itália	Mozzarella	Bovino	Morea et al. (1999)
Itália	Pecorino Pardo	Ovino	Mannu e Paba (2002)
Itália	Semicotto	Caprino	Suzzi et al. (2000)
Portugal	Serra da Estrela	Ovino	Tavaria e Malcata (1998)
Espanha	Armada	Caprino	Tornadijo et al. (1995)
Espanha	Cebreiro	Bovino	Centeno et al. (1999)
Espanha	Majonero	Caprino	Fontecha et al. (1990)
Espanha	Manchego	Ovino	Nieto-Arribas (2011)
Espanha	Tetilla	Bovino	Menéndez et al. (2001)
Espanha	San Simón	Bovino	García et al. (2001)
Espanha	Quesaila Arochena	Caprino	Martín-Platero, 2009

Fonte: Adaptado de Foulquié Moreno et al. (2006).

De acordo com Foulquié-Moreno et al. (2006), há um crescente interesse pelo uso de *Enterococcus* na fabricação de queijos. Porém, os *Enterococcus* podem ser vistos como benéficos ou prejudiciais, dependendo da sua origem, em conjunto com aspectos de segurança tecnológica e de alimentos (KAYSER, 2003; GOMES, 2008, CEBRIÁN et al., 2012).

O *Advisory Committee on Novel Foods and Processors* - ACNFP- permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento láctico em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003). No entanto, o uso de outras espécies de *Enterococcus* em queijos é questionado, pois há necessidade de mais estudos sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos deste uso (GIRAFFA, 2002; BRUNO, CARVALHO, 2009).

As espécies do gênero *Enterococcus* apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. Pesquisas realizadas por Durlu-Ozkaya et al. (2001) e Sarantinopoulos et al. (2009) mostraram que somente uma pequena parcela destas espécies promoveu a redução do pH do leite para 5,0–5,2, após 16–24h de incubação a 37°C. Suzzi et al. (2000) observaram que o *E. faecalis*, isolado de queijos artesanais italianos, reduziu o pH de leite desnatado a 4,5 após 24h de fermentação. Confirmando que o *E. faecalis* tem maior poder de acidificação que o *E. faecium*.

A influência positiva dos enterococos no queijo é devida ao desenvolvimento de características sensoriais, através de reações bioquímicas durante a cura: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis (HUGAS, 2003; JAMET, 2012).

Além disto, os *Enterococcus* são capazes de produzir substâncias com potencial antagonista, como os ácidos orgânicos (ácido láctico), peróxido de hidrogênio, bacteriófago lítico, enzimas proteolíticas e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas (NAIDU et al., 1999; GIRAFFA, 2003; HAJIKHANI et al., 2007; SETTANNI, 2008).

3.3 Bacteriocinas

Um grande número de bactérias produzem, durante seu crescimento, peptídeos com atividade antimicrobiana chamados de bacteriocinas (SCHULZ et al., 2003; ZACHAROF, LOVITT, 2012; MARTINEZ et al., 2013).

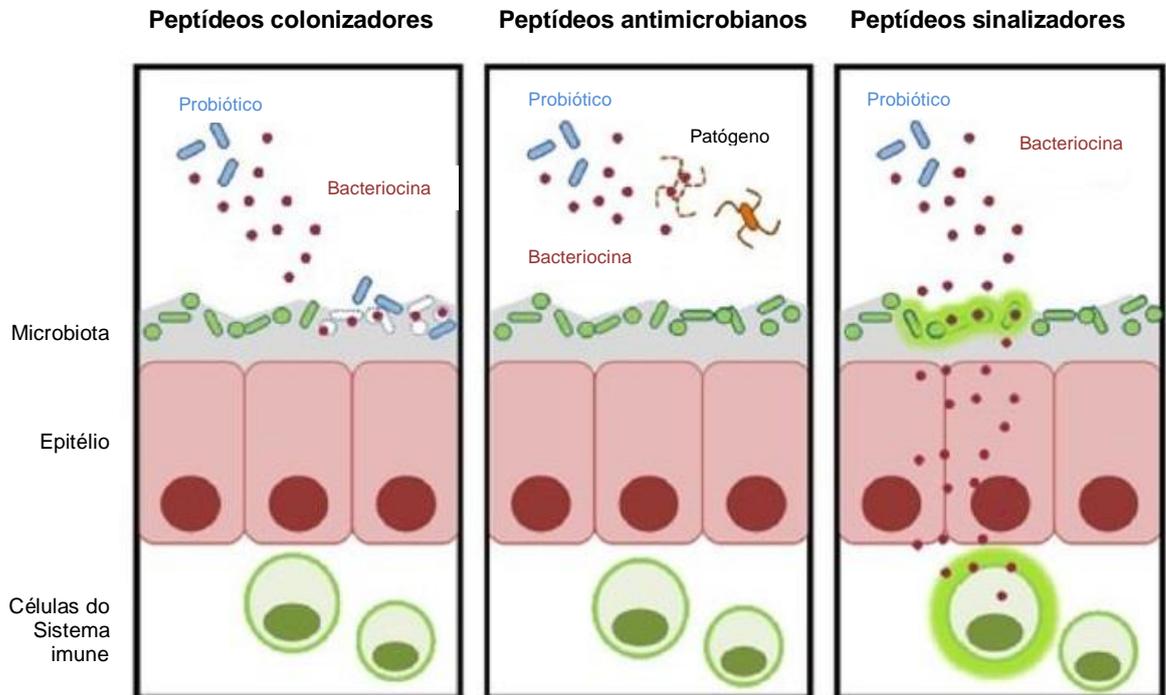
Embora possuam atividade antimicrobiana, as bacteriocinas não são classificadas como antibióticos. Dentre as principais diferenças entre eles é que as

bacteriocinas são ribossomicamente sintetizadas e produzidas durante a fase primária de crescimento microbiano, enquanto que os antibióticos são metabólitos secundários (BEASLEY; SARIS, 2004; ZACHAROF, LOVITT, 2012). Na Tabela 3 Rosa e Franco (2002) apresentam outras diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.

Tabela 3. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos (Adaptado de ROSA, FRANCO, 2002).

Características	Antibióticos	Bacteriocinas
Modo de produção	Sintetizados por enzimas	Síntese ribossomal
Fase de Produção	Metabolismo secundário	Metabolismo primário
Mecanismo de ação	Diversos	Membrana citoplasmática
Aplicação clínica	Sim	Não
Resistência microbiana	Foram encontradas cepas resistentes	Foram encontradas cepas resistentes
Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano	Não são digeridos	São digeridos

Atividade antagonista é a aplicação mais descrita para as bacteriocinas (GILLOR, GHAZARYAN, 2007). Entretanto, outras funções têm sido o assunto de muito debate. Dobson (2011) cita que é possível que as bacteriocinas possam contribuir para a funcionalidade dos probióticos de várias formas, como facilitando a introdução e/ou domínio de um produtor num nicho já ocupado através da eliminação de patógenos e atuando como peptídeos colonizadores e/ou sinalizadores (Figura 2).



(Fonte: Adaptado de Dobson, 2011)

Figura 2 - Mecanismos de atuação das bacteriocinas que contribuem para a funcionalidade de probióticos. Facilitam a introdução e/ou domínio de um produtor num nincho já ocupado através da eliminação de patógenos, atuando como peptídeos colonizadores e sinalizadores (Adaptado de DOBSON, 2011).

A primeira bacteriocina foi descrita por Gratia em 1925, que a chamou inicialmente de "*colicina*", por que a atividade antimicrobiana foi observada pela primeira vez através da *Escherichia coli* (GRATIA, 1925 apud COTTER, 2005), atualmente são conhecidas muitas bacteriocinas, sendo sua nomenclatura relacionada ao organismo produtor (YUSUF, 2013).

Existe uma grande variedade entre as bacteriocinas em tamanho, sequência de aminoácidos, secreção e mecanismos de processamento, modificações pós-traducionais e atividade antimicrobiana (COTTER et al., 2005).

O espectro de ação das bacteriocinas pode ser bem variado, em geral, a atividade antimicrobiana é dirigida contra espécies Gram-positivas. Sua atividade contra bactérias Gram-negativas têm sido descrita apenas em situações onde a integridade da membrana externa foi comprometida (MARTINEZ et al., 2013).

A produção das bacteriocinas ocorre geralmente durante a fase *log* de crescimento, sendo muitas vezes influenciado pelo *quorum sensing* e sinalização de estresse. Sua síntese envolve quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o da produção das proteínas do transporte que exterioriza a bacteriocina e, por fim, o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao transporte, mas necessária para a excreção da bacteriocina (NES et al., 1996).

As bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente na forma de pré-peptídios ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos. Esses pré-peptídios contêm uma seqüência de 18 a 27 aminoácidos, apresentando 2-glicinas na região N-terminal. As funções dessa seqüência de aminoácidos são: evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas do transporte e uma proteína acessória (NES et al., 1996). Segundo Moll et al. (1999), as duas glicinas presentes na seqüência de aminoácidos são as responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, a seqüência de aminoácidos é removida, e a bacteriocina, excretada da célula (ENNAHAR et al., 2011).

3.3.1 Classificação das bacteriocinas

Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos e proteínas (MARTINEZ et al., 2013). Klaenhammer (1993) propôs a divisão das bacteriocinas em quatro grupos de acordo com as propriedades estruturais e físico-químicas. As bacteriocinas da classe I e II, as mais conhecidas, apresentam peso molecular

inferior a 10 kDa e termoestabilidade. As das classes III e IV não são bem conhecidas, mas apresentam peso molecular superior a 30 kDa; são termolábeis e podem ser proteínas hidrofílicas ou complexos formados por proteínas, fosfolipídios e/ou carboidratos (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação das Bacteriocinas segundo Klaenhammer (1993)

Grupo	Características
I	peptídios de baixo peso molecular (<5KDa) que contém lantionina e B metil lantionina, termoestáveis.
II II a	Peptídios pequenos (<10KDa), sintetizados na forma de precursores, os quais saem processados depois da adesão de dois resíduos de glicina. Apresentam a sequência YGNGV-C comum na parte N-terminal da molécula, termoestáveis.
II b	Sistema de dois componentes, dois peptídios diferentes necessários para a formação de um complexo, termoestáveis.
II c	Peptídios que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para atividade biológica da molécula, termoestáveis.
III	Moléculas grandes (>30 KDa), Termolábeis
IV	Moléculas complexas constituídas por proteínas e uma ou mais moléculas como lipídios ou carboidratos e termoestáveis.

Embora muitos autores ainda cite a classificação feita por Klaenhammer (1993), Outros autores propõem que a classificação das bacteriocinas por características de seus mecanismos de ação (Figura 3), dividindo as bacteriocinas em duas categorias distintas: A classe I agora chamada de lantibióticos, a classe II e suas divisões, de não lantibióticos, a antiga classe III recebe uma designação separadamente, chamada de Bacteriolisinas. As bacteriocinas da classe IV não foram incluídas nesta nova proposta de classificação, por que exigem porções não proteicas para a sua atividade e por não serem muito descritas na literatura

(SAAVEDRA et al., 2004; COTTER et al., 2005; DRIDER et al., 2006; ZACHAROF, LOVITT, 2012).

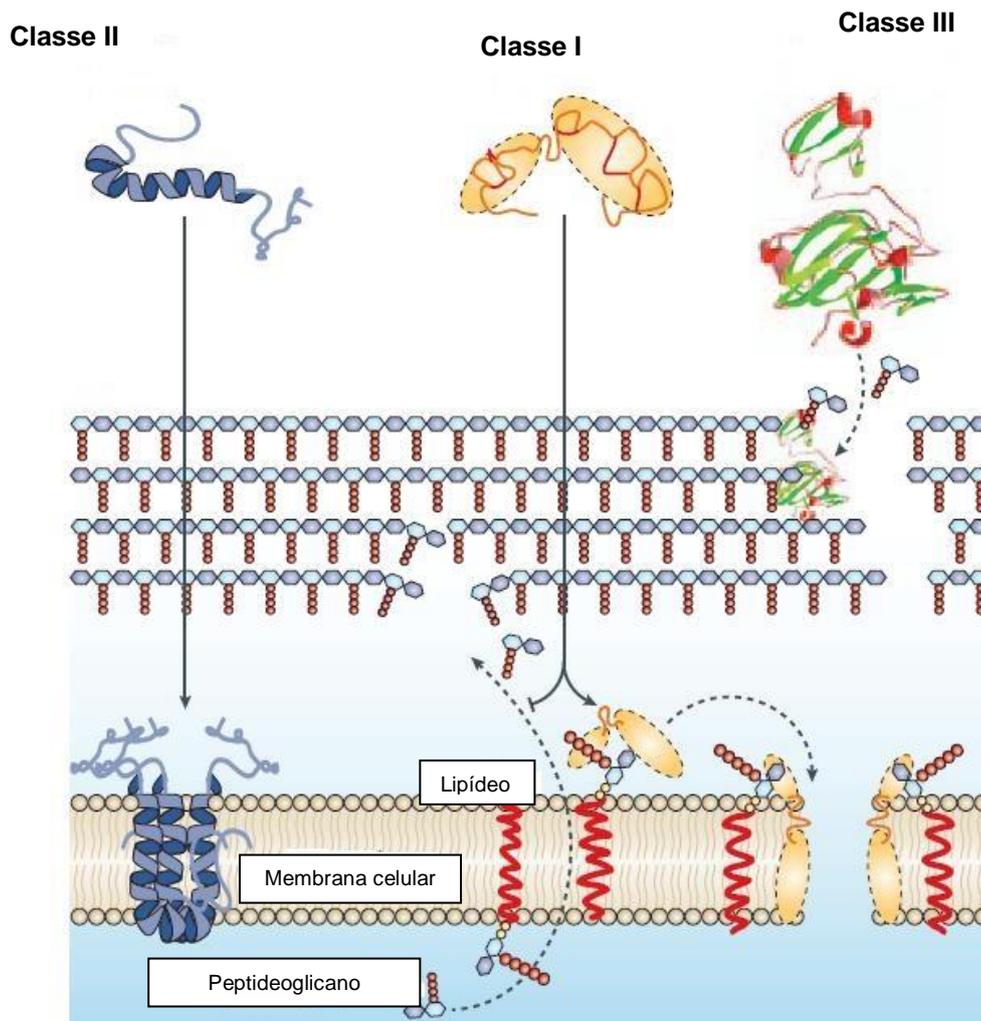


Figura 3. Modo de ação das bacteriocinas produzidas por Bactérias Ácido Láticas (Adaptado de COTTER et al., 2005)

Classe I: Lantibióticos que são pequenos peptídeos (< 5kDa) com anéis de lantionina e β -metil-lantionina. A classe I está subdividida em duas subclasses de acordo com as suas similaridades estruturais:

- Subclasse Ia: lantibióticos catiônicos e anfifílicos que agem através da formação de poros na parede celular. A nisina, utilizada como bioconservador em alimentos, pertence a esse grupo de bacteriocinas.

- Subclasse Ib: Lantibióticos globulares que agem através da inibição de enzimas (ZACHAROF, LOVITT, 2012).

É importante ressaltar que existem diferenças entre os lantibióticos (antibióticos que contêm resíduos de lantionina) e os antibióticos terapêuticos. Os lantibióticos são agentes proteicos rapidamente digeríveis por proteases do trato gastrointestinal humano. Eles são peptídeos sintetizados ribossomicamente e esse fato cria a possibilidade de melhorar suas características aumentando sua atividade e espectro de ação. Já os antibióticos são considerados metabólitos secundários (SAAVEDRA et al., 2004).

Classe II: Não-lantibióticos, são bacteriocinas de variável peso molecular (<10kDa), termoestáveis, formada de aminoácidos regulares, cujo mecanismo de ação se baseia na permeabilização da membrana e, conseqüente, perda de moléculas da bactéria alvo. Essa classe está dividida em três subgrupos (DRIDER et al., 2006; ZACHAROF, LOVITT, 2012):

- Subclasse IIa: Peptídeos ativos contra *Listeria*, como a Pediocina PA-1 que tem um limitado espectro de atividade, mas alta especificidade para agir contra *Listeria monocytogenes*;
- Subclasse IIb: Bacteriocinas formadas por dois peptídeos distintos que trabalham em sinergia dissipando o potencial de membrana, provocando a perda de íons e/ou diminuição do ATP celular;
- Subclasse IIc: Pequenos peptídeos termoestáveis que são transportados por um peptídeo guia. Apenas as bacteriocinas Divergicina A e Acidocina B pertencem a essa subclasse.
- **Classe III** – Também conhecidas como bacteriolisinas, são moléculas grandes de proteínas antimicrobianas e termolábeis. Seu mecanismo de ação difere das bacteriocinas por provocarem a lise das células bacterianas catalisando a hidrólise da parede celular (ZACHAROF, LOVITT, 2012).

3.3.3 Aplicações de bacteriocinas em alimentos

A utilização de bacteriocinas de origem láctea na indústria de alimentos tem sido amplamente relatada nos últimos anos, este fato se deve principalmente pela ocorrência natural de BAL em muitos alimentos, incluindo leite e produtos lácteos, ovos, vegetais e produtos de carne (ZACHAROF, LOVITT, 2012).

O potencial de aplicação de bacteriocinas em alimentos inclui benefícios na qualidade e segurança alimentar. A utilização de bacteriocinas como bioprotetores, ou seja, agentes antimicrobianos naturais em alimentos ajuda na conservação, promove extensão da vida útil e evita perdas por deterioração, reduzir a utilização de conservantes químicos e diminuindo o risco de transmissão de agentes patogênicos. Apresentando-se como uma alternativa para satisfazer a crescente demanda dos consumidores por alimentos seguros e minimamente processados (ARQUES, 2011).

A utilização de bacteriocinas para controlar agentes patogênicos e bactérias de deteriorantes foi avaliada numa variedade de alimentos, incluindo leite e produtos lácteos (ZOTTOLA et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 2001). Seu espectro de ação antimicrobiana inclui patógenos de grande preocupação para a indústria de laticínios tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *L. innocua* (AHMED, 2010; ARQUÉS et al., 2011).

Segundo Cotter (2005) as bacteriocinas produzidas por BAL são mais facilmente propensas à regulamentação e podem ser facilmente introduzidas nos alimentos fermentados, sem necessidade de purificação (COTTER, 2005). Segundo Shea et al. (2013) as bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos através da adição da bacteriocina purificada ou da produção *in situ* da bacteriocina, por adição ou presença da estirpe produtora.

A produção de bacteriocina é influenciado por muitos fatores, os mais importantes são o pH, temperatura e composição do meio (KECEROVÁ et al., 2004). Em alimentos, outros fatores podem influenciar a produção de bacteriocinas, tais como a concentração da bacteriocina, antagonismo a outros micro-organismos, pH do meio, presença de enzimas proteolíticas, micro-organismos resistentes, ligação aos componentes do alimento (partículas lipídicas e proteínas e inativação pela

presença de aditivos alimentares) (DAESCHEL, 1990; HOOVER; STEENSON, 1993; ALVES et al., 2006).

Segundo Ghanbari et al. (2013) os principais aspectos a serem considerados para utilização das bacteriocinas em alimentos são, primeiramente a segurança, o micro-organismo produtor tem que ser considerado seguro, possuindo status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e aprovado para uso como aditivo alimentar pelo FDA – *Food and Drug Administration*.

Não obstante, outro aspecto a ser considerado para a utilização das bacteriocinas em alimentos como a estabilidade ao tratamento térmico e a estocagem, efetividade contra os principais micro-organismos patogênicos e deteriorantes relacionados e a compatibilidade com o alimento alvo, adquirindo assim, vantagem as bacteriocinas produzidas por bactérias advindas do alimento alvo (GHANBARI et al., 2013).

A primeira bacteriocina foi descoberta em 1925 (GRATIA, 1925 apud COTTER, 2005), e a sua utilização em alimentos foi proposta em 1953 (HIRSCH et al., 1953). Segundo Cotter et al. (2005), é provável que a humanidade tenha se beneficiado da produção casual de bacteriocinas em alimentos há anos, desde a invenção do queijo e outros alimentos obtidos de leites fermentados

A perspectiva da aplicação de bacteriocina em alimentos surgiu a partir da descoberta da primeira bacteriocina advinda de BAL por Rogers, em 1928, que verificou a atividade antagonista produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*. A propriedade antimicrobiana dos *L. lactis* foi melhor estudada e descrita em 1933 por Whitehead (WHITEHEAD, 1933 apud COTTER, 2005), sendo esta bacteriocina nomeada como nisina em 1947 (MATTICK, HIRSCH, 1947) cujo nome é derivado do termo "*N-inhibitory substances*" (NiS) adicionado ao sufixo INA (DAVIES et al., 1998; CLEVELAND et al., 2001).

A nisina é um peptídeo com 34 aminoácidos, sua ampla aplicação em alimentos se dá pelo seu amplo espectro de inibição frente a micro-organismos Gram-positivos e por ser facilmente digerida por proteases digestivas, de forma que não perturba a microbiota intestinal, sendo a única bacteriocina aprovada para uso

comercial, pertencendo a lista de aditivos de alimento desde 1983 como aditivo número E234, em 1988 foi também aprovado pela FDA, sendo aprovada para uso como um conservante de alimento em aproximadamente 50 países (Figura 4) (COTTER, 2005; GUINANE et al., 2005).

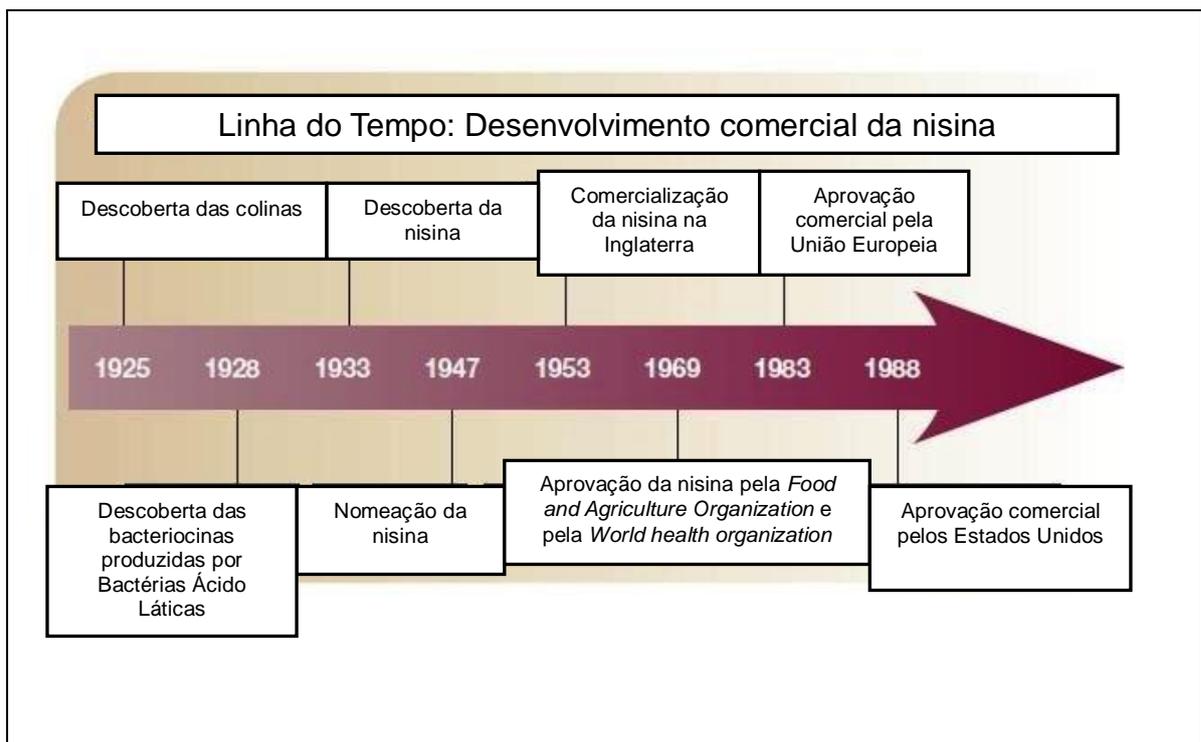


Figura 4. Evolução do uso da nisina, desde sua descoberta até sua comercialização (COTTER, 2005).

Comercialmente a nisina é produzida pela Danisco&DuPont© e recebe a denominação de Nisaplin®, sendo indicada para todos os tipos de alimentos contra bactérias Gram-positivas. Seu uso é permitido em diversos países, podendo ser utilizada em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é comercializado pela Fermentech© e seu uso é aprovada para uso em todos os tipos de alimentos, sendo o país pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos

cárneos, permitindo sua utilização na superfície externa de diferentes tipos de salsichas (DE MARTINIS, 2002).

O desenvolvimento bem sucedido da nisina é um modelo que tem estimulado a pesquisa de novas bacteriocinas. No entanto, se faz necessário a primeiro entender a biologia de novas bacteriocinas, elucidando suas relações estrutura-função, produção, imunidade, regulação e modo de ação (COTTER, 2005).

3.3.4 Enterocinas

As bacteriocinas produzidas por enterococos são chamadas de enterocinas, que apresenta atividade antimicrobiana contra estirpes estreitamente relacionadas com o micro-organismo produtor (POETA, 2008). Segundo Pagianni (2003) as enterocinas têm uma grande estabilidade a ao tratamento térmico e a variação de pH, possuindo um espectro de atividade antimicrobiana variável.

A produção de bacteriocina por enterococos foi observado pela primeira vez em 1955 durante uma pesquisa sobre bacteriófagos, naquele tempo os enterococos ainda eram classificados como subgrupo dos *Streptococcus* (KJEMS, 1955 apud FRANZ et al., 2007). Desde então muitos esforços têm sido empregados para caracterizar as enterocinas bioquímica e geneticamente.

Segundo Franz et al. (2007) e Ozdemir et al. (2011), as enterocinas podem ser agrupadas em um esquema simplificado de classificação baseado na classificação descrita por Klaenhammer (1993).

A Classe I – Enterocinas lantibióticas, possuem dois peptídeos e sofrem modificação pós-traducional.

A Classe II – Enterocinas não lantibióticas, possuem até 10kDa e não sofrem modificação pós-traducional. Esta classe pode ser subdividida em três subclasses: Classe II.1, enterocina da família pediornita (enterocina A, P e enterocina bacteriocina 31). Classe II.2, enterocinas sintetizado sem peptídeo líder (enterocina

L50A/B, e enterocina Q). Classe II.3, outros, enterocinas não-lineares de tipo enterocina pediocina (B).

Classe III – Enterocinas composta de péptidos cíclicos e inclui peptídeos antibacterianos cíclicos como a enterocina AS-48

Classe IV – Compreendendo as grandes proteínas, lábeis ao calor, tais como enterolisina).

Essas quatro classes, especialmente os enterocinas da classe II e III, têm atraído um interesse considerável para o seu uso potencial como conservantes alimentares naturais, pois não são tóxicos e inibem bactérias patogênicas e deteriorantes dos alimentos (KECEROVÁ et al., 2004; COTTER et al., 2005).

Muitas enterocinas foram identificadas ao longo dos anos, a partir de diversas fontes. A maioria delas produzidas pelos *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* (Tabela 5)

Tabela 5. Estudos envolvendo enterocinas de diferentes origens de isolamento.

Origem de isolamento	Cultura protetora	Atividade Contra	Referência
Fezes humana e de galinhas	<i>Enterococcus faecium</i> ; <i>E. faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	CAMPO et al., 2001
Queijo Argentino	<i>E. faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	FRANZ et al., 2002
Queijo Feta	<i>E. faecium</i>	<i>L. innocua</i>	SARANTINOPOULOS et al., 2002
Queijo kashkaval (Bulgaro)	<i>E. faecium</i>	<i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i>	PANTEV et al., 2002
Queijo artesanal Mexicano	<i>E. faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	ALVARADO et al., 2005

Origem de isolamento	Cultura protetora	Atividade Contra	Referência
Frutas e vegetais	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus, macroides</i>	GRANDE et al., 2007
Leite caprino	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes, Clostridium butyricum</i>	COCOLIN, 2007
Intestino de Galinhas	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	STROMPFOVA et al., 2007
Efluentes industriais	<i>E. faecium</i>	<i>L. innocua, L. monocytogenes, Clostridium, E.coli</i>	MAREKOVÁ et al., 2007
Intestino de frango	<i>E. durans, E. faecium, E. hirae</i>	<i>Salmonella enterica; E. Coli, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejun</i>	LEVCHUK et al., 2008
Salmão	<i>E. faecium</i>	<i>L. innocua</i>	TOMÉ et al., 2008
Leite	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	ALOMAR et al., 2008
Mangue	<i>E. faecium</i>	<i>Lactobacillus plantarum, E. faecalis, L. monocytogenes Salmonella paratyphii.</i>	ANNAMALAI et al., 2009
Colostro humano	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	BARRAGÁN et al., 2009
Leite fermentado da Tunísia	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	BELGACEM et al., 2010
Frutos do mar	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus, L. monocytogenes</i>	CAÑAMERO et al., 2010
Maca tailandesa	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus, L. nnocua</i>	BOHU et al., 2010
Fezes de galinhas	<i>E. faecalis</i>	<i>L. innocua</i>	BELGUESMIA et al., 2010
Fezes humanas e de animais	<i>E. faecium, E. faecalis, E. gallinarum, E. durans</i>	<i>L. monocytogenes</i>	BRANDÃO et al., 2010
Queijo Rigouta (Tunísia)	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	GHRAIRI et al., 2011
Tarag (Iogurte da Mongólia)	<i>E. faecium</i>	<i>L. innocua, L. monocytogenes</i>	IMEN HADJI-SFAXI et al., 2011

Origem de isolamento	Cultura protetora	Atividade Contra	Referência
Queijo Mossarela	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i>	TULINI1 et al., 2011
Queijo Peruano	<i>E. faecium</i> , <i>E.mundtii</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Clostridium spp.</i>	GALVEZ et al., 2011
Leite fermentado marroquino	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	BAYOUB et al., 2011
Peixe	<i>E. faecium</i>	<i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i>	CAMPOS et al., 2012
Leite e queijo de ovelha	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>L.innocua</i> , <i>S. aureus</i> .	RIVAS et al., 2012
Minas Frescal	<i>E. mundtii</i> <i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PINGITORE, 2012
Leite bovino	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	GÚTIEZ et al., 2013
Queijo de Azerbaijani	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i> .	AHMADOVA et al., 2013
Queijo cottage	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E.mundtii</i>	<i>L.monocytogenes</i> , <i>L.innocua</i> , <i>E.coli</i> ; <i>S. aureus</i>	HUANG et al., 2013
Fezes humanas	<i>E. faecium</i>	<i>L. monocytogenes</i> ; <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i>	TURGIS et al., 2013

Franz et al. (2008) afirmaram que enterocinas, à semelhança dos enterococos, são notáveis por sua diversidade e por sua distribuição onipresente entre os isolados de diferentes fontes, aumentando a possibilidade de encontrar um determinado tipo de bacteriocina adequadas para cada produto alimentar.

As duas espécies de enterococos mais frequentes em alimentos, os *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, são capazes de produzir bacteriocinas com atividade anti-listeria quando crescem em leite e queijo (GIRAFFA, 2003).

Segundo Moreno e outros (2006) as enterocinas são capazes de reduzir a contagem de *Listeria* de 2-9 ciclos logarítmicos, dependendo do produto e da enterocina testada. Os mesmos autores detectaram a produção de enterocinas por *E. faecium* RZS C5 e DPC 1146, com ação frente a *Listeria* spp.

Moreno e outros (2002) observaram que o *E. faecium* produziram enterocina durante todo o período de elaboração do queijo Cheddar, indicando que a contaminação do leite e do queijo pode ser controlada com uma produção estável de enterocinas. Assim, o uso de um fermento adjunto, aliado as boas práticas de fabricação, pode fornecer segurança microbiológica adicional à produção de queijos (SARANTINOPOULOS et al., 2009).

Embora exista uma preocupação sobre a segurança alimentar na utilização dos *Enterococcus*, a utilização de micro-organismos isolados a partir de produtos tradicionais fermentados pode revelar-se segura para serem utilizados como culturas iniciadoras, proporcionar a preservação natural através da produção de enterocinas *in vivo* (DE VUYST et al., 2003).

Estes estudos destacam a importância de enterococos em alimentos e do grande potencial de suas enterocinas. No entanto se faz necessário novas pesquisas para elucidar e possibilitar as suas utilizações de modo eficiente e seguro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED Z, WANG Y, CHENG Q, IMRAN M. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. **Afr J Biotechnol**, n.9, 2843–2850, 2010.

ALBUQUERQUE, L.C. História da fabricação de queijos. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br>>. Acesso em: 12 mar. 2007. apud SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – Relatório Completo de Estudo de Mercado: Queijos nacionais. Setembro, 2008.

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

ALOMAR, J.; LOUBIEREB, P.; DELBESA,C.; NOUAILLEB, S.; MONTELA, M.C; Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. **Food Microbiology**, 25, p.502–508, 2008.

ALVARADO, C.; GARC&A-ALMEND'REZ, B.E.; MARTIN, S.E.; REGALADO, C.\Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocin-Like Inhibitory Substances From *Enterococcus faecium* UQ31 Isolated from Artisan Mexican-Style Cheese. **Current Microbiology** Vol. 5, p.110–115, 2005.

ALVES, V.F.; MARTINEZ, R.C.R.; LAVRADOR, M.A.S.; DE MARTINIS,E.C.P. Antilisterial activity of lactic of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science, Banking**, v.74, p.623-627, 2006.

ANNAMALAI, N.; MANIVASAGAN, P.; BALASUBRAMANIAN, T.; VIJAYALAKSHMI, S. *Enterocin* from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. **African Journal of Biotechnology**. Vol.8 (22), p.6311-6316, 16 November, 2009.

ARENAS, R.; GONZALEZ, L.; BERNARDO, A.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. **Food Control**, n.15, p.271–279, 2004.

ARQUES, J.L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**. v.22, p.457-461, 2011.

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

BELGACEM, B.; ABRIQUEL, H.; BEN OMAR, N.; LUCAS, R.; MARTINEZ-CANAMERO, M.; GALVEZ, A. MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat Zouhaier. **Food Control**, 21, p.462–470, 2010.

MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; JIMÉNEZ, E.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RUIZ-BARBA, J.L.; RODRÍGUEZ, J.M. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. **International Journal of Food Microbiology**.133, p.105–112, 2009.

BENEVIDES, S.D.; TELLES, F. J. S.; GUIMARÃES, A. C. L.; FREITAS, A. N. M. Aspectos Físicoquímicos e microbiológicos do queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. CEPPA, Curitiba, v.19, n.1, p.139153, jan./jun. 2000.

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3.ed. Amsterdam:Elsevier, p.287-317, v.1, General Aspects, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura pecuária e abastecimento. Portaria n. 146, de 07/03/1996. Regulamento Técnico de identidade e qualidade queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996.p.3977-3978.

BRASIL, **Congresso Nacional**. LEI Nº 9.279, DE 14 DE MAIO DE 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. 1996 b.

BRASIL. Instrução Normativa n.30 de 26 de Julho de 2001. Regulamento técnico de Identidade e qualidade do queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 16/07/2001. Seção 1, p.14-15.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Portaria n. 57, de 15/12/2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais, e o que consta do Processo nº 21000.014787/2011-28. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20011.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**, Portaria n. 57, de 15/12/2011. Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais, e o que consta do Processo nº 21000.014787/2011-28. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20011.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa Nº 30, DE 7 DE AGOSTO DE 2013. Revoga a Portaria n. 57, de 15/12/2011. Estabelece novos critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Brasília, 2013.

BROOME, M.C. Starter culture development for improved cheese flavor. In: WEIMER, B.C. Improving the flavor of cheese. **Cambridge: Woodhed Publishing**, chap. 7, p.157-174, 2007.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, AK. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. Caracterização de microbiota láctica isolada de queijos de Coalho comercializados no Rio Grande do Norte. In: **Encontro nacional de analistas de alimentos; congresso latino americano de analistas de alimentos**, n.15, fortaleza. anais. Fortaleza: 2007.

BRUNO, L.M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Documentos 124, ISSN 1677-1915. Fortaleza-CE. p.30, 2009.

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

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

CARVALHO, J.D.G. Caracterização da microbiota láctica isolada do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e suas propriedades tecnológicas. 187f. Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas 2007.

CASALTA, E.; SORBA, J-M.; AIGLE, M.; OGIER, J-C. (2009) Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. **International Journal of Food Microbiology**, doi:10.1016/j.ijfoodmicro. 2009.

CAVALCANTE, J. F. M. **Sistema de apoio á decisão na produção de leite e queijo Coalho com segurança alimentar**. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2005.

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

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

CEBRIÁN, R.; BAÑOS. A.; VALDIVIA , E.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. **Food Microbiology** 30 (2012) 59e67.

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

COCOLIN, L.; FOSCHINO, R.; COMI, G.; FORTINA, M.G. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. **Food Microbiology**, 24, p.752–758, 2007.

COTTER, P.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: **Developing Innate Immunity For Food**. **Nature: Reviews microbiology**, London, v.3, p777-778, 2005.

DAESCHEL, M.A. Application of bacteriocin in food systems. In: BILLS, D.D.; KUNG, S. (Ed.). **Biotechnology and food safety**. Boston: Butterworth-heinemenn, p. 55-74, 1990.

DANTAS, D.S. Qualidade microbiológica do queijo de Coalho comercializado no município de Patos, PB. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Sistemas Agrosilvipastorisno Semi-árido, Patos – PB, 2012.

DAVIES, E. A. et al. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 27, n. 3, p. 186-187, 1998.

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

DOBSON, A.; COTTER, PAUL D; ROSS, P. R.; HILL, C. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? **Minireview. Applied and Environmental Microbiology**, doi:10.1128/AEM.05576-11, p. 1–6, 2012.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, n.25. p.392–399, 2008.

DUARTE, D.A.M., SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B., RIBEIRO, A.R. VASCONCELOS, AM.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *listeria monocytogenes* e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de Coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, jul./set., 2005.

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

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Queijo de Coalho é fonte de renda no Nordeste. 2008. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/outubro/4a-semana/queijo-deCoalho-e-tema-do-dia-de-campo-na-tv/?searchterm=queijo de Coalho](http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2008/outubro/4a-semana/queijo-deCoalho-e-tema-do-dia-de-campo-na-tv/?searchterm=queijo%20de%20Coalho)>. Acesso em: 10 jan. 2010.

ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K., ISHIZAKI A.. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** v.24, n.1. p.85-106, 2011

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

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

FERREIRA, W.F.; FILHO, J. R. F. Avaliação da qualidade físico - químicos do queijo Coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil. ISSN: 1981-3686 / v.02, n.01, p.127-133, 2008.

FILHO, J. R. F.; FILHO, J.S.S.; OLIVEIRA, H.B.; ANGELO, J.H.B.; BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo "Coalho" artesanal fabricado em Jucati – PE. EXTENSIO: **Revista Eletrônica de Extensão**, ISSN 1807-0221, v.6, n.8, 2009

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

FONTENELE, M.A.; EGITO, A.S.; FOLSTA, K.C.B.M.; BASTOS, M.S.R. **Padronização de método cromatográfico para caracterização queijo Coalho**. Congresso Brasileiro de Qualidade do leite, Florianópolis. anais. florianópolis: cbql, 2010. 3f. 1cd-rom. 4, 2010.

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

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

FRANZ, C. M. A. P.; GRUBE, A.; HERRMANN, A.; ABRIOUEL, H.; STÄRKE, J.; LOMBARDI, A.; TAUSCHER, B.; HOLZAPFEL, W.H. Biochemical and Genetic Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309 **Applied and environmental microbiology**, p.2550–2554, Vol.68, No.5 0099-2240/02/\$04.000 DOI: 10.1128/AEM.68.5.2550–2554. 2002.

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A.E.R.; MACIEL, J.F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de Coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

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

FRANZ, C.M.; VAN BELKUM, M.J.; HOLZAPFEL, W.H.; ABRIOUEL, H.; GALVEZ, A. (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31:293–310, 2006.

FURTADO, M.M. A qualidade do leite. In: **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo Editora Globo, p.21-33, 2005.

GHANBARI, M; JAMI, M.; DOMIG, K.J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT - Food Science and Technology*. v.54, p.315:324, 2013.

GIANNINO, M. L. Study of microbial diversity 1 in raw milk and fresh curd used for 2 Fontina cheese production by culture independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 3 v.130, n.3, p.188-195, 2009.

GILLOR O, GHAZARYAN L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2:115–122, 2007.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, n.26, p.163-171, 2002.

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

GOMES, B.C., ESTEVES, C.T., PALAZZO, I.C.V., DARINI, A.L.C., FELIS, G.E., SECHI, L.A., FRANCO B.D.G.M., Martinis E.C.P. **Prevalence and characterization of *Enterococcus spp.* Isolated from Brazilian foods.** *Food Microbiology*, n.25, p.668– 675, 2008.

GONDIM, F.A.L. Renforcement des propriétés organoleptiques d'un fromage à pâte pressée brésilien COALHO DO CEARÁ à l'aide de la lipase-estérase de *Rhizomucor miehei*. 1995. Thèse (Doctorat), L'Institut National Polytechnique de Lorraine, 118p. 1995.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v.7, n.12, p.751-871, 2007.

GRANDE, M.J., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R.L., VALDIVIA, E., BEN OMAR, N., MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M., GÁLVEZ, A., Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. **Journal of Food Protection**, n.70, p.2339–2345. 2007.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93**, 1040–1041 (1925) (in French). apud: COTTER, P.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature: Reviews microbiology**, London, v.3, p777-778, 2005.

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. A review. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1316–1325, 2005.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterocci strains isolated from white cheese. **International Journal of dairy technology**, Oxford, v.60, n.2, p.105-108, 2007.

HARBUTT, J. O livro dos queijos. São Paulo: Editora Globo, 1a Ed., p.5-6, 2010.

HIRSCH, A., GRINSTED, E., CHAPMAN, H. R. & MATTICK, A. T. R. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Sci.* **18**, 205–206 (1953) apud COTTER, P.D.; HILL, C.;

ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiol.** 3:777–788. 2005.

HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. Bacteriocins of lact acid bacteria. San Diego: **Academic Press**, p.274, 1993.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. Functionalty of enterococci in meat products. Review Meat Technology Center (IRTA), Granja Camps i Armet s/n, ES-17121 Monells, Spain Accepted 26 February 2003. **International Journal of Food Microbiology** 88 (2003) 223– 233

IRLINGER, F., MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr Opin Biotechnol*, doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016. 2009.

JAMET, E.; AKARY,E.; POISSON, M.A.; CHAMBA, J.F.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, n.31, p.191-198, 2009.

KARL H. SCHLEIFER* AND RENATE KILPPER-BALZ. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **International Union of Microbiological Societies**. Vol. 34, No. 1. 1984.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. Review. Institute of Medical Microbiology, University of Zu"rich, Gloriastrasse 30/32, P.O. **International Journal of Food Microbiology**, n.88, 255– 262, 2003.

KECEROVÁ, K.; PRISTAŠ, P.; JAVORSKÝ, P. Bacteriocin Production and Sensitivity. **Folia Microbiol.** v.49 (2), p.172–174, 2004.

KJEMS, E., 1955. Studies on streptococcal bacteriophages: I techniques for isolating phage producing strains. **Pathology and Microbiology Scandinavia** 36, 433–440 apud

FRANZ, C.M.; VAN BELKUM, M.J.; HOLZAPFEL, W.H.; ABRIOUEL, H.; GALVEZ, A. (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiol Rev** 31:293–310.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n. 2, p. 103-125, 1998.

LAUKOVÁ, A.; SKAUGEN, M. NES, I. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **Ind Microbiol Biotechnol** (2007) 34:533–537 DOI 10.1007/s10295-007-0226-4 123.

LINE, J. E.; SVETICH, E. A.; ERUSLANOV, B.V.; PERELYGIN, V.V.; MITSEVICH, E.V.; MITSEVICH, P.; LEVCHUK; SVETICH, O.E.; SEAL, B.S.; SIRAGUSA, G. R.; STERN, N.J. Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **American Society for Microbiology**. All Rights Reserved. Mar. 2008, p. 1094–1100 Vol. 52.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias ácido láticas e leveduras associadas com o queijo Minas artesanal produzido na região de Serra do Salitre, Minas Gerais **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (online). 1996, vol.61, n.1. pp.266-272. ISSN 0102-0935.

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

MACHADO, G. M.; COSTA, R.G.B; PAULA, J.C.J.; PAIVA, P.H.C; TAVEIRA, L.B.; ALMEIDA, f.a. viabilidade tecnológica do uso de ácido láctico na fabricação de queijo de Coalho. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, mar/abr, nº 379, 66, 1:15, 2011.

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

MALCATA, F.X.; PINTADO, A.I., PINHO, O.; FERREIRA, I. M.P.L.V.O.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M.P. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal** 18 (2008) 631–640.

MAREKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; SKAUGEN, M. NES, I. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **Ind Microbiol Biotechnol** (2007) 34:533–537 DOI 10.1007/s10295-007-0226-4 123.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.; OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium spp.* A review. **Biotechnology Advances** 31 482–488, 2013.

MATTICK, A. T. R. & HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* **2**, 5–7 (1947) apud COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiol.** 3:777–788. 2005.

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

MENEZES, S.S.M. Queijo de Coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)** V. 28, No. 1, 2011.

MOLL, G.N., KONINGS, W. N., DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.76, p.185-198, 1999.

NASSU, R.T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de Coalho Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF: 40 p, ISBN 85-7383-325-4. **Embrapa Informação Tecnológica**, 2006.

NES IF, JOHNSBORG O. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. **Curr Opin Biotechnol** 15: 100–104, 2004.

NETO, L. G. G., et al. Influência do tratamento UAT no valor nutritivo do leite. Leite e derivados, São Paulo, vol.12, n.67, p.36-39, nov./dez. 2002.

NETO, T. M. S. Caracterização da microbiota láctica, não láctica e utilização do tratamento ôhmico para processamento de queijo de Coalho. Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. RECIFE, 2010.

OZDEMIR, G.B.; ORYAS, E.; IBIYIK, H.; ZTEBER, M.O.; BOZDOĞAN, B. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. **Indian J Microbiol** (Apr–June 2011) 51(2):182–187 DOI 10.1007/s12088-011-0143-0.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Baltimore, v.21, p.465-499, 2003.

PAULA, J. C.J.; ALMEIDA, F.A; PINTO, M.S.; MARTINS, V.A.; TEODORO, V.A.M; COSTA, R.G.B. Aproveitamento de soro de queijo de Coalho na elaboração de bebida láctea pasteurizada. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, Jul/Ago, nº 387, 67: 13-20, 2012.

PANTEV, A.; KABADJOVA, P.; DALGALARRONDO, M.; HAERTLE, T.; IVANOVA, I.; DOUSSET, X.; VOST, H.; CHOBERT, J.M. Isolation and Partial Characterization of an Antibacterial Substance Produced by *Enterococcus faecium* Folia Microbiol. 47 (4), 391-400 (2002).

PERNAMBUCO. Lei n 13.376, de 20 de dezembro de 2007. Sanciona a Lei que dispõe sobre o processo de produção do Queijo de Coalho artesanal, Governo Estadual de Pernambuco. 2007.

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

POETA, P.; IGREJAS, G.; COSTA, D.; SARGO, R.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. **J Basic Microbiol**, 48:385–392., 2008.

RANGEL, R. Leite e derivados com mais qualidade e preço justo. In: **Revista inovação em Pauta**. FINEP, Pernambuco, p.68-71. 2009.

ROSA, C.M.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **ConScientiae Saude**, São Paulo, v.1, p.9-15, 2002.

STROMPFOVA, V.; LAUKOVA, A. In vitro study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens. Microbial host interactions. *Anaerobe* 13 (2007) 228–237. **Food Control** 30 (2013) 631e641.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D.M.; MARTINEZ, A.C.C.; LIMA, Á.S. Qualidade microbiológica de queijo-Coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M.D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology** 72 (2002) 125– 136.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO,C.; GEORGALAKI,M.D. REA, M.C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T.M.; KALANTZOPOULOS,G.; TSAKALIDOU,E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v.11, n.8, p.621-647, 2009.

SHEA, E.F.O; COTTER, P.D.; ROSS, R.P.; HILL, C. Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, p.130–134, 2013.

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

SEBRAE. Programa SEBRAE de Artesanato – Termo de Referência de Março de 2004.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – **Relatório Completo de Estudo de mercado**: Queijos nacionais. 2008.

SHERMAN, J.M., 1937. The streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1, 3 – 97. apud DOMIG, K. J., MAYER, H. K., KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp., Media for isolation and enumeration. - Review article. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.147– 164, 2003.

SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artisanal “Coalho”

cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry** 135, 1533–1538. 2012 a

SILVA, R.A. Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – Área de Concentração em Biotecnologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012 b.

SILVA, R.A.; BISMARA, P.A.; R.B. MOURA; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012 c.

SILVA, R.A. Boa saúde com queijo de Coalho artesanal. **Revista Ciência Hoje**, ed. março/abril, vol. 51, p. 54, 2013.

SOBRAL, D. et al. Queijo de Coalho: características e tecnologia. **Informe Agropecuário - Agroindústria: leite e derivados**, Belo Horizonte, v.28, n.238, p.57-62, 2007.

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

THIERCELIN, M.E., 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. C.R. Séances Soc. Biol. 5, 269– 271. apud DOMIG, K. J.,

MAYER, H. K., KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp., Media for isolation and enumeration. - Review article. International **Journal of Food Microbiology**. v.88, p.147– 164, 2003.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. Published by Elsevier B.V. Selection and/or peer review under responsibility of Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society/APCBEE, *Procedia* 2, p.50-56, 2012.

YUSUF, M. A. **Lactic Acid Bacteria:Bacteriocin Producer: A Mini Review** IOSR Journal Of Pharmacy (e)-ISSN: 2250-3013, (p)-ISSN: 2319-4219 [Www.iosrphr.org](http://www.iosrphr.org) Volume 3, Issue 4, p44-50, 2013.

WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.* **27**, 1793–1800 (1933). apud COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiol.** 3:777–788. 2005.

5. ARTIGOS

CAPÍTULO I

Perfil microbiano láctico endógeno do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e
Arcoverde - PE, Brasil.



Revista Brasileira de Ciências Agrárias
Brazilian Journal of Agricultural Sciences

ISSN 1981-0997

PERFIL MICROBIANO LÁTICO ENDÓGENO DO QUEIJO DE COALHO
ARTESANAL DE CACHOEIRINHA E ARCOVERDE - PE, BRASIL

1

2 Thiciane Carvalho Albuquerque⁽¹⁾, Giselle Dias⁽¹⁾ José Luiz de Lima Filho⁽²⁾, Maria
3 Taciana Holanda Cavalcanti⁽³⁾ e Ana Lúcia Figueiredo Porto⁽³⁾

4

5 ¹ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal. Universidade Federal
6 Rural de Pernambuco (UFRPE). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Rua Dom
7 Manoel de Medeiros s/n-Dois Irmãos-CEP 52171-900, Recife – PE

8 ² Professor Titular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco
9 (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

10 ³ Professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal
11 Rural de Pernambuco (UFRPE), Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO).

12

13 **Resumo**

14 O queijo de Coalho artesanal é um produto típico do Nordeste Brasileiro, com
15 importância expressiva para a cultura e economia do Estado de Pernambuco. A
16 microbiota endógena do leite cru é fator predominante no desenvolvimento das
17 características organolépticas típicas do produto, o presente trabalho teve por
18 objetivo caracterizar a microbiota láctea endógena do queijo de Coalho produzido
19 artesanalmente nos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde – Pernambuco/ Brasil.
20 O isolamento foi realizado nos meios *All Purpose Medium With Tween* e *Man*
21 *Rogosa and Shape*, à 30 e 42°C. Foram consideradas Bactérias Ácido Láticas as
22 Gram-positivas, cocos ou bacilos, catalase negativa, produtoras de ácido em leite
23 tornassolado. A identificação clássicas dos gêneros foi baseada na fisiologia dos
24 isolados. Foram isoladas 200 bactérias, 191 (95,5%) BAL. A identificação dos
25 gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. O

26 conhecimento do perfil microbiano láctico dos queijos estudados representa passo
27 importante no processo de obtenção de certificação de Denominação de Origem do
28 queijo de Coalho Artesanal pernambucano.

29 Palavras chave: Bactérias Ácido Lácticas, caracterização microbiológica, microbiota
30 láctea endógena.

31

32

33

.Introdução

34 Produzido há mais de 150 anos (CAVALCANTE et al., 2007), o queijo de
35 Coalho artesanal é um produto típico do Nordeste Brasileiro (FREITAS, 2013; SILVA
36 et al., 2012a). Por ser o principal queijo consumido na região (FONTENELE et al.,
37 2010) trata-se de um produto artesanal com importância expressiva para a cultura e
38 para o contexto econômico do Nordeste, principalmente nos Estados da Paraíba,
39 Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco (SILVA et al., 2012a). Não obstante, a
40 cada ano, o queijo de Coalho vem se popularizado em outras regiões do país
41 (SOBRAL, 2007).

42 O queijo de Coalho artesanal é produzido tradicionalmente com leite cru, sem
43 adição de ácido láctico ou fermento, tendo a microbiota endógena como fator
44 predominante no desenvolvimento do sabor (MACHADO, 2011). É um queijo cuja
45 tecnologia de fabricação simples e não exige equipamentos sofisticados (NASSU,
46 2006). Sua fabricação inicialmente utilizava estômago seco e salgado de animais
47 silvestres ou bezerros para a coagulação do leite (GONDIM, 1995; LIMA, 1996).

48 O caráter singular de cada queijo é resultante de uma complexa combinação
49 de fatores locais denominado de *terroir* (em francês) ou *tipicità* (em italiano). Estas
50 características peculiares do local de origem do queijo como clima, solo, umidade,
51 vegetação, raça animal, processo tecnológico de fabricação do queijo e a microbiota
52 láctica endógena, influenciam de maneira singular o produto final (CASALTA et al.,
53 2009; BROOME, 2007; BERESFORD et al., 2001).

54 De acordo com Almeida et al. (2010) e Silva et al. (2013), o queijo de Coalho
55 é uma representação genuína da tradição e cultura do estado de Pernambuco, e por
56 esta razão está passando por um processo de obtenção de certificação de indicação
57 geográfica, com a finalidade de lhe atribuir uma identidade própria que irá diferenciá-
58 lo dos demais produzidos na região Nordeste, como uma maneira de agregar valor a
59 um produto tipicamente regional.

60 Este projeto começou a ser desenvolvido em 2001 através da parceria entre o
61 Instituto de Tecnologia de Pernambuco e do SEBRAE de Garanhuns, para
62 desenvolver melhorias na produção, assegurar a qualidade e obter do selo de
63 Indicação Geográfica do queijo de Coalho artesanal Pernambucano. O projeto
64 envolve a produtores locais, pesquisadores e instituições públicas e de apoio. Que
65 promovem projetos relacionados à identificação e caracterização de do *terroir*,
66 cadastro e capacitação de produtores e criação de cooperativas e implementação de
67 programas de autocontrole que visam melhor à qualidade higiênico-sanitária do
68 produto. (SEBRAE, 2008).

69 Como passo importante no processo de obtenção de certificação de indicação
70 geográfica do queijo de Coalho artesanal de Pernambuco, o presente trabalho teve
71 por objetivo caracterizar a microbiota láctea endógena do queijo de Coalho
72 produzido artesanalmente nos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde, Região
73 Agreste e Sertão de Pernambuco-Brasil.

74

75

76

Material e métodos

77

Seleção e coleta das amostras de queijo

79 Foram coletadas duas amostras de queijo de Coalho Artesanal fabricadas em
80 Cachoeirinha e Arcoverde, Pernambuco – Brasil.

81 As unidades produtoras foram pré-selecionadas de acordo com a higiene e
82 com a presença do selo do SIE (Serviço de Inspeção Estadual de Pernambuco). A

83 unidades produtoras localizadas no município de Cachoeirinha é uma associação de
84 produtores de leite, enquanto que a unidades produtoras de Arcoverde é de
85 propriedade particular.

86 As visitas de coleta contaram com a visualização completa do fluxograma de
87 produção, desde a hora da chegada do leite até o produto final pronto para o
88 consumo. As amostras foram transportadas acondicionadas em caixas isotérmicas
89 e encaminhadas para análise no Laboratório de Tecnologia de Bioativos
90 (LABTECBIO), localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

91 Os Municípios estudados pertencem estão incluídos na área geográfica de
92 abrangência do semiárido brasileiro, definida pelo Ministério da Integração Nacional
93 em 2005. Esta delimitação tem como critérios baixa umidade, temperaturas médias
94 anuais cerca de 26°C, índice pluviométrico inferior a 800 mm ao ano, o índice de
95 aridez até 0,5 e o risco de seca maior que 60%.

96 O Município de Cachoeirinha pertencente a Mesorregião Agreste
97 Pernambucano, Microrregião Vale do Ipojuca (latitude 08°29'11" sul, longitude
98 36°13'59" oeste, altitude de 536 metros). Enquanto que Arcoverde pertencente a
99 Mesorregião Sertão Pernambucano, Microrregião Sertão Moxotó (latitude 08°25'08"
100 sul, longitude 37°03'14" oeste, altitude 663 metros).

101

102 *Preparo das amostras de queijo*

103 Para a análise microbiana 25g das amostras de queijo foram
104 homogeneizadas com 50mL de solução de citrato de sódio 2% (m/v), previamente
105 aquecida à 45°C, em um homogenizador tipo *Stomacher* (Seward, 400), até a
106 completa dissolução. Em seguida, foi realizado um enriquecimento das amostras
107 com 5mL do homogeneizado inoculadas em 10mL de Leite Desnatado Reconstituído
108 (LDR) 12% (m/v), nas temperatura 30 e 42°C por 24 horas.

109

110

111 *Isolamento, purificação e identificação das BAL*

112 O isolamento foi realizado a partir de diluições seriadas decimais das
113 amostras enriquecidas em LDR em solução peptonada a 0,1% (m/v), sendo
114 escolhida a diluição de 10^{-5} para plaqueamento, em duplicata, “*sur-plate*” no meio All
115 Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “*pour-plate*” no meio Man,
116 Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), ambas incubadas nas temperaturas de 30
117 e 42°C, por 48h (HALL et al., 2001). Os isolados foram mantidos em estoque
118 congelado a -20°C, em caldo LDR 12% (m/v) e glicerol 15% (m/v), para posterior
119 identificação (FRANK et al., 1992; HARRIGAN, 1998).

120 As bactérias isoladas foram identificadas através dos testes de coloração de
121 Gram (QEEL KIT – Química Especializada Erich, LTDA), morfologia celular, atividade
122 da catalase e produção de ácido em meio leite tornassolado - *Litmus Milk* – LM
123 (Himedia), sendo consideradas BAL apenas as Gram-positivas, catalase negativa,
124 na forma de cocos ou bacilos e produtoras de ácido em leite tornassolado em até
125 sete dias (HALL et al., 2001).

126

127 *Identificação dos gêneros de BAL*

128 A identificação dos gêneros das BAL com morfologia de coco foi realizada
129 através de testes de crescimento com base na fisiologia dos isolados, em duplicata,
130 nas seguintes condições de crescimento: temperaturas de 10 e 45°C, pH de 4,4, e
131 9,6; teor de NaCl 6,5% e produção de CO₂ a partir da glicose. Enquanto que as BAL
132 em forma de bacilo foram submetidas aos testes de crescimento nas temperaturas
133 de 15 e 45°C, incubados, respectivamente, por 5 e 2 dias, e produção de CO₂ a
134 partir da glicose (COGAN, 1997).

135 O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado em LDR
136 10%, enquanto que os testes de crescimento nos pH 4,4 e 9,6 e na presença de
137 6,5% de NaCl foram conduzidos no caldo APT. Para o teste de produção de CO₂ foi
138 utilizado o caldo MRS, suplementado com 5% de glicose com tubo de Durham
139 invertido, acrescido de uma camada de 1cm de óleo mineral (COGAN, 1997).

140

Resultados e discussão

141

142

143

A avaliação da microbiologia láctica do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde, Pernambuco – Brasil, foram isoladas um total de 200 bactérias, 100 do município de Arcoverde e 100 de Cachoeirinha.

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

Tabela 1. Bactérias isoladas do queijo de Coalho artesanal fabricado nos municípios de Cachoeirinha e Arcoverde-PE, Brasil.

	Cachoeirinha		Arcoverde	
	n	%	n	%
Amostras não identificadas	4	4	5	5
Bactéria Ácido Láctica	96	96	95	95
<i>Morfologia de Bacilo</i>	6	6,25	9	9,47
<i>Morfologia de coco</i>	90	93,75	86	90,53
Total de amostras	100	100%	100	100%

155

156

157

158

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram prevalência de micro-organismos com morfologia de cocos, corroborando com Franciosi et al. (2009) que cita a contagem de BAL em amostra de leite cru demonstraram a predominância de cocos sobre bacilos.

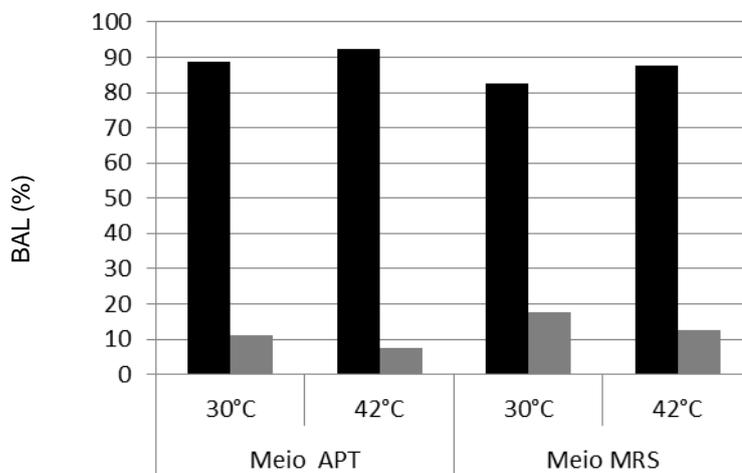
159

160

Em queijos a prevalência de BAL com morfologia de cocos também foi descrita em queijos artesanais fabricado em outros países, tais como 'Peñamellera' -

161 Espanha (ESTEPAR et al., 1999), Valdeón de León - Espanha (LÓPEZ-DÍAZ et al.,
 162 2000), 'Sán Simon' - Espanha (FONTÁN et al., 2001), Aspromonte - Itália (CARIDI et
 163 al., 2003), Genestoso - Espanha (ARENAS et al.; 2004), Manchego - Espanha
 164 (BALLESTEROS et al., 2006), Terrincho - Portugal (MALCATA, 2008), Raschera -
 165 Italia (DOLCI et al., 2008).

166 A Figura 1 mostra os resultados obtidos neste trabalho, correlacionando a
 167 morfologia das BAL isoladas e as diferentes condições de cultivo utilizadas. Foi
 168 possível observar que ambos os meios e temperaturas empregadas proporcionaram
 169 bom crescimento microbiano de todas as BAL. Embora o meio APT à 42°C tenha se
 170 apresentado com melhor desempenho para o cultivo das BAL com morfologia de
 171 cocos, enquanto que para os bacilos as melhores condições foram observadas em
 172 meio MRS à 30°C.



173

174 Figura 1. Morfologia das Bactérias Ácido Láticas (BAL) isoladas de queijo de Coalho
 175 Artesanal, produzidos em Cachoeirinha e Arcoverde – Pernambuco, Brasil, “sur-
 176 plate” no meio All Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “pour-plate”
 177 no meio Man, Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), nas temperaturas de 30 e
 178 42°C. Morfologia de Cocos (■) e morfologia de bacilos (■)

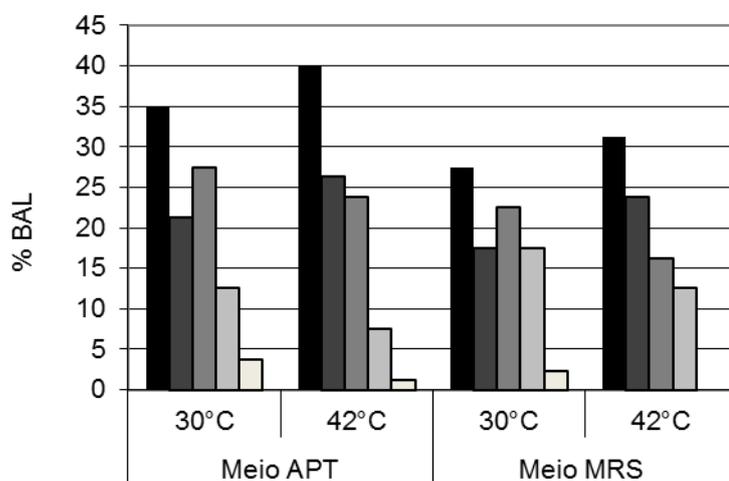
179 Estes resultados obtidos podem ser justificados pela maior especificidade do
180 meio APT para o cultivo de micro-organismos com morfologia de cocos, enquanto
181 que o MRS é particularmente seletivo para o isolamento de bacilos, uma vez que
182 seu pH é reduzido pela adição de ácido acético, favorecendo o crescimento destes
183 micro-organismos. (RICHTER E VEDAMUTHU, 2011).

184 A identificação dos gêneros das 191 BAL isoladas e identificadas neste
185 trabalho revelaram a predominância dos gêneros *Enterococcus* (50,7%) e
186 *Streptococcus* (20,5%), seguida pelos *Lactococcus* (17,8%), *Lactobacillus* (9,1%) e
187 *Leuconostoc* (1,9%).

188 Silva et al. (2012b) obteve resultados similares aos encontrados neste
189 trabalho, quando analisou a microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal fabricado
190 em Venturosa, Correntes, Capoeiras e Arcoverde, São Bento do Una e
191 Cachoeirinha. Descrevendo que o perfil ácido láctico do queijo de Coalho da Região
192 Agreste de Pernambuco é constituído de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus*
193 *faecium*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*, sugerindo que as
194 características organolépticas deste queijo estão baseadas em um ecossistema
195 heterogêneo com a interação de todos os gêneros encontrados.

196 A Figura 2 mostra a frequência dos gêneros das BAL obtidos nas diferentes
197 condições de cultivo empregadas para seu isolamento e identificação. Através das
198 análises feitas neste trabalho foi possível observar que as melhores condições de
199 cultivo para os gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*
200 foram obtidas em meio APT, apenas o gênero *Lactobacillus* apresentou melhor
201 crescimento em meio MRS. Em relação as temperaturas empregadas a temperatura
202 42°C isolou a maior parte dos *Enterococcus* e *Streptococcus*, enquanto que a
203 temperatura de 30°C foi melhor para o isolamento dos *Lactococcus*, *Leuconostoc*. e
204 *Lactobacillus*.

205



206

207 Figura 2. Frequência dos gêneros de Bactérias Ácido Láticas (BAL) isoladas de
 208 queijo de Coalho artesanal, produzido em Cachoeirinha e Arcoverde – PE, “sur-
 209 plate” no meio All Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “pour-plate”
 210 no meio Man, Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), nas temperaturas de 30 e
 211 42°C. *Enterococcus* (■), *Streptococcus* (■), *Lactococcus* (■), *Lactobacillus* (■),
 212 *Leuconostoc* (■)

213

214 A prevalência dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* obtidos neste
 215 trabalho, demonstra um perfil microbiano láctico termofílico do queijo de Coalho
 216 artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – Pernambuco, Embora alguns autores citem
 217 os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* como predominantes para queijo frescos
 218 produzidos artesanalmente (GUEDES NETO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2007;
 219 QUEIROZ, 2008).

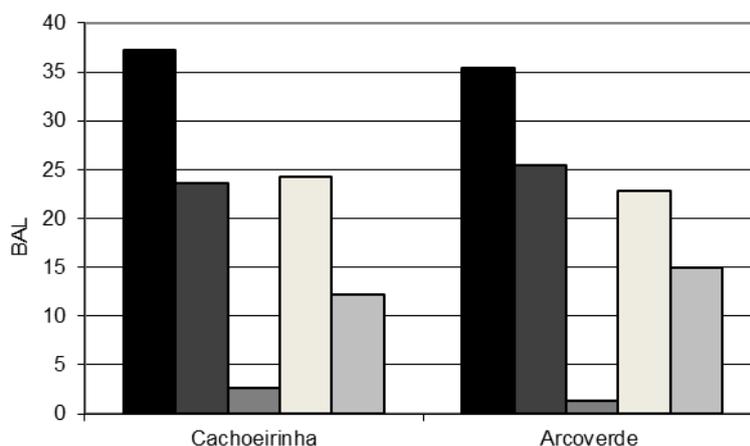
220 A presença de *Enterococcus* e *Streptococcus* em queijos artesanais já foi
 221 descrita em diferentes países, na Espanha em queijos como Quesaila Arochena
 222 (MARTÍN-PLATERO, 2009) e Manchego (NIETO-ARRIBAS, 2011), na Grécia com o
 223 queijo Feta (SARANTINOPOULOS et al., 2002), na Itália o Pecorino Pardo (MANNU
 224 E PABA, 2002). No Brasil, o gênero *Enterococcus* foi predominante entre as BAL

225 isoladas do queijo Coalho artesanal produzido no Ceará (CARVALHO, 2007) e no
226 Rio Grande do Norte (BRUNO et al., 2007).

227 O benefício dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* em queijos artesanais
228 está relacionado ao desenvolvimento do aroma e sabor, através da intensa atividade
229 lipolítica, produção de compostos aromáticos voláteis a partir do citrato, como
230 diacetil, acetaldeído e acetoína (BULUT et al., 2005; KONGO et al., 2007).

231 A predominância dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* isolados dos
232 queijos de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde pode estar relacionada
233 com a temperatura ambiental elevada, que atua como fator predeterminante de
234 bactérias mais resistentes a temperaturas elevadas, CARIDI et al. (2003) citam que
235 estes gêneros sobrevivem em condições adversas como pH, temperatura e
236 salinidade extremas. Condições ambientais estas encontradas nos Municípios de
237 Cachoeirinha e Arcoverde, que estão incluídos na área geográfica de abrangência
238 do semiárido brasileiro, definida pelo Ministério da Integração Nacional (2005) e
239 delimitação tem como critérios baixa umidade, temperaturas médias anuais cerca de
240 26°C, índice pluviométrico inferior a 800 mm ao ano, o índice de aridez até 0,5 e o
241 risco de seca maior que 60%.

242 . Outros gêneros isolados em menores proporções das amostras de queijo de
243 Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde foram os gêneros *Lactococcus*,
244 *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Segundo (TORRES-LIANEZ et al., 2006) a baixa
245 prevalência desses micro-organismos está relacionada com a alta seletividade
246 necessária para o crescimentos desses micro-organismos e baixa resistência à
247 temperaturas elevadas. A Figura 3 mostra o perfil microbiano láctico dos Queijos de
248 Coalho Artesanais produzidos em Cachoeirinha e Arcoverde – PE.



249

250 Figura 3. Perfil microbiano láctico dos Queijos de Coalho Artesanais produzidos em
 251 Cachoeirinha e Arcoverde – PE. *Enterococcus* (■), *Streptococcus* (■), *Leuconostoc*
 252 (■), *Lactococcus* (■), *Lactobacillus* (■)

253

254 Através dos resultados obtidos foi possível observar a semelhança do perfil
 255 microbiano láctico encontrado nos dois municípios estudados, Cachoeirinha e
 256 Arcoverde (Figura 3).

257 Irlinger & Mounier (2009) e Ramiro (2009) que citam que os queijos artesanais
 258 sofrem grande influência da tecnologia e o *Terroir* singular de cada local que o
 259 produzem, influenciando diretamente a qualidade microbiológica láctica da matéria
 260 prima do queijo, o leite, e conseqüentemente seus produtos.

261 Situação encontrada nas condições estudadas uma vez que, segundo Rangel
 262 (2009) o queijo de Coalho Pernambucano tem tudo para conseguir essa obtenção do
 263 selo DO, uma vez que o agreste de Pernambuco apresenta em seu *terroir*
 264 características específicas para a produção deste tipo de queijo, como a cultura
 265 secular da produção e consumo de laticínios, o clima e a alimentação do gado, que
 266 consome ração tradicional e palma forrageira, cacto de origem mexicana, que é hoje
 267 um complemento indispensável na alimentação do gado.

268 Segundo Neto (2010) o fluxograma de produção do queijo de Coalho
269 artesanal em Pernambuco tem o fluxograma de produção tradicionalmente
270 padronizado por

271 .

272

273

Conclusões

274 A maior parte das bactérias isoladas (92,2%) do queijo de Coalho de
275 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, foram confirmadas como BAL;

276 Os gêneros isolados por ordem de frequência foram: *Enterococcus*,
277 *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*;

278 A semelhança do perfil microbiano láctico encontrado nos dois municípios
279 estudados, Cachoeirinha e Arcoverde – PE, sugere padronização do queijo de
280 Coalho artesanal produzido em Pernambucano, através de particularidades do
281 Fluxograma de produção e do *terroir*

282

283

284

Agradecimentos

285 Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e
286 à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -
287 FACEPE, pelo suporte financeiro. Processo n. IBPG-0687-5.07/09.

288

289

Referências

290 ARENAS, R.; GONZALEZ, L.; BERNARDO, A. ; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E.
291 Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid
292 curd variety, throughout ripening. Food Control 15 (2004) 271–279.

293

294 BALLESTEROS, C.; POVEDA, J.M.; GONZA´LEZ-VIÑAS, M.A.; CABEZAS, L.;
295 Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial
296 Manchego cheeses. *Food Control* 17 (2006) 249–255.

297

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

302

303 COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.;
304 COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.;
305 KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E.
306 Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy*
307 *Research*, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

308

309 DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.
310 Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its
311 indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25 (2008) 392–399.

312

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

317

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

321 FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A.E.R.; MACIEL, J.F. Avaliação microbiológica e
322 físico-química de leite cru e queijo de Coalho produzidos no estado da Paraíba.
323 Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42,
324 2013.

325

326 FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J.
327 Microbiological changes in 'San Simón' cheese throughout ripening and its
328 relationship with physico-chemical parameters. Food Microbiology, v. 18, n. 1, p. 25-
329 33, 2001.

330

331 FORTINA, M. G.; RICCI, G.; ACQUATI, A.; ZEPPA, G.; GANDINI, A.; MANACHINI, P.
332 L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal
333 protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food
334 Microbiology, v. 20, n. 4, p. 137-404, Aug., 2003.

335

336 FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Test for groups of
337 microorganisms. In: MARSHALL, R. T. Standard Methods for the Examination of
338 Dairy Products, 16 ed. Washington: American Public Health Association, 1992. Cap.
339 8, p.271-286.

340

341 HARRIGAN, W. F. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3^a ed. San Diego:
342 Academic Press, 1998.

343

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

348 KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of
349 probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, n. 2, p.
350 103-125, 1998.

351

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

355

356 MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E.
357 Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant
358 to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, n. 3, p. 213-222,
359 2003.

360

361 MALCATA, F.X.; PINTADO, A.I., PINHO, O.; FERREIRAB, I. M.P.L.V.O.; PINTADO,
362 M. M. E.; GOMES, A. M.P. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles
363 of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*
364 18 (2008) 631–640.

365

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

368

369 SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.;
370 PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artisanal “Coalho”
371 cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry* 135,
372 1533–1538. 2012 a

373

374 SILVA, R.A. Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de
375 queijos de Coalho Artesanal produzidos na Região Agreste do Estado de
376 Pernambuco-Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
377 Biociência Animal – Área de Concentração em Biotecnologia da Universidade
378 Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012 b.

379

380 SILVA, R.A.; BISMARA, P.A.; R.B. MOURA; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.;
381 CAVALCANTI, M.T.H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho
382 artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med.*
383 *Vet. Zootec.*, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012 c.

384

385 SILVA, R.A. Boa saúde com queijo de Coalho artesanal. *Revista ciência hoje*, ed.
386 março/abril, vol. 51, p. 54, 2013.

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

CAPÍTULO II

**Atividade antagonista de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*
isolados do queijo de Coalho artesanal produzido nos municípios de
Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil**

Ciência e Agrotecnologia

ISSN 1413-7054 *printed version*

ISSN 1981-1829 *online version*

24 **ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis***
25 **ISOLADOS DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NOS**
26 **MUNICÍPIOS DE CACHOEIRINHA E ARCOVERDE- PE, BRASIL**

27
28 THICIANE CARVALHO ALBUQUERQUE⁽¹⁾, MEIRE LIMA⁽²⁾, MARIA TACIANA
29 HOLANDA CAVALCANTI⁽³⁾ E ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO⁽³⁾

30
31 ¹ Doutoranda do Programa Pós-graduação em Biociência Animal. Universidade
32 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Departamento de Morfologia e Fisiologia
33 Animal. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n-Dois Irmãos-CEP 52171-900, Recife – PE

34 ² Mestranda do Programa Pós-graduação em Biociência Animal. Universidade
35 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

36 ³ Professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade
37 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Laboratório de Tecnologia de Bioativos
38 (LABTECBIO).

39
40
41 **Resumo**

42 Os enterococos são bactérias naturalmente encontradas em vários alimentos,
43 desempenhando importante papel tecnológico e no controle de micro-organismos
44 deteriorantes e patogênicos no leite e seus derivados, através da produção de
45 determinados compostos com atividade antagonista. Este trabalho teve como
46 objetivo avaliar a presença de substâncias com atividade antagonista produzidas por
47 enterococos isolados de queijo de Coalho artesanal fabricados em Cachoeirinha e
48 Arcoverde – PE, Brasil. O isolamento e identificação das bactérias do gênero
49 *Enterococcus* foi baseado em testes nas temperaturas 10 e 45°C, pH de 4,4, e 9,6;
50 teor de NaCl 6,5% e produção de CO₂ a partir da glicose. A identificação das
51 espécies foi realizada através de testes com sorbitol e citrato. A atividade

52 antagonista frente aos patógenos foi determinada através da metodologia *Stab-over-*
53 *law* modificada utilizando *Listeria innocua* (ATCC33090), *Staphylococcus aureus*
54 (ATCC 6538) e *Escherichia. coli* (ATCC 25922). Foram isoladas e identificados 309
55 amostras do gênero *Enterococcus*, sendo 205 (66,34%) *E. faecalis* e 104 (33,66%)
56 *E. faecium*. Deste total, 79,93% apresentaram atividade antagonista contra pelo
57 menos uma das bactérias indicadoras testadas. A *L. innocua* foi a mais sensível,
58 inibida por 79,93% dos enterococos, seguida pelo *S. aureus* com 57,60% e *E. coli*
59 com 27,18%. A atividade antagonista apresentada pelos *Enterococcus faecalis* e *E.*
60 *faecium* isolados da microbiota endógena do queijo de Coalho artesanal possuem
61 grande potencial no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes neste tipo de
62 alimento.

63

64 **Palavras chave:** Queijo de Coalho, Enterococos, atividade antagonista, Listéria

65

66

67 **1. Introdução**

68 O queijo de Coalho artesanal é um produto típico do Nordeste Brasileiro,
69 representando um importante patrimônio para a Região (FREITAS, 2013; SILVA et
70 al., 2012).

71 Silva (2012b) sugere que as características organolépticas deste queijo é
72 baseada em um ecossistema heterogêneo de bactérias ácido lácticas (BAL) com a
73 interação dos gêneros *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus*
74 *thermophilus* e *Lactococcus lactis*.

75 O gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo o *Enterococcus*
76 *faecium* e *Enterococcus faecalis* os mais frequentes em alimentos (GIRAFFA, 2003).
77 Este gênero sobrevive em condições adversas, como pH, temperatura e salinidade
78 extremos (CARIDI et al., 2003) e fazem parte da microbiota láctica secundária dos
79 produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2009).

80 As espécies do gênero *Enterococcus* influenciam através do desenvolvimento
81 de características sensoriais através de reações bioquímicas durante a maturação
82 do queijo: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos
83 aromáticos voláteis (HUGAS, 2003; JAMET, 2012). Além disto, os *Enterococcus* são
84 capazes de produzir substâncias com potencial antagonista, como ácidos orgânicos
85 (ácido láctico), peróxido de hidrogênio, bacteriófago lítico, enzimas proteolíticas e
86 substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas
87 (NAIDU et al., 1999; GIRAFFA, 2003; HAJIKHANI et al., 2007; SETTANNI, 2008).

88 A ação antagonista de espécies de BAL contra micro-organismos indesejáveis
89 em alimentos tem sido descrita em vários trabalhos, muitas BAL isoladas de leite e
90 queijos apresentaram poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes, como
91 *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas*
92 spp. e bactérias do grupo coliforme (VAUGHAN et al., 1994; BREASHERS, DURRE,
93 1999; URAZ et al., 2001; ALEXANDRE, 2002; CARIDI, 2003).

94 Devido à preocupação em preservar o queijo de Coalho artesanal e como um
95 produto que representa a cultura tradicional do Nordeste do Brasil visando melhorar
96 a qualidade tecnológica e sanitária deste produto, o presente trabalho teve como
97 objetivo testar a atividade antagonista produzida por *Enterococcus faecium* e *E.*
98 *faecalis* obtidos do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de
99 Cachoeirinha e Arcoverde, PE – Brasil.

100

101

102 **2. Metodologia**

103 ***Coleta e preparo das amostras***

104 Os *Enterococcus* foram isolados de cinco amostras de queijos de Coalho
105 artesanais produzidos nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde, Região Agreste
106 de Pernambuco. As amostras de queijo foram coletadas de maneira estéril,

107 conservadas a 10°C e remetidas ao laboratório, onde ficaram armazenadas a 20°C
108 para posterior análise.

109

110 ***Isolamento e purificação das Bactéria Ácido Lácticas***

111 Para o isolamento e purificação das BAL as amostras de queijos foram
112 homogeneizadas com solução de citrato de sódio 2% (m/v) pré aquecida a 45°C, em
113 um homogenizador tipo Stomacher (Seward, 400) e inoculadas em Leite Desnatado
114 Reconstituído (LDR) 12% (m/v), nas temperaturas 30 e 42°C, por 24h.
115 Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas decimais das amostras em
116 solução peptonada a 0,1% (m/v), onde a diluição de 10⁻⁵ foi plaqueada “*sur-plate*” no
117 meio All Purpose Medium With Tween - APT ágar (Himedia) e “*pour-plate*” no meio
118 Man, Rogosa e Sharpe - MRS ágar (Himedia), ambas incubadas nas temperaturas
119 de 30 e 42°C, por 48h (HALL et al., 2001).

120

121 ***Identificação das Bactérias Ácido Lácticas***

122 As bactérias isoladas foram submetidas aos testes fenotípicos e bioquímicos:
123 coloração de Gram (QEEL KIT – Química Especializada Erich, LTDA), morfologia
124 celular, atividade da catalase e produção de ácido em meio leite tornassolado -
125 *Litmus Milk* – LM (Himedia), sendo consideradas BAL apenas as Gram-positivas,
126 catalase negativa, na forma de cocos ou bacilos e produtoras de ácido em LM em
127 até sete dias (HALL et al., 2001).

128 A identificação do gênero *Enterococcus* foi baseado nos testes de avaliação
129 do crescimento nas temperaturas 10 e 45°C, pH 4,4, e 9,6; teor de NaCl 6,5% e
130 produção de CO₂ a partir da glucose (HARRIGAN, 1998). A identificação das
131 espécies foi realizada através de testes com sorbitol e citrato (SCHLEIFER &
132 KILPPER-BALZ, 1984).

133

134

135 **Identificação de *Enterococcus* Produtores de Atividade Antagonista**

136 Para identificar os *Enterococcus* produtores de atividade antagonista foi
137 utilizado o método proposto Tagg et al. (1976) e Guedes Neto (2004). Onde os
138 *Enterococcus* isolados foram utilizados como culturas produtoras, ou seja, aquelas a
139 serem testadas quanto à capacidade antagonista frente a outros micro-organismos,
140 denominados de culturas indicadoras *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria*
141 *innocua* (ATCC33090), e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

142 Os *Enterococcus* cultivados em ágar APT a 37°C por 24 horas. Após esse
143 período, as placas foram abertas em capela, colocando-se 1mL de clorofórmio,
144 deixando-o agir por 30 minutos, eliminando micro-organismos e permanecendo
145 apenas substâncias inibidoras. Em seguida, foi vertida uma segunda camada de
146 Agar TSB semi-sólido contendo a bactéria indicadora na concentração de 10⁸
147 UFC/mL. (Escala de Mac farlland), previamente crescida em caldo TSB, a 37°C,
148 durante 24 horas. A placa foi novamente incubada a 37°C por 24 horas, após esse
149 período foi observada a formação de halos de inibição. Halos bem definidos foram
150 classificados como inibição total, halos difusos foram classificados como inibição
151 parcial (NERO, 2005).

152

153

154 **3. Resultados e discussão**

155 A partir das cinco amostras de queijo de Coalho artesanal, foram isoladas,
156 purificadas e submetidas a identificação, por análises de características fisiológicas.
157 Foram isoladas 609 Bactérias Ácido Láticas. Destas, 309 (54,9%) do gênero
158 *Enterococcus*, 205 (66,3%) *E. faecalis*, 104 (33,6%) *E. faecium*.

159 O teste de atividade antagonista realizado com 309 *Enterococcus* frente ao *S.*
160 *aureus* (ATCC 6538), *L. innocua* (ATCC33090) e *E. coli* (ATCC 25922) identificou
161 que 247 (79,9%) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das
162 bactérias indicadoras testadas, *E. faecalis* com 83,4% e *E. faecium* 73,0%.

163 Todos os *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* que apresentaram atividade
 164 frente a bactéria indicadora Gram-negativa, *E.coli*, apresentaram atividade frente as
 165 bactérias indicadoras Gram-Positivas, *L. innocua* e *S. aureus*.

166 Das bactérias indicadoras testadas, a *L. innocua* foi a mais sensível sendo
 167 inibida por 247 (79,93%) dos *Enterococcus*, todos com inibição total. A atividade
 168 antagonista frente o *S. aureus* esteve presente em 178 (57,60%) dos *Enterococcus*,
 169 com inibição total apenas em 84 (65,12%) dos *E. faecalis* e em 31 (63,26%) dos *E.*
 170 *faecium*. A bactéria indicadora *E. coli* foi inibida por 84 *Enterococcus*, 27,18%, com
 171 inibição total em 21 (32,31%) dos *E. faecalis* e 6 (31,58%) dos *E. faecium* (Tabela 1).

172

173 **Tabela 1.** Frequência de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados do queijo de
 174 Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, com atividade antagonista total*,
 175 parcial** e não antagonistas a *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia*
 176 *coli*.

	Atividade antagonista em relação a					
	<i>L. innocua</i>		<i>S. aures</i>		<i>E. coli</i>	
	n	%	n	%	n	%
Culturas Não antagonistas <i>E. faecalis</i>	34	16,59	76	37,07	140	68,29
Culturas antagonistas <i>E. faecalis</i>	171	83,41	129	62,93	65	31,71
<i>Inibição total*</i>	171	100	84	65,12	21	32,31
<i>Inibição parcial**</i>	0	0	45	34,88	44	67,7
Culturas Não antagonistas <i>E. faecium</i>	28	26,93	55	52,89	85	81,73
Culturas antagonistas <i>E. faecium</i>	76	73,07	49	47,11	19	18,27
<i>Inibição total*</i>	66	86,84	31	63,26	6	31,58
<i>Inibição parcial**</i>	10	13,16	18	36,74	13	68,42

177 * Presença de halo de inibição bem definido; ** Presença de halo de inibição difuso

178

Resultado semelhante ao descrito por Huang et al., (2013) que descreveu que 69,95% dos *E. faecalis*, *E. faecium* e *E.mundtii*, isolados do queijo fresco Cottage produzido na Grã-Bretanha, apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos

um das bactérias indicadoras *L.monocytogenes*, *L.innocua* e *S. aureuus*. Ainda nos estudos realizados por Huang et al., (2013) foi possível observar o maior potencial de atividade antagonista obtido pela *E. faecalis* quando comparado com o desempenho apresentado por *E. faecium* e *E.mundtii*.

179 A atividade contra *S. aureus* concomitantemente a *Listeria*, pode ser
180 justificada por ambas pertencerem a classificação Gram-positiva, já relatada como o
181 principal tipo de atuação da atividade antagonistas.

182 Em estudos realizados com enterococos isolados de outros queijo citam a
183 atividade em relação a *L innocua*. (LEROY, 2003; GÁLVEZ et al., 2007; GÁLVEZ et
184 al., 2008. GHRAIRI, 2008), porém com resultados de menor potencial em relação
185 aos achados encontrados neste trabalho, com apenas 25,5%, sendo que 3,1%
186 inibição total e 22,2% classificadas como inibição parcial

187 Apesar de a menor inibição ser apresentada contra o *E. coli*, ainda sim
188 apresenta-se como um resultado promissor uma vez que vários autores citam as
189 bacteriocinas contra micro-organismos Gram-positivos (DE VUYST et al., 2002; DE
190 VUYST et al., 2004; COGAN et al., 2007; CASTRO, 2011).

191 Pingitore et al. (2012) descreve de 408 *E. faecalis* e 280 *E. faecium*
192 provenientes do queijo Minas Frescal, apenas 3% e 1,7%, respectivamente,
193 apresentaram atividade antagonista frente a *E.coli*.

194

195 **4. Conclusões**

196 O teste de atividade antagonista realizado demonstrou que 79,9% dos
197 *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* isolados de queijo de Coalho dos municípios de
198 Cachoeirinha e Arcoverde apresentaram atividade antagonista contra pelo menos
199 uma das bactérias indicadoras testadas. Das três espécies indicadoras testadas, *L.*
200 *innocua* foi a mais sensível (79,93%), seguida por *S. aureus* (57,60%) e *E. coli*
201 (27,18%). Apesar de a menor inibição ser apresentada contra o *E. coli*, ainda sim
202 apresenta-se como um resultado promissor uma vez que vários autores citam as
203 bacteriocinas contra micro-organismos Gram-positivos.

204 Os *Enterococcus* isolados apresentaram atividade antagonista e estão
205 presentes naturalmente em grandes quantidades no queijo de Coalho artesanal da
206 Região Agreste de Pernambuco, e podem auxiliar na segurança microbiológica
207 deste produto.

208

209 **Agradecimentos**

210 À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -
211 FACEPE, pelo suporte financeiro. Processo n. IBPG-0687-5.07/09.

212

213 **Referências Bibliográficas**

214 ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. et al. Atividade antimicrobiana de
215 bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a
216 microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.424-428, 2002.

217 BRASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward
218 *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated
219 storage. **J. Food Protec.**, v.62, p.1336-1340, 1999.

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

224 COTTER, P.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for
225 food. *Nature: Reviews microbiology*, London, v.3, p777-778, 2005.

226 FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A.E.R.; MACIEL, J.F. Avaliação microbiológica e
227 físico-química de leite cru e queijo de Coalho produzidos no Estado da Paraíba.
228 Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42,
229 2013.

- 230 FRANZ, C. M. A. P.; GRUBE, A.; HERRMANN, A.; ABRIOUEL, H.; STÄRKE, J.;
231 LOMBARDI, A.; TAUSCHER, B.; HOLZAPFEL, W.H. Biochemical and Genetic
232 Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by
233 *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309 **Applied and environmental microbiology**, May
234 2002, p. 2550–2554 Vol. 68, No. 5 0099-2240/02/\$04.000 DOI:
235 10.1128/AEM.68.5.2550–2554.2002.
- 236 FRANZ, C.M.; VAN BELKUM, M.J.; HOLZAPFEL, W.H.; ABRIOUEL, H.; GALVEZ, A.
237 (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new
238 classification scheme. **FEMS Microbiol Rev** 31:293–310.
- 239 GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of**
240 **Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003. Review.
- 241 GUEDES NETO, L.G., SOUZA, M.R., NUNES, A.C., NICOLII, J.R., SANTOS,
242 W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de
243 Coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. **Arq. Bras.**
244 **Med. Vet. Zootec.**, v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.
- 245 HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains
246 isolated from white cheese. **International Journal of dairy technology**, Oxford, v.60,
247 n.2, p. 105-108, 2007.
- 248 HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing Microorganisms. In:
249 DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological**
250 **Examination of Foods**. 4^a ed. Washington: American Public Health Association,
251 2001. Cap.19, p.201-207.
- 252 HUGAS, M. .; GARRIGA, M M.; AYMERICH, M.T. Functionality of enterococci in meat
253 products. Review Meat Technology Center (IRTA), Granja Camps i Armet s/n, ES-
254 17121 Monells, Spain Accepted 26 February 2003. **International Journal of Food**
255 **Microbiology** 88 (2003) 223– 233

- 256 JAMET, E.; AKARY,E.; POISSON, M.A.; CHAMBA, J.F.; BERTRAND, X.; SERROR,
257 P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in
258 French cheeses. **Food Microbiology** 31 (2012) 191e198.
- 259 MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.;
260 OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium spp.* A review.
261 **Biotechnology Advances** 31 482–488, 2013.
- 262 NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid
263 bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 38, p.13-126, 1999.
- 264 NERO, L.A. *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus e Escherichia coli* Em
265 leite cru, em quatro regiregiões leiteiras do Brasil: a ocorrência e fatores que
266 interferem na sua detecção. 2005 Tese (Doutorado em Ciência dos alimentos)
267 Universidade Estadual de Campinas – São Paulo.
- 268 SABIA, C. et al. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by
269 *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. **Int J Food**
270 **Microbiol**, Amsterdam, v.75, p.163-170, 2002.
- 271 SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO,C.; GEORGALAKI,M.D. REA, M.C.;
272 LOMBARDI, A.; COGAN, T.M.; KALANTZOPOULOS,G.; TSAKALIDOU,E.
273 Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance.
274 **International Dairy Journal**, v.11, n.8, p.621-647, 2009.
- 275 SCHLEIFER* AND RENATE KILPPER-BALZ. Transfer of *Streptococcus faecalis* and
276 *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus*
277 *faecalis* and *Enterococcus faecium*. **International Union of Microbiological**
278 **Societies**. Vol. 34, No. 1. 1984.
- 279 SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZERRA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.;
280 PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L. Can artisanal “Coalho”
281 cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry** 135
282 (2012) 1533–1538.

- 283 SILVA, R.A.; BISMARA, P.A.; R.B. MOURA; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.;
284 CAVALCANTI, M.T.H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de Coalho
285 artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco . **Arq. Bras. Med.**
286 **Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012.b
- 287 TAGG, J.R.; DAJAMI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram-positive
288 bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v.40, p.722-756, 1976.
- 289 URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and
290 *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt
291 concentrations. **Int. J. Dairy Technol.**, v.54, p.146-150, 2001.
- 292 VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic
293 acid bacteria that produced antimicrobials. **J. Appl. Bacteriol.**, v.76, p.118-123, 1994.
- 294

1

2

3

4

5

6

7

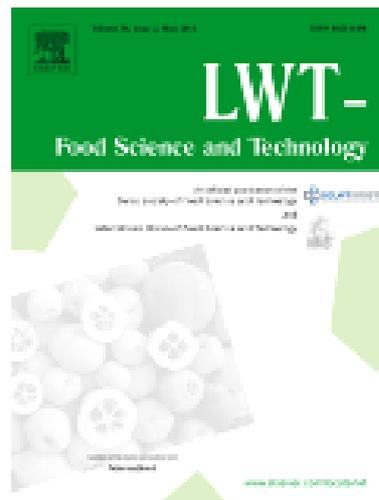
8

CAPÍTULO III

9

Produção e caracterização de enterocinas obtidas a partir do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde- PE, Brasil.

10



11

12

13

14

15

ISSN: 0023-6438

16 **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCINAS OBTIDAS A PARTIR DO**
17 **QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DE CACHOEIRINHA E ARCOVERDE – PE,**
18 **BRASIL**

19
20 Thiciane Carvalho Albuquerque⁽¹⁾, Meire dos Santos Falcão de Lima⁽²⁾, Maria Taciana Holanda
21 Cavalcanti⁽³⁾ e Ana Lúcia Figueiredo Porto⁽³⁾

22 ¹ Doutoranda do Programa Pós-graduação em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de
23 Pernambuco (UFRPE). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Rua Dom Manoel de
24 Medeiros s/n-Dois Irmãos-CEP 52171-900, Recife – PE

25 ² Mestranda do Programa Pós-graduação em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de
26 Pernambuco (UFRPE).

27 ³ Professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de
28 Pernambuco (UFRPE), Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO).

29
30
31 **Resumo**

32 Os *Enterococcus* produzem durante seu crescimento peptídeos com atividade
33 antimicrobiana chamados de enterocinas, cuja ação é a inibição do crescimento de
34 patógenos e de micro-organismos deterioradores de alimentos. Com o objetivo de
35 selecionar e caracterizar enterocinas produzidas por *Enterococcus faecium* e *E.*
36 *faecalis* isolados do queijo de Coalho artesanal fabricados em Cachoeirinha e
37 Arcoverde – PE, Brasil. Foram produzidas, quantificadas e caracterizadas
38 enterocinas com atividade antimicrobiana frente à *Listeria innocua*, *Staphylococcus*
39 *aureus* e *Escherichia coli*. As enterocinas foram avaliadas quanto a sua estabilidade
40 térmica (40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 e 121°C), temperatura de refrigeração (4°C) e
41 congelamento (-20°C), variação de pH (2-10) e ação de enzimas proteolíticas
42 (Proteinase K e Lisozima). Os resultados mostram que as enterocinas produzidas
43 por *E. faecium* e *E. faecalis* apresentaram atividades antimicrobianas frente à *L.*
44 *innocua*, *S. aureus* e *E. coli.*, sendo estáveis ao tratamento térmico, às temperaturas
45 de refrigeração e ao congelamento, variação de pH, sendo hidrolisadas na presença

46 de enzimas proteolíticas. Sendo assim, as enterocinas aqui descritas se apresentam
47 como um promissor conservante biológico, para melhoria da qualidade
48 microbiológica e a segurança de alimentos.

49

50 **Palavras chave:** Queijo de Coalho artesanal, *Enterococcus*, Enterocina.

51

52

53 **Abstract**

54 The *Enterococcus* produce during their growth peptides with antimicrobial activity
55 called enterocins , whose action is the inhibition of growth in pathogens and spoilage
56 micro -organisms in foods. In order to select and characterize enterocins produced
57 by *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* isolated from cheese curd handmade and
58 manufactured in Cachoeirinha Arcoverde - PE, Brazil. Quantified and characterized
59 enterocins with antimicrobial activity toward *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*
60 and *Escherichia coli* were produced. The enterocins were evaluated for thermal
61 stability (40 , 50, 60, 70, 80, 90, 100 and 121°C) , refrigeration temperature (4°C)
62 and freezing (-20°C), pH range (2-10) and action of proteolytic enzymes (Proteinase
63 K and Lysozyme). The results show that enterocins produced by *E. faecalis* and *E.*
64 *faecium* are show antimicrobial activity against the *L. innocua*, *S. aureus* and *E. coli* ,
65 being stable to heat , refrigeration and freezing temperatures, varying pH treatment ,
66 being hydrolysed in the presence of proteolytic enzymes. Thus, the enterocins
67 described here are presented as a promising biological preservative to improve the
68 microbiological quality and safety of food.

69

70 **Keywords:** Artesanal "Coalho Cheese, *Enterococcus*, enterocin.

71

72

73 1. Introdução

74 As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram-
75 positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que crescem sob
76 condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas (KLEIN et al., 1998).

77 O papel das BAL na fermentação de alimentos é duplo, pois elas produzem
78 ácidos que modificam as propriedades organolépticas do produto, além de peptídeos
79 com atividade antimicrobiana, chamadas de bacteriocinas (MADERA et al., 2003;
80 MARTINEZ et al., 2013).

81 A utilização de bacteriocinas de origem láctea na indústria de alimentos tem
82 sido amplamente relatada nos últimos anos, este fato se deve principalmente pela
83 ocorrência natural de BAL em muitos alimentos, incluindo leite e produtos lácteos,
84 ovos, vegetais e produtos de carne (ZACHAROF, LOVITT, 2012).

85 A nisina é a única bacteriocina aprovada para uso comercial, sendo aprovada
86 para uso como um alimento conservante em aproximadamente 50 países (GUINANE
87 et al., 2005). O desenvolvimento bem sucedido da nisina é um modelo que tem
88 estimulado a pesquisa por novas bacteriocinas nos últimos anos. No entanto, se faz
89 necessário a primeiro entender a biologia de novas bacteriocinas, elucidando suas
90 relações estrutura-função, produção, imunidade, regulação e modo de ação
91 (COTTER, 2005).

92 As bacteriocinas produzidas por enterococos são chamadas de enterocinas,
93 que apresenta atividade antimicrobiana frente estirpes estreitamente relacionadas
94 com o micro-organismo produtor (POETA, 2008). Segundo (PAPAGIANNI, 2003) as
95 enterocinas têm uma grande estabilidade a ao tratamento térmico e a variação de
96 pH, possuindo um espectro de atividade antimicrobiana variável.

97 Franz et al. (2008) afirmaram que enterocinas, à semelhança dos
98 enterococos, são notáveis por sua diversidade e por sua distribuição onipresente
99 entre os isolados de diferentes fontes, aumentando a possibilidade de encontrar um
100 determinado tipo de bacteriocina adequadas para cada produto alimentar.

101 Como uma alternativa a nisina, enterocinas têm sido estudadas para a
102 potencial de aplicação como aditivo alimentar para o controle de micro-organismos
103 indesejáveis (NASCIMENTO, 2008). Deste modo, objetivou-se produzir e
104 caracterizar enterocinas de *Enterococcus faecium* e *E. faecalis* isolados do queijo de
105 Coalho artesanal produzidos em Cachoeirinha e Arcoverde – PE, Brasil.

106

107

108 **2. Metodologia**

109

110 ***Amostras de Enterococcus***

111 Foram utilizados neste trabalho 247 *Enterococcus*, sendo 171 *E. faecalis* e 76
112 *E. faecium* previamente isolados e identificados de amostras de Queijos de Coalho
113 Artesanais produzidos nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde-PE, Brasil.

114

115 ***Produção de enterocinas***

116 As amostras de *Enterococcus* foram crescidas em caldo *All Purpose Medium*
117 *With Tween* (APT) a 37°C por 24 horas. Posteriormente as amostras foram
118 centrifugadas a 10.000rpm durante 5 minutos a 4°C o obtido o sobrenadante livre de
119 células (SLC), o processo de centrifugação foi repetido por mais duas vezes de
120 modo a garantir que o sobrenadante estivesse livre de células (MARTINS et al.,
121 2002).

122 O SLC teve o pH ajustado em 6,5 com solução NaOH 1M, para eliminar
123 possível efeito antimicrobiano provocado pelo ácido láctico, também foi tratado em
124 banho maria a 95°C por 10 minutos e esterilizado por filtração em membrana de
125 ésteres mistos (0,22µm, Syringe Filter), para retirar possível efeito de enzimas
126 proteolíticas e do peróxido de hidrogênio (GHALFI et al., 2006; LAUCOVA, 2011).

127

128 **Determinação da atividade antimicrobiana**

129 A atividade antimicrobiana dos SLC foi realizado frente às bactérias
130 *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria innocua* (ATCC 33090), e *Escherichia*
131 *coli* (ATCC 25922), previamente crescidas em caldo TSB, à 37°C por 24 h. Para isso
132 foi realizado em uma placa de microtitulação de 96 poços (Nunc), onde cada poço
133 recebeu o meio de cultura líquido caldo TSB, o inóculo da estirpe padrão contendo
134 $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (escala de Mac farlland) e amostra do SLC para um volume final de
135 100µl (NCCLS, 2003). A placa de microtitulação foi incubada a 37°C por 24 horas.

136 Após este período, 30µl de solução resazurina (Resazurina ensaio de
137 viabilidade celular Kit, Biotium Inc.) foi adicionado a cada poço, incubando a placa
138 por mais 30 minutos. A coloração cor-de-rosa ou a falta de cor (incolor) indica o
139 crescimento de bactérias, enquanto que a cor roxa ou azul indica a inibição do
140 crescimento da bactéria indicadora pela presença de atividade antimicrobiana
141 (PALOMINO et al., 2002).

142 Em seguida, o conteúdo dos poços foi incubado ágar Trypticase Soy Broth
143 (TSB) à 37°C, possibilitando avaliar o caráter bactericida ou bacteriostático da SLC
144 através da observação da presença ou ausência de crescimento das placas após 24
145 horas.

146

147 **Determinação da atividade antimicrobiana cruzada**

148 Os SLC produzidos tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada frente aos
149 *Enterococcus* isolados, avaliados utilizando a mesma metodologia descrita no item
150 anterior de determinação da atividade antimicrobiana das enterocinas (PALOMINO
151 et al., 2002).

152

153 **Quantificação da atividade antimicrobiana da enterocina**

154 Apenas dos SLC que apresentaram atividade antimicrobiana contra as três
155 bactérias indicadoras testadas foram submetidas ao teste de quantificação da

156 atividade antimicrobiana. Para isso, os SLC foram diluídos sucessivamente na
157 proporção 1:1 com solução-tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, de acordo com o
158 método de diluição crítica de Mayr-Harting et al (1972) para as seguintes diluições: 1
159 (sem diluição), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.

160 As diluições foram avaliadas em duplicata pelo método de difusão em poços
161 contra as bactérias indicadoras: *L. innocua* ATCC33090, *S. aureus* ATCC 6538 e *E.*
162 *coli* ATCC 25922, preparados de acordo com a escala de McFarland para
163 10^8 UFC/mL, previamente crescidas em caldo TSB, à 37°C por 24 h. As placas foram
164 incubadas em duplicatas a 37°C por 24 horas. Posteriormente os halos de inibição
165 formados foram medidos em milímetros com o auxílio de um paquímetro. A
166 quantificação da atividade dos SLC foi expressa em unidade arbitrária por mililitro
167 (UA/mL), definida pela medida do maior halo de inibição multiplicado pela constante
168 100 (KAWAMOTO et al., 2002).

169

170 **Caracterização das enterocinas**

171 As enterocinas foram caracterizadas em relação à estabilidade quanto ao pH,
172 temperatura e a susceptibilidade diante da ação de enzimas proteolíticas. O método
173 utilizado foi descrito por Todorov e Dicks (2007). Cada amostra de enterocina teve
174 sua atividade antimicrobiana determinada em UA/mL (Unidades arbitrárias por mL)
175 previamente ao tratamento a ser testado. A atividade residual (%) foi determinada
176 através da técnica de difusão em poços, em triplicata, contra as bactérias
177 indicadoras: *L. innocua* ATCC33090, *S. aureus* ATCC 6538, e *E. coli* ATCC 25922,
178 preparados de acordo com a escala de McFarland para 10^8 UFC/mL, previamente
179 crescidas em caldo TSB, à 37C por 24 h. As placas foram incubadas em estufas a
180 37°C por 24 horas, posteriormente os halos de inibição formados foram medidos em
181 milímetros com o auxílio de um paquímetro, onde a seguinte formula foi utilizada
182 para calcular a atividade residual: $A.R.(%) = \frac{HT - 9}{HC - 9} \times 100$.

183 HT= halo após tratamento (mm), HC=halo controle (mm), AR=atividade residual (%), 9 = constante
184 (tamanho do poço).

185 Para observar a estabilidade ao tratamento térmico as amostras foram
186 submetidas às temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C por 30 minutos e a
187 121°C por 10 e 20 minutos.

188 As alíquotas das enterocinas foram estocadas por dois meses sob
189 congelamento (-20°C) e sob refrigeração (4°C), a cada 15 dias foi determinada a
190 atividade antimicrobiana residual das amostras.

191 Para a estabilidade das enterocinas frente à variação de pH, as amostras de
192 enterocinas tiveram seus pH em 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, sendo o ajuste feito com
193 solução de NaOH 1M e HCl estéreis e tampão Tris.

194 Para o teste de estabilidade frente ação de enzimas proteolíticas, as amostras
195 de enterocinas foram submetidas ao efeito das enzimas: Proteinase K e Lisozima
196 nas concentrações finais de 0,1mg/mL e 1mg/mL, com incubação durante 2 horas.
197 Após esse período as enterocinas foram submetidas a 80°C por 10 minutos para
198 inativação das proteases.

199

200 **Avaliação das propriedades tecnológicas**

201 Para a avaliação da capacidade tecnológica foi avaliada a capacidade
202 acidificante dos *Enterococcus maiores* produtores de enterocinas, sendo um *E.*
203 *faecalis* e um *E. faecium*. As culturas foram preparadas através do crescimento por
204 18 horas em meio caldo APT, em seguida foram centrifugadas, lavadas com água
205 peptonada e inoculada (1% v/v) em Leite Desnatado Reconstituído (LDR), sendo
206 incubadas a 37°C. As medidas do pH foram realizadas após 6, 12 e 24 horas após a
207 inoculação (FRANCIOSI et al.; 2009).

208 Para a avaliação de capacidade tecnológica de atividade proteolítica
209 extracelular qualitativa, as suspensões bacterianas preparadas conforme descrito
210 para atividade acidificante, foram repicadas na superfície de placas contendo meio
211 sólido composto por 10 % (p/v) de leite desnatado e 2 % de ágar sendo incubadas a
212 37°C. A atividade proteolítica qualitativa foi indicada pela presença de uma zona
213 clara ao redor das colônias (JONES et al., 2007)

214 RESULTADOS E DISCUSSÃO

215

216 ***Produção e Seleção de Enterococos***

217 Foram avaliados neste trabalho 247 sobrenadantes livre de células (SLC)
218 produzidos a partir dos *Enterococcus* isolados do queijo de Coalho artesanal, sendo
219 171 de *E. faecalis* e 76 de *E. faecium*.

220 Na determinação da atividade antimicrobiana dos SLC, *L. innocua* foi a
221 bactéria indicadora mais sensível, inibida por 75 (43,85%) dos SLC produzidas pelos
222 *E. faecalis* e 27 (35,53%) produzidos pelos *E. faecium*. Em seguida, a bactéria
223 indicadora *S. aureus* apresentou-se sensível a 43 (25,14%) e 15 (19,74%) dos SLC
224 produzidos por *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente. A bactéria indicadora com
225 menor sensibilidade foi *E.coli*, inibida por 28 (16,37%) dos SLC produzidos por
226 *Enterococcus faecalis* e 7 (9,21%) *E. faecium*.

227 Foi observada atividade antimicrobiana simultânea às três bactérias
228 indicadoras em 28 (16,37%) dos SLC produzidos por *E. faecalis* e 7 (9,21%) dos *E.*
229 *faecium*, propriedade utilizada como critério para a seleção do melhor produtor de
230 enterocina. (Tabela 1).

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240 **Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de sobrenadantes livre de células produzidos por
 241 *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, isolados do queijo de Coalho artesanal de
 242 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538),
 243 *Listeria innocua* (ATCC 33090), e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Sobrenadante livre de células		Atividade antimicrobiana		
		<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>				
28	(16,37%)	+	+	+
15	(8,77)	+	+	
32	(18,71%)	+		
Total = 75	(43,85%)			
96	(56,14%)	-	-	-
Total = 171	(100%)			
Sobrenadante livre de células		Atividade antimicrobiana		
		<i>Listeria innocua</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecium</i>				
7	(9,21%)	+	+	+
8	(10,53%)	+	+	
12	(15,79%)	+		
Total = 27	(35,53%)			
49	(64,47%)	-	-	-
N Total 76	(100%)			

244

245 Todos os SLC produzidos por *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* que
 246 apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactéria indicadora Gram-negativa,
 247 *E.coli*, apresentaram atividade frente as bactérias indicadoras Gram-Positivas, *L.*
 248 *innocua* e *S. aureus*.

249 À avaliação do efeito bactericida ou bacteriostático das atividades
 250 antimicrobianas produzidas pelos SLC produzidos por *Enterococcus faecalis* e *E.*
 251 *faecium* foi possível verificar a ausência de crescimento em 100% das amostras
 252 após 24 horas, demonstrando a ação bactericida das amostras.

253 **Determinação da atividade antimicrobiana cruzada**

254 Nos testes de determinação da atividade antimicrobiana cruzada dos SLC
255 frente a seus *Enterococcus* produtores. Neste teste nenhum SLC foi capaz de inibir
256 seu respectivo *Enterococcus* produtor, demonstrando que todos os isolados
257 apresentaram imunidade as suas respectivas enterocinas. Característica descrita
258 como desejável para micro-organismos com potencial bioconservador (HOLZAPFEL;
259 GEISEN; CHILLINGER, 2005).

260

261 **Quantificação da atividade antimicrobiana**

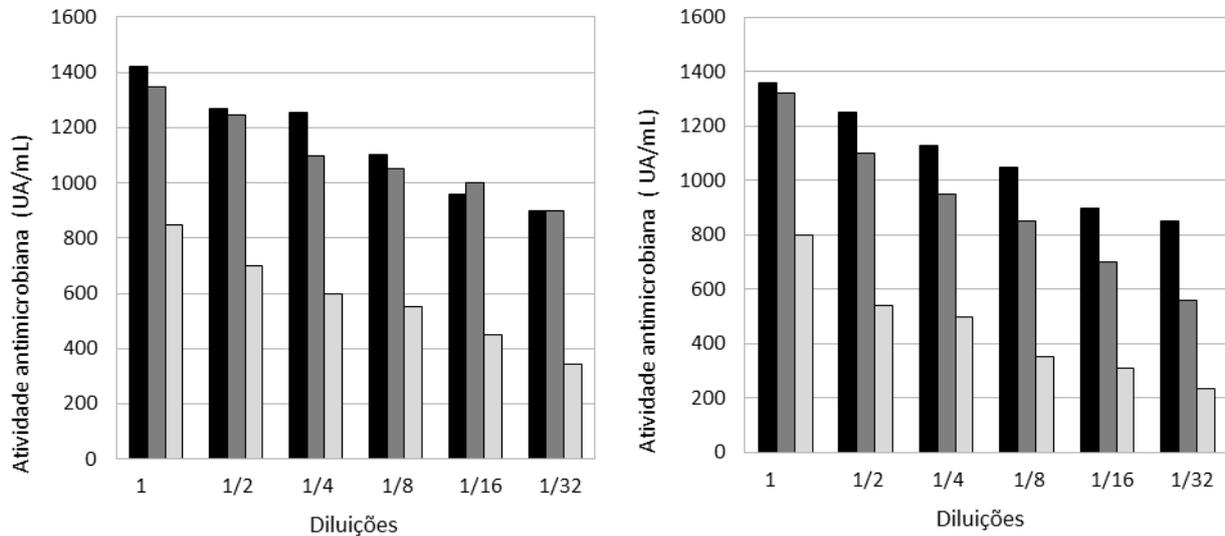
262 A quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada com os 35
263 enterococos que apresentaram atividade antimicrobiana contra as três bactérias
264 indicadoras simultaneamente, sendo 28 produzidos por *E.faecalis* e 7 por *E.*
265 *faecium*.

266 Na Figura 1A apresenta os resultados obtidos na atividade antimicrobiana das
267 enterocinas produzidas por *E. faecalis* com as maior atividade antimicrobiana de
268 1450 UA/mL, 1350 UA/mL, e 820 UA/mL, frente a *L. innocua*, *S. aureus* e *E. coli*,
269 respectivamente. Enquanto que a menor atividade antimicrobiana com 850UA/mL
270 frente a *L. innocua* e *S. aureus* e 270 UA/mL frente a *E. coli*.

271 Na Figura 1B apresenta os resultados obtidos na atividade antimicrobiana das
272 enterocinas produzidos por *E. faecium* com as maiores atividade antimicrobiana de
273 1380 UA/mL, 1350 UA/mL, e 800 UA/mL, frente a *L. innocua*, *S. aureus* e *E. coli*,
274 respectivamente. Enquanto que a menor atividade antimicrobiana com 820UA/mL
275 frente a *L. innocua*, 480UA/mL *S. aureus* e 215 UA/mL frente a *E. coli*.

276

277

278 **A****B**

279 **Figura 1.** Quantificação* da atividade antimicrobiana (UA/mL)** das enterocinas
 280 produzidas por *E. faecalis* (A) e *E. faecium* (B), isolados do queijo de Coalho
 281 artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■),
 282 *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□)

283 *As enterocinas foram diluídas sucessivamente na proporção 1:1 com solução-tampão fosfato de
 284 sódio 10mM pH 7,0, de acordo com o método de diluição crítica de Mayr-Harting et al (1972) para as
 285 seguintes concentrações: 1 (solução original), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32.

286 ** UA/mL - Unidade arbitrária por mililitro

287

288 Segundo Ennahar et al., (2011) as enterocinas caracterizam-se pela sua forte
 289 atividade anti-listéria. Lauková et al. (2008), descreveram de 1100UA/mL de
 290 atividade antimicrobiana para o SLC produzidos por *E. faecalis* isolados de
 291 descreveram atividade antimicrobiana, o qual apresentou contra *L. innocua*.

292 O micro-organismo indicador que apresentou menor percentual de inibição
 293 pelas enterocinas avaliadas neste trabalho foi a bactéria com 270 UA/mL e 215
 294 UA/mL para *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente. Porém os resultados podem
 295 ser descritos como promissores uma vez que, poucas bacteriocinas caracterizadas

296 até o momento apresentaram atividade contra bactérias Gram-negativas
297 (CLADERA-OLIVERA et al., 2004; JENNES, 2010).

298 Os valores observados na quantificação da atividade antimicrobiana obtidos
299 neste trabalho mostraram valores superiores ao descrito na literatura por Sabia et
300 al., (2009), que caracterizaram duas enterocinas produzidas por *E. casssellflavus* e
301 *E. faecalis* isolados de salame italiano fermentado, onde as atividades
302 antimicrobianas foram de 450 e 620 UA/mL, respectivamete.

303

304 **Caracterização das enterocinas**

305 Para os testes de caracterização das enterocinas foram utilizados duas
306 amostras que apresentaram maiores valores de atividade antimicrobiana para todas
307 as bactérias indicadoras, sendo uma produzida por *E. faecalis* e outra *E. faecium*.

308

309 Estabilidade ao tratamento térmico

310 Na avaliação da estabilidade ao tratamento térmico, as enterocinas
311 permaneceram com no mínimo 70% de suas atividades antimicrobianas iniciais até a
312 temperatura de 100°C. Os menores valores de atividade antimicrobiana foram
313 verificados quando as enterocinas foram submetidas a 121°C por 20 minutos, com
314 atividade antimicrobiana residual média em torno de 20%. não houve inativação por
315 nenhuma amostra testada para as enterocinas produzidas por *E. faecalis* e *E.*
316 *faecium*. As enterocinas produzidas pelos *E. faecium* e *E. faecalis* estudados neste
317 trabalho podem ser consideradas resistentes ao aquecimento (Figura 2).

318

319

320

321

322

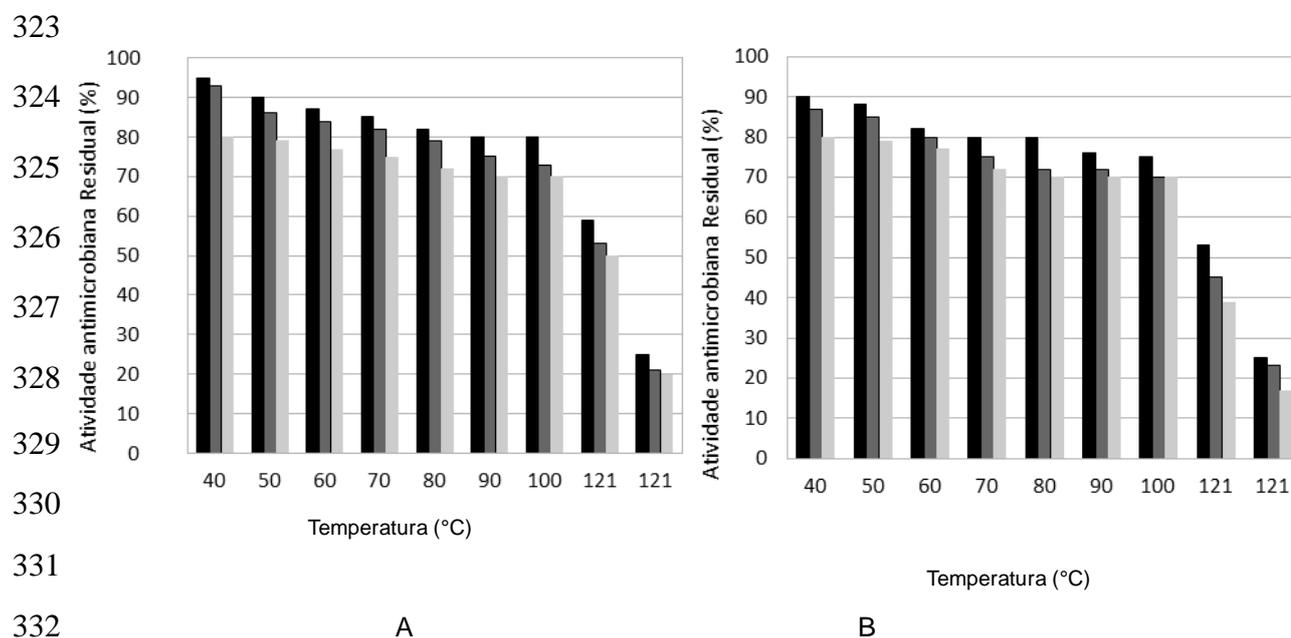


Figura 2. Atividade antimicrobiana residual (%) após tratamento térmico* de enterocinas produzidas por *Enterococcus faecalis* (A) e *E. Faecium* (B) isolados do queijo de Coalho de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□).

* As amostras foram submetidas às temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C por 30 minutos e a 121 por 10 e 20 minutos.

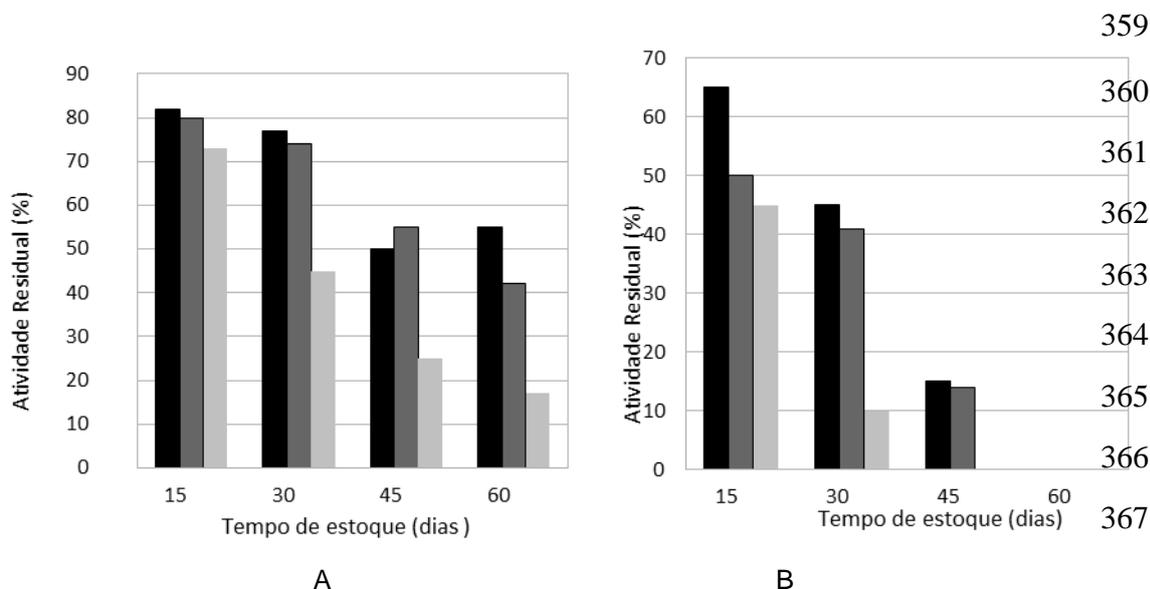
Todorov (2006), Moreno et al. (2002) citam que a estabilidade da bacteriocina ao aquecimento é uma característica desejável, e muito importante para aplicação destas em alimentos.

Kawamoto et al., 2012 demonstram que a bacteriocina mundicitina (enterocina produzida pela *E. mundtii*) manteve 50% de sua atividade quando exposta a 100°C por 20 minutos. Enquanto que JENNES et al., 2010), avaliando a estabilidade da enterocina O12, obteve em seus resultados que a mesma apresentou 75% de sua atividade após 10 minutos a 121°C, mas a 80°C por 30 minutos perdeu 50% de sua atividade, concluindo que, além da temperatura em que são expostas, o tempo de exposição é determinante na manutenção da atividade antimicrobiana.

350 Estabilidade a refrigeração

351 Nas enterocinas armazenadas sob refrigeração foram observadas os
 352 menores valores de atividade antimicrobiana, onde a enterocina produzida pelo *E.*
 353 *faecium* (Figura 3B) perdeu totalmente a sua atividade antimicrobiana após 60 dias
 354 de estocagem, para as três bactérias indicadoras testadas. a enterocina produzida
 355 pelo *E. faecalis* (Figura 3A) foi mais estável, onde os menores valores de atividade
 356 antimicrobiana foram obtidos entre 45 e 60 dias de estocagem, principalmente
 357 menor frente a *e.coli*.

358



368

369 **Figura 3.** Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por
 370 *Enterococcus faecalis* (A) e *E. Faecium* (B) isolados do queijo de Coalho de
 371 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, estocadas por dois meses sob refrigeração*(4°C),
 372 frente a *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC
 373 25922 (□).

374 *Atividades antimicrobiana residual determinada em intervalos de 15 dias.

375

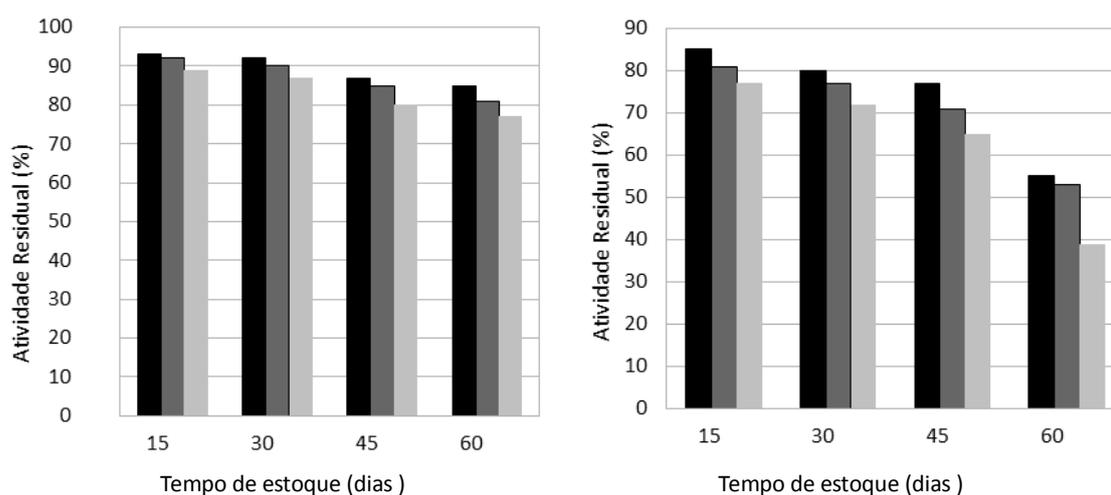
376

377 Estabilidade ao congelamento

378 Na estocagem a -20°C , nenhuma enterocina perdeu a atividade
 379 antimicrobiana com 60 dias de estocagem. A enterocina *E. faecalis* (Figura 4A)
 380 manteve mais de 80% de sua atividade após 60 dias de congelamento, para todas
 381 as 3 bactérias indicadoras testadas.

382 A enterocina produzida pelo *E. faecium* (Figura 4B) apresentou-se mais
 383 instável apresentando menores valores de atividade residuais entre 40 e 50% após
 384 60 dias de estocagem.

385



386

A

B

388 **Figura 4.** Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por
 389 *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados do queijo de Coalho artesanal de
 390 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, em estoque congelado (-20°C) frente as bactérias
 391 indicadoras *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538
 392 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□).

393 *Atividades antimicrobiana residual determinada em intervalos de 15 dias.

394

395 A manutenção da atividade antimicrobiana residual após o período de
396 estocagem de dois meses à -20°C observada nas enterocinas de *E. faecium* e
397 *E. faecalis* deste trabalho, é uma característica muito importante para a sua aplicação
398 em alimentos (GHANBARI et al.; 2013)

399 Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram descritos para
400 enterocinas produzidas por *E. casseliflavus* e *E. faecalis*, isoladas de salsichas
401 italianas, que mantiveram sua estabilidade em 70 % após 2 meses de estocagem a -
402 20°C (Sabia et al.; 2004) e em outros casos com 67% pela enterocina, produzida
403 por *E. faecium* (Cintas et al, 2007) e com 60% enterocina, produzida por *E. faecium*
404 EK13 (MAREKOVÁ et, al, 2007).

405

406 Estabilidade a variação de pH

407 Nenhuma das enterocinas produzidas pelos *E. faecium* e *E. faecalis* testadas
408 apresentaram diminuição da atividade antimicrobiana em até 40% frente à variação
409 de pH.

410 Os menores valores de atividades antimicrobianas foram observados para nos
411 valores pH mais alcalinos (8, 9 e 10). Aproximadamente 80 % da atividade
412 antimicrobiana foi mantida entre os pH 5 a 7, e os melhores resultados foram
413 observadas na faixa ácida de pH (2 a 4) (Figura 5 A e B).

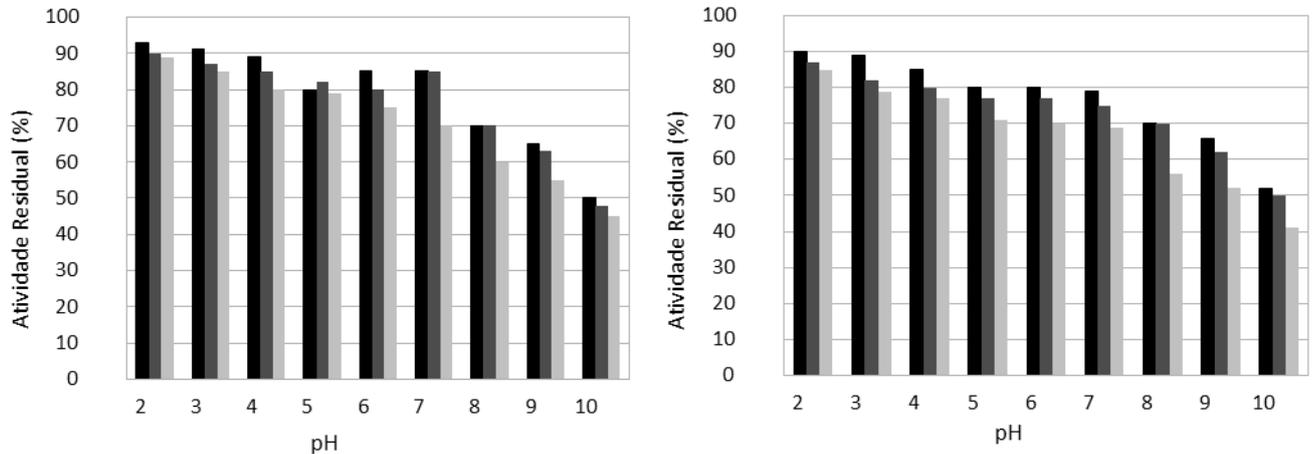
414

415 .

416

417

418



419

420

A

B

421 **Figura 5.** Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por
 422 *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados do queijo de Coalho artesanal de
 423 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, em variados pH, frente as bactérias indicadoras *L.*
 424 *innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus* ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□)

425 * As amostras de enterocinas tiveram seus pH ajustados entre 2 e 10, com acréscimo de uma
 426 unidade entre eles, sendo o ajuste feito com solução de NaOH 1M e HCL estéreis e tampão Tris.

427

428 A manutenção da atividade antimicrobiana das enterocinas em amplas faixas
 429 de pH é descrita como uma característica desejável; permitindo sua utilização em
 430 alimentos de pH ácido, como é o caso do queijo de Coalho e em alimentos
 431 fermentados em geral, que possuem o pH baixo devido ao crescimento natural das
 432 BAL (FRANZ et al., 2006).

433

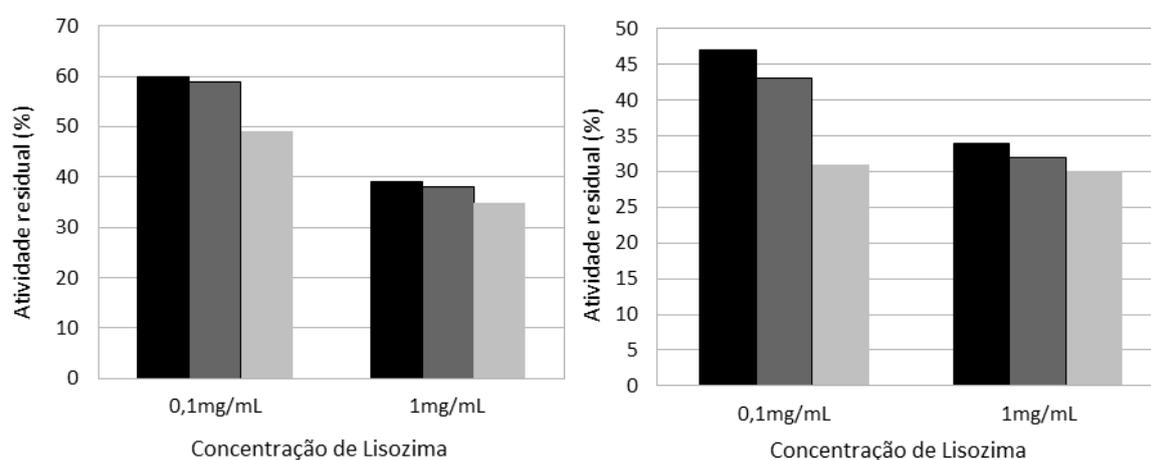
434 Estabilidade a ação de enzimas proteolíticas

435

436 O resultado da estabilidade da atividade antimicrobiana das enterocinas frente
 a ação de enzimas proteolíticas, demonstrou que a proteinase k, nas concentrações

437 de 0,1 e 1 mg/mL, inativou as enterocinas produzidas pelos *E. faecalis* e *E. faecium*,
 438 frente todas as bactérias indicadoras testadas, *L. innocua* ATCC33090, *S. aureus*
 439 ATCC 6538 e *E. coli* ATCC 25922. Resultado esse que sugere a natureza proteica
 440 dessas enterocinas.

441 A lisozima não inativou as enterocinas produzidas por *E. faecalis* e *E.*
 442 *faecium*, contudo reduziu os seus valores de atividade antimicrobiana em até 70%
 443 quando utilizada na sua maior concentração (1mg/mL), frente ao micro-organismo
 444 indicador *E.coli*. (Figura 6).



445

446 A

447 B

448

448 **Figura 6.** Atividade antimicrobiana residual (%) de enterocinas produzida por
 449 *Enterococcus faecalis* (A) e *E. faecium* (B) isolados do queijo de Coalho artesanal de
 450 Cachoeirinha e Arcoverde – PE, submetidas a presença de Lisozima (à 0,1mg/ML e
 451 1mg/mL), frente as bactérias indicadoras *L. innocua* ATCC 33090 (■), *S. aureus*
 452 ATCC 6538 (■), e *E. coli* ATCC 25922 (□).

453

454 Rosa Franco (2002) citam que além da capacidade de inibição de micro-
 455 organismos indesejáveis e estabilidade ao aquecimento, a biodegradação das

456 enterocinas por enzimas digestivas é desejável, tornando-a mais segura para serem
457 utilizadas em alimentos.

458 Vários trabalhos relatam que as enterocinas apresentam susceptibilidade à
459 proteinase K, e são parcialmente inativadas por outras enzimas como pela
460 quimosina, tripsina e lisozima (FLORIANO et al., 2008; JENNES et al., 2010;
461 KAWAMODO et al., 2012; MORENO et al., 2002; PARK et al., 2003).

462

463 Avaliação das propriedades tecnológicas

464 O resultado da capacidade de acidificação observado pelos *Enterococcus*
465 produtores de enterocinas, demonstrou o pH do leite foi reduzido somente após 12
466 de incubação, de 6,5 para 5,3 pela enterocina produzida pelo *E. faecalis* e 5,2 pela
467 enterocina produzida pelo *E. faecium*. Após 24 horas foi promovida a coagulação do
468 leite, o pH alcançou valores de 4,6 e 4,5, para *E. faecalis* e *E. faecium*,
469 respectivamente.

470 Esses dados demonstram que os *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* testados
471 neste trabalho podem ser classificados como produtores lentos de ácido, uma vez
472 que segundo BERESFORD (2001), para uma cultura lática ser considerada
473 produtora rápida de ácido, ela deve reduzir o pH do leite do seu valor normal (6,6)
474 para 5,3 em 6h de incubação à temperatura adequada, esta característica pode ser
475 atribuída a uma BAL iniciadora.

476 Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com HUGAS (2003) e
477 JAMET (2012) que citam que as espécies do gênero *Enterococcus* pertencem a
478 microbiota lática secundária e apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o
479 pH do leite e que a influência tecnológica positiva dos enterococos no queijo é dá
480 pelo desenvolvimento de características sensoriais, através de reações bioquímicas
481 durante a cura: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos
482 aromáticos voláteis

483 Pesquisas realizadas por Durlu-Ozkaya et al., 2001 e Sarantinopoulos e et al.
484 (2009) mostraram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho onde os
485 *Enterococcus* promoveram a redução do pH do leite para 5,0–5,2, após 16–24h de
486 incubação a 37°C. Suzzi et al. (2000) observaram que o *E. faecalis*, isolados de
487 queijos artesanais italianos, reduziu o pH de leite desnatado a 4,5 após 24h de
488 fermentação.

489 Para a determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa, a
490 presença de uma zona clara ao redor das colônias nas placas indicou a atividade
491 proteolítica em todas as amostras de *E. faecium* e *E. faecalis*,

492 Segundo McSWEENEY (2004) a proteólise é uma característica tecnológica
493 desejável uma vez que é responsável pelo desenvolvimento de muitas
494 características organolépticas nos queijos, Um dos papéis mais importantes da
495 proteólise está na produção de compostos voláteis, que contribuem para o sabor e
496 aroma dos queijos.

497 Apesar do importante papel da atividade proteolítica, Carvalho (2007) ressalta
498 a importância da quantificação desta proteólise uma vez que o uso de
499 microrganismos com grande capacidade proteolítica provoca o amolecimento na
500 textura dos queijos, o que pode não ser muito desejado para o queijo de Coalho.

501 Assim os resultados obtidos para capacidade proteolítica mostram que as
502 culturas avaliadas podem ser utilizadas na elaboração de um fermento láctico para a
503 fabricação de queijo de Coalho.

504

505 **CONCLUSÕES**

506 Os *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isolados do Queijo de
507 Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE produziram enterocinas com
508 atividade antimicrobiana frente à *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e
509 *Escherichia coli*.

510 As enterocinas produzidas pelos *Enterococcus* isolados do queijo de Coalho
511 apresentaram características de estabilidade a temperatura e pH, sofrendo ação de
512 enzimas proteolíticas, representando um potencial promissor para uso como
513 conservantes biológicos, melhorando assim a qualidade microbiológica e a
514 segurança dos alimentos.

515 Os *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* produtores de enterocinas testados neste
516 trabalho apresentaram atividade proteolítica extracelular e foram classificados como
517 produtores lentos de ácido, promovendo a coagulação do leite após 24 horas.
518 Possuindo potencial para serem utilizadas na elaboração de um fermento láctico para
519 a fabricação de queijo de Coalho.

520

521 **AGRADECIMENTOS**

522 À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -
523 FACEPE, pelo suporte financeiro. Processo n. IBPG-0687-5.07/09.

524

525 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

526 ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of
527 reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne
528 pathogens in milk. *Food Control* v.22, p.457-461, 2011.

529 CASAUS, P. et al. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136
530 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiology**, London, v.143, p.2287-
531 2294, 1997.

532 CINTAS, L. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel
533 sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad
534 antimicrobial spectrum. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.63, p.4321-4330, 2007.

- 535 CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G. e BRANDELLI, A. Bacteriocin-like substance
536 production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Let Appl Microbiol**, Oxford, v.38,
537 p.251-256, 2004.
- 538 CINTAS, L. et al. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50
539 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel
540 bacteriocin secreted without na N-terminal extension termed enterocin Q. **J**
541 **Bacteriol**, Oxford, v.182, p.6806-6814, 2000. (COTTER, 2005).
- 542 ENNAHAR, S. et al. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A
543 and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.70,
544 p.291-301, 2011.
- 545 FLORIANO, B.; RUIZ-BARBA, J. e JIMÉNEZ-DÍAS, R. Purification and genetic
546 characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial
547 plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of
548 bacteriocins. **Appl Envir Microbiol**, Washington, v.64, p.4883-4890, 2008.
- 549 FRANZ, C. M. A. P.; GRUBE, A.; HERRMANN, A.; ABRIOUEL, H.; STÄRKE, J.;
550 LOMBARDI, A.; TAUSCHER, B.; HOLZAPFEL, W.H. Biochemical and Genetic
551 Characterization of the Two-Peptide Bacteriocin Enterocin 1071 Produced by
552 *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309 Applied and environmental microbiology, May
553 2002, p. 2550–2554 Vol. 68, No. 5 0099-2240/02/\$04.000 DOI:
554 10.1128/AEM.68.5.2550–2554.2002.
- 555 GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to
556 microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in
557 food. A review. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.1316–1325, 2005.
- 558 JENNES, W.; DICKS, L. e VERWOERD, D. Enterocin 012, a bacteriocin produced by
559 *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J Appl**
560 **Microbiol**, London, v.88, p.349-357, 2010.

- 561 KAWAMOTO, S. et al. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an
562 antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. **Appl Envir**
563 **Microbiol**, Washington, v.68, p.3830-3840, 2012.
- 564 KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER,G. Taxonomy and physiology of
565 probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.
566 2, p. 103-125, 1998.
- 567 LAUKOVÁ, A.; SKAUGEN,M. NES, I. Isolation and characterization of a new
568 bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus*
569 *faecium* AL41. **Ind Microbiol Biotechnol** (2007) 34:533–537 DOI 10.1007/s10295-
570 007-0226-4 123.
- 571 LAUKOVÁ, A. et al. Inhibition of *Listeria innocua enterica* serovar *Dusseldorf* by
572 enterocin A in gnotobiotic Japanese quails. **Vet Med – Czech.** v.49, p.47-51, 2008.
- 573 MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E.
574 Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant
575 to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-
576 222, 2003.
- 577 MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; CONVERTI, A.; COTTER, P. D.;
578 OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium spp.* A review.
579 **Biotechnology Advances** 31 482–488, 2013.
- 580 MAREKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; SKAUGEN,M. NES, I. Isolation and
581 characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by
582 environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. **Ind Microbiol Biotechnol**
583 (2007) 34:533–537 DOI 10.1007/s10295-007-0226-4 123.
- 584 MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. e BERKELEY, R. Methods for studying
585 bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v.12, p.39-86, 1972.
- 586

- 587 MORENO, F.M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. **The**
588 **role and application of enterococci in food and health, review.** International
589 Journal of Food Microbiology 106 (2006) 1 – 24.
- 590 MORENO, M. et al. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of
591 two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. **J Appl Microbiol**,
592 London, v.92, p.147-157, 2002.
- 593 NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma
594 revisão. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.11, p.120-127, 2008.
- 595 PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties:
596 biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**,
597 Baltimore, v.21, p.465-499, 2003.
- 598 POETA, P.; IGREJAS, G.; COSTA, D.; SARGO, R.; RODRIGUES, J.; TORRES, C.
599 Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *J Basic*
600 *Microbiol*, 48:385–392., 2008.
- 601 PARK, S.; ITOH, K. e FUJISAWA, T. Characteristics and identification of enterocinas
602 produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. **J Appl Microbiol**, London, v.95,
603 p.294-300, 2003.
- 604 SABIA, C. et al. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by
605 *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. **Int J Food**
606 **Microbiol**, Amsterdam, v.75, p.163-170, 2003.
- 607 SABIA, C. et al. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a
608 natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages
609 (“cacciatore”). **Int J Food Microbiol**, Amsterdam, v.87, p.173-179, 2004.
- 610 SABIA, C. et al. Study of two bacteriocins produced by *E. casseliflavus* and
611 *E. faecalis*. **Letters Appl Microbiol**, Oxford, v.38, p. 99-105, 2009.
- 612 TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.D. Bacteriocin production by lactobacillus pentosus
613 ST712BZ isolated from Boza. *Brasilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.38,
614 p.166-172, 2007.

615 TODOROV, S. D. Bacteriocins from lactobacillus plantarum – production, genetic
616 organization and mode of action, **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:209-221
617 ISSN 1517-8382, 2009.

618 ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A
619 Review Article. Published by Elsevier B.V. Selection and/or peer review under
620 responsibility of Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering
621 Society/ APCBEE, Procedia 2, p.50 :56, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 Conclusões Gerais

Com o intuito de preservar as características originais do queijo de Coalho artesanal produzido nos Municípios de Cachoeirinha e Arcoverde - em Pernambuco, como um produto tradicional que representa a cultura nordestina e visando melhorar a qualidade tecnológica e sanitária deste produto. A partir de cinco amostras de queijo de Coalho artesanal foram isoladas, purificadas e submetidas à identificação, por análises de características fisiológicas, 640 Isolados. Deste total 609 (95,16%) foram identificadas como Bactérias Ácido Láticas, 553 (90,8%) cocos e 56 (9,2%) bacilos. Os gêneros isolados por ordem de frequência foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

A semelhança do perfil microbiano láctico encontrado nos dois municípios estudados, Cachoeirinha e Arcoverde – PE, sugere padronização do queijo de Coalho artesanal produzido no Agreste Pernambucano, através de particularidades do Fluxograma de produção e do *terroir*

Do total de 309 amostras do gênero *Enterococcus*, 205 (66,34%) foram identificadas como *E. faecalis* e 104 (33,66%) como *E. faecium*. A atividade antagonista esteve presente em 79,93% dos *Enterococcus* frente a *Listeria innocua* ATCC 33090, em 57,60% frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e em 27,18% frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922). A atividade antagonista apresentada pelos *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* isolados da microbiota endógena do queijo de Coalho artesanal possuem grande potencial no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes neste tipo de alimento.

Os *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* isolados do queijo de Coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE produziram enterocinas com atividade antimicrobiana frente à *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Apresentando características de estabilidade a temperatura, pH e na presença de enzimas proteolíticas, representando um potencial promissor para

uso como conservantes biológicos, melhorando assim a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos.

À avaliação tecnológica Os *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* produtores de enterocinas testados neste trabalho apresentaram atividade proteolítica extracelular qualitativa e foram classificados como produtores lentos de ácido, onde só com 24 de incubação alcançaram, respectivamente, o pH 4,6 e 4,5; promovendo a coagulação do leite. Possuindo assim o potencial para serem utilizadas na elaboração de um fermento láctico para a fabricação de queijo de Coalho.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

Este trabalho produziu conhecimentos originais sobre a microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco, da atividade antagonista dos *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, e de suas enterocinas. No entanto, os temas aqui abordados podem ter sequência e serem aprofundados em trabalhos futuros. Com o objetivo de contribuir para a continuidade das pesquisas são sugeridos a seguir:

- Purificação e sequenciamento das enterocinas produzidas;
- Otimização do processo de produção das enterocinas produzidas através da utilização de substratos de baixo custo, como o soro do leite;
- Aprofundamento de estudos a respeito da patogenicidade das cepas de *Enterococcus* isoladas do queijo de Coalho, com detecção de genes envolvidos na expressão de fatores de virulência, avaliação da produção de aminas biogênicas e da resistência a antibióticos.
- Caracterização das enterocinas produzidas e avaliadas neste trabalho, quanto ao seu espectro de atividade contra outros microrganismos deteriorantes e patogênicos.
- Formulação de fermentos lácteos a partir das culturas estudadas neste trabalho, a fim de serem testados no processamento em escala experimental, do queijo de Coalho com leite pasteurizado. As características sensoriais deste queijo devem ser avaliadas e comparadas às do queijo artesanal tradicional.

7.ANEXO



Diretrizes para Autores

Objetivo e Polícia Editorial

A Revista Brasileira de Ciências Agrárias (RBCA) é editada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com o objetivo de divulgar artigos científicos, Para o desenvolvimento científico das diferentes áreas daS Ciências Agrárias. As áreas contempladas São Agronomia, Engenharia, Agrícola, Engenharia, Florestal, Engenharia de Pesca, e Aqüicultura, Medicina Veterinária, e Zootecnia.

Os artigos submetidos à avaliação devem ser originais e inéditos, sendo vetada a submissão simultânea em outros periódicos. A reprodução de artigos é permitida sempre que seja citada explicitamente a fonte.

Forma e preparação de manuscritos

O trabalho submetido à publicação deverá ser cadastrado no portal da revista (<http://www.agraria.pro.br>). O cadastro deverá ser preenchido apenas pelo autor correspondente que se responsabilizará pelo artigo em nome dos demais autores. Só serão aceitos trabalhos depois de revistas e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados ou submetidos em publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo.

Os trabalhos subdivididos em partes 1,2..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos esmos revisores. Solicita -se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente deve apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na sub missão.

Composição sequencial do artigo

- a. Título: no máximo com 15 palavras, em que apenas a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula.
- b. Os artigos deverão ser compostos por, no máximo, 7 (sete) autores;
- c. Resumo: no máximo com 15 linhas;
- d. Palavras-chave: no mínimo três e no máximo cinco, não constantes no Título;
- e. Título em inglês no máximo com 15 palavras, ressaltando-se que só a primeira letra da primeira palavra deve ser maiúscula;
- f. Abstract: no máximo com 15 linhas, devendo ser tradução fiel do Resumo;
- g. Key words: no mínimo três e no máximo cinco;
- h. Introdução: destacar a relevância do artigo, inclusive através de revisão de literatura;
- i. Material e Métodos;
- j. Resultados e Discussão;
- k. Conclusões devem ser escritas de forma sucinta, isto é, sem comentários nem explicações adicionais, baseando-se nos objetivos da pesquisa;
- l. Agradecimentos (facultativo);
- m. Literatura Citada.

Observação: Quando o artigo for escrito em inglês, o título, resumo e palavras-chave deverão também constar, respectivamente, em Português ou espanhol, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma principal.

Edição do texto

- a. Idioma: Português, Inglês e Espanhol
 - b. Processador: Word for Windows;
 - c. Texto: fonte Times New Roman, tamanho 12. Não deverá existir no texto palavras em negrito;
 - d. Espaçamento: duplo entre o título, resumo e abstract; simples entre item e subitem; e no texto, espaço 1,5;
 - e. Parágrafo: 0,5 cm;
 - f. Página: Papel A4, orientação retrato, margens superior e inferior de 2,5 cm, e esquerda e direita de 3,0 cm, no máximo de 20 páginas não numeradas;
 - g. Todos os itens em letras maiúsculas, em negrito e centralizados, exceto Resumo, Abstract, palavras-chave e Key words, que deverão ser alinhados à esquerda e apenas as primeiras letras maiúsculas. Os subitens deverão ser alinhados à esquerda, em negrito e somente a primeira letra maiúscula;
 - h. As grandezas devem ser expressas no SI (Sistema Internacional) e a terminologia científica deve seguir as convenções internacionais de cada área em questão;
 - i. Tabelas e Figuras (gráficos, mapas, imagens, fotografias, desenhos)
- Títulos de tabelas e figuras deverão ser escritos em fonte Times New Roman, estilo normal e tamanho 9

;-As tabelas e figuras devem apresentar larguras de 9 ou 18 cm, com texto em fonte Times New Roman, tamanho 9, e ser inseridas logo abaixo do parágrafo onde foram citadas pela primeira vez. Exemplo de citações no texto: Figura 1; Tabela 1. Tabelas e figuras que possuem praticamente o mesmo título deverão ser agrupadas em uma tabela ou figura criando - se, no entanto, um indicador de diferenciação. A letra indicadora de cada sub-figura numa figura agrupada deve ser maiúscula e com um ponto (exemplo: A.), e posicionada ao lado esquerdo superior da figura e fora dela. As figuras agrupadas devem ser citadas no texto da seguinte forma: Figura 1A; Figura 1B; Figura 1C.

-As tabelas não devem ter tracejado vertical e o mínimo de tracejado horizontal. Exemplo do título, o qual deve ficar acima: Tabela 1. Estações do INMET selecionadas (sem ponto no final). Em tabelas que apresentam a comparação de médias, mediante análise estatística, deverá existir um espaço entre o valor numérico (média) e a letra. As unidades deverão estar entre parêntesis

-As figuras não devem ter bordadura e suas curvas (no caso de gráficos) deverão ter espessura de 0,5 pt, e ser diferenciadas através de marcadores de legenda diversos e nunca através de cores distintas. Exemplo do título, o qual deve ficar abaixo: Figura 1. Perda acumulada de solo em função do tempo de aplicação da chuva simulada (sem ponto no final). Para não se tornar redundante, as figuras não devem ter dados constantes em tabelas. Fotografias ou outros tipos de figuras deverão ser escaneadas com 300 dpi e inseridas no texto. O(s) autor(es) deverá(ão) primar pela qualidade de resolução das figuras, tendo em vista uma boa reprodução gráfica. As unidades nos eixos das figuras devem estar entre parêntesis, mas, sem separação do título por vírgula.

Exemplos de citações no texto

- a. Quando a citação possuir apenas um autor: ... Freire (2007) ou ... (Freire2007).
- b. Quando possuir dois autores: ... Freire & Nascimento (2007), ou ... (Freire & Nascimento, 2007).
- c. Quando possuir mais de dois autores: Freire et al.(2007), ou (Freire et al., 2007).

Literatura citada

O artigo deve ter, preferencialmente, no máximo 25 citações bibliográficas, sendo a maioria em periódicos recentes. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista. As referências citadas no texto deverão ser dispostas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor e conter os nomes de todos os autores, separados por ponto e vírgula. As citações devem ser, preferencialmente, de publicações em periódicos, as quais deverão ser apresentadas conforme os exemplos a seguir:

a. Livros Mello, A.C.L.de; Vêras, A.S.C.; Lira, M.de A.; Santos, M.V.F. dos; Dubeux Júnior, J.C.B; Freitas, E.V.de; Cunha, M.V.da. Pastagens de capim-elefante: produção intensiva de leite e carne. Recife: Instituto Agronômico de Pernambuco, 2008. 49p.

b. Capítulo de livro Serafim, C.F.S.; Hazin, F.H.V. O ecossistema costeiro. In: Serafim, C.F.S.; Chaves, P.T. de (Org.). O mar no espaço geográfico brasileiro. Brasília-DF: Ministério da Educação, 2006. v. 8, p. 101-116.

c. Revistas Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers). Quando o artigo tiver url. Oliveira, A.B. de; Medeiros Filho, S. Influência de tratamentos pré-germinativos, temperatura e luminosidade na germinação de sementes de leucena, cv. Cunningham. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.7, n.4, p.268-274, 2007. <http://agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=183&path%5B%5D=104>. 29 Dez. 2012.

Quando o artigo tiver DOI. Costa, R.B. da; Almeida, E.V.; Kaiser, P.; Azevedo, L.P.A. de; Tyszka artinez, D. Tsukamoto Filho, A. de A. Avaliação genética em progênies de Myracrodruon urundeuva Fr. All. na região do Pantanal, estado do Mato Grosso. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.6, n.4, p.685-693, 1. <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i4a1277>>. Dissertações e teses Bandeira, D.A. Características sanitárias e de produção da caprinocultura nas microrregiões do Cariri do estado da Paraíba. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 116p. Tese Doutorado. e.WWW (World Wide Web) e FTP (File Transfer Protocol) Burka, L.P. A hipertext history of multi-user dimensions; MUD history. <<http://www.aka.org.cn/Magazine/Aka4/interhisE4.html>>. 29 Nov. 2012.

Não serão aceitas citações bibliográficas do tipo apud ou citado por, ou seja, as citações deverão ser apenas das referências originais. Citações de artigos no prelo, comunicação pessoal, folder, apostila, monografia, trabalho de conclusão de curso de graduação, relatório técnico e trabalhos em congressos, não são aceitos na elaboração dos artigos.

Outras informações sobre a normatização de artigos

- 1) Os títulos das bibliografias listadas devem ter apenas a primeira letra da primeira palavra maiúscula, com exceção de nomes próprios. O título de eventos deverá ter apenas a primeira letra de cada palavra maiúscula;
- 2) O nome de cada autor deve ser por extenso apenas o primeiro nome e o último sobrenome, sendo apenas a primeira letra maiúscula;
- 3) Não colocar ponto no final de palavras-chave, key words e títulos de tabelas e figuras. Todas as letras das palavras-chave devem ser minúsculas, incluindo a primeira letra a primeira palavra-chave;
- 4) No Abstract, a casa decimal dos números deve ser indicada por ponto em vez de vírgula;
- 5) A Introdução deve ter, preferencialmente, no máximo 2 páginas. Não devem existir na Introdução equações, tabelas, figuras, e texto teórico sobre um determinado assunto;
- 6) Evitar parágrafos muito longos;
- 7) Não deverá existir itálico no texto, em equações, tabelas e figuras, exceto nos nomes científicos de animais e culturas agrícolas, assim como, nos títulos das tabelas e figuras escritos em inglês;
- 8) Não deverá existir negrito no texto, em equações, figuras e tabelas, exceto no título do artigo e nos seus itens e subitens;
- 9) Em figuras agrupadas, se o título dos eixos x e y forem iguais, deixar só um título centralizado;

10) Todas as letras de uma sigla devem ser maiúsculas; já o nome por extenso de uma instituição deve ter maiúscula apenas a primeira letra de cada nome;

11) Nos exemplos seguintes o formato correto é o que se encontra no lado direito da igualdade: 10 horas = 10 h; 32 minutos = 32 min; 5 l (litros) = 5 L; 45 ml = 45 mL; l/s = L.s⁻¹; 27°C = 27 °C; 0,14 m³/min/m = 0,14 m³.min⁻¹.m⁻¹; 100 g de peso/ave = 100 g de peso por ave; 2 toneladas = 2 t; mm/dia = mm.d⁻¹; 2x3 = 2 x 3 (deve ser separado); 45,2 -61,5 = 45,2-61,5 (deve ser junto). A % é unidade que deve estar junta ao número (45%). Quando no texto existirem valores numéricos seguidos, colocar a unidade somente no último valor (Exs.: 20 e 40 m; 56,0,82,5 e 90,2%). Quando for pertinente, deixar os valores numéricos com no máximo duas casas decimais;

12) No texto, quando se diz que um autor citou outro, deve-se usar apud em vez de citado por. Exemplo: Walker (2001) apud Azevedo (2005) em vez de Walker (2001) citado por Azevedo (2005). Recomendamos evitar essa forma de citação.

13) Na definição dos parâmetros e variáveis de uma equação, deverá existir um traço separando o símbolo de sua definição. A numeração de uma equação deve estar entre parêntesis e alinhada esquerda. Uma equação deve ser citada no texto conforme os seguintes exemplos: Eq. 1; Eq. 4.;

14) Quando o artigo for submetido não será mais permitida mudança de nome dos autores, equência de autores e quaisquer outras alterações que não sejam solicitadas pelo editor.

Procedimentos para encaminhamento dos artigos

O autor correspondente deve se cadastrar com autor e inserir artigo no endereço <http://www.agraria.ufrpe.br> Ou <http://www.agraria.pro.br> O autor pode se comunicar com a Revista por meio do e-mail agrarias@prppg.ufrpe.br, editorgeral@agraria.pro.br ou secretaria@agraria.pro.br



ISSN 1413-7054 *printed version*

ISSN 1981-1829 *online version*

Scope and Policy

The publication of articles depend on the observance of the Editorial Norms and on the evaluation from the Editorial Board and/or ad hoc referees. All evaluations are confidential and impartial; authors and members of the Editorial Board and/or ad hoc referees do not share information.

Manuscripts Form and Presentation

1. Concepts and affirmations included in articles are of the entire responsibility of the authors.
2. "Ciencia e Agrotecnologia", a journal edited once every two months by UFLA's Publishing House (Editora UFLA) of the Universidade Federal de Lavras (Brazil), publishes scientific articles in the area of agricultural crops, elaborated by researchers of the national and international scientific community. Submission of a manuscript implies that it is neither under consideration for publication elsewhere nor has appeared previously in part or in whole. On acceptance for publication, authors assign to the Editors full copyright of the manuscript in all languages and countries. Publications will depend on editorial rules and on the review of experts and ad hoc commission. Reviewer and editorial opinions will be anonymously communicated to authors.
3. **Cost of publication:** the cost for publication is US\$15.00 (fifteen dollars) per edited page (printed page in the final format) up to six pages and US\$30.00 (thirty dollars) for additional page. A **non refundable**, US\$ 40.00 (forty dollars) fee must be paid at submission and it will be discounted from the final edited article cost (final format). At submission, the receipt of the bank deposit or money transfer (payable to FUNDECC/Editora, Banco do Brasil, Agency 0364-6; Account number 58.382-0) must be sent attached in the field "Transference

of Supplementary Documents".

4. Articles submitted for publication must be presented **electronically** (www.editora.ufla.br/revista), written in English, using only conventional abbreviations and nomenclature with no abbreviations on the title. Articles must be edited using the program **Microsoft Word for Windows** (version 98, 2000, 2003 or XP) on paper size A4 (21 cm x 29.7cm), double spaced using font Times New Roman, size 12, with a 2.5 cm margin on both left and right hand side, upper and lower margin, heading and footnote. The manuscript must present a **maximum of 16 pages**. All authors must sign a letter of agreement for the publication (in a single document) and send attached in the field "Transference of Supplementary Documents". Any insertion, exclusion or alteration in the authors order must be notified by all authors (including the excluded author, if the case).

5. Each manuscript must be organized in:

a) **TITLE** sufficiently clear; conspicuous and complete, without superfluous words, **written in English and Portuguese**. It is recommended to initiate with the term that represent the most important aspect, with other terms in decreasing of importance;

b) **FULL NAME(S) OF THE AUTHOR(S) IN CAPITAL LETTERS (without abbreviations)**, on the right hand side, one name underneath the other, with the footnote page containing their professional qualification or academic training and their work institution. The manuscript must have a maximum of 6 (six) authors;

c) **ABSTRACT** must be written continuously without paragraph and it must not exceed 250 words. **At least, it must contain a brief introduction, objective and results,**

d) **INDEX TERMS** with 3 to 5 key words that express the content of the article, different of those used in the title and described in capital and small letters and separated by comma;

e) **RESUMO** (abstract translated to Portuguese);

f) **TERMOS PARA INDEXAÇÃO** (index terms translated to Portuguese);

g) **INTRODUCTION** (including literature review and objective); h) **MATERIALS AND METHODS**; i) **RESULTS AND DISCUSSION** (it may include tables and figures);

j) **CONCLUSIONS**;

k) **ACKNOWLEDGEMENTS** (optional);

l) **REFERENCES (without thesis and dissertation cites).**

6. **FOOTNOTE:** It must contain title degree (MS, PhD, Dr, etc), full work address

(Institution, street, number, zip code, city, state, country) and e-mail of the all authors.

7. ACKNOWLEDGEMENTS: Acknowledgements to people or institutions might be included at the end of the text prior References. The written style must be serious and clear, indicating the reasons of the acknowledgements made.

8. TABLES AND FIGURES: Must be included right after their citation in the text.

9. PHOTOGRAPHS, GRAPHS, FIGURES, SYMBOLS OR FORMULA CONTAINED IN THEARTICLE SHOULD OBEY THE FOLLOWING RULES:

9.1. Photographs may be in color or in black and white, clear and with contrast, inserted in the text after their citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) **saved in extension "TIFF" or "JPEG" with resolution of 300 dpi**. Press copies will only present photographs in **black and white**.

9.2. Figures may be in color or in black and white, clear and with contrast, inserted in the text after their citation and also in a separate file (on the same diskette as the article) **saved in extension "TIFF" or "JPEG" with resolution of 300 dpi**. They must be elaborated using **Times New Roman font, size 10, without bold, without text box and arranged**. Press copies will only present figures in **black and white**.

9.3. Graphs must be inserted in the text after their citation as well as in an attached file. Graphs must be elaborated preferentially in Excel, using Times New Roman font, size 10, without bold, **saved in XLS extension and transformed in TIFF or JPG**, with resolution of 300 dpi.

9.4. Symbols and Chemical Formula must be presented using a word processor that permits a format for **Page Maker** (ex: MathType, Equation) without loss of its original form.

10. REFERENCES: starting with Volume 18, Number 1, 1994 the references must be cited according to NBR6023/2002 of ABNT. All references and their correct citation in the text are of the entire responsibility of the author(s). **Some important orientations:** all authors of the scientific document must be presented (source); the journal must be cited using its full name; all references must present the name of the city where the journal was published; all references must be cited alphabetically. **References must be cited using double space.**

EXAMPLES (most common types).

JOURNAL ARTICLE: CAMPOS, V.P.; PINHO, R.S.C.; FREIRE, E.S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.3, p.525-535, maio/jun., 2010.

Book:

- a) Complete book: FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada**. Lavras: UFLA, 2008. 672p.
- b) Book chapter With a specific author: BERGEN, W.G.; MERKEL, R.A. Protein accretion. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Growth regulation in farm animals: advances in meat research**. London: Elsevier Science, 1991. v.7, p.169-202. Without a specific author JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular. In: _____. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

DISSERTATION AND THESIS: **Do not use citations of dissertation or thesis.**

ABSTRACTS PRESENTED IN A CONGRESS AND OTHER EVENTS: **Do not use citations of abstracts presented in a congress and other events.**

ELECTRONIC DOCUMENTS:

Studies consulted online are referenced according to the specific rules for each type of document **with the addition of the electronic address information presented in parenthesis (<>) preceded by the expression "Available at" and the date of access to the document, preceded by the expression: "Access on:"** Note: It is not recommended to reference electronic material of short duration on the web. (ABNT, NBR6023, 2002, p.4). According to international standards, the division of electronic address at the end of the line should be always after the stroke (/).

- a) Complete book TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000. Available in: <<http://www.socinfo.org.br>>. Access in: 22 ago. 2000.
- b) Part of a book TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil: livro verde**. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000. cap.2. Available in: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Access in: 22 ago. 2000.
- c) Journal article (online access): JASPER, S.P.; BIAGGIONI, M.A.M.; RIBEIRO, J.P. Avaliação do desempenho de um sistema de secagem projetado para os pequenos produtores rurais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.4, p.1055-1061, jul./ago. 2008. Available in: <[http://www.editora.ufla.br/revista/32_4/\(04\)%20Artigo%204193.pdf](http://www.editora.ufla.br/revista/32_4/(04)%20Artigo%204193.pdf)>. Access in: 25 nov. 2008.

CITATION: BY THE ALPHABETIC SYSTEM (AUTHOR-DATA) (according to ABNT, NBR10520/2002):

Two authors: Davis & Jones (2010) or (Davis & Jones, 2010). Three or more authors: Ross et al. (2009) or (Ross et al., 2009). Note: When two authors are cited in the same article they are separated by & (commercial). If there is more cites in the same text, it must present the authors in a crescent chronological order: Souza (2008), Pereira (2009) and Holmes (2010);

or (Souza, 2008; Pereira, 2009; Holmes, 2010).

11. Publication process: upon submission, the editorial board evaluates if the article presents comparative relevance with other articles of the same knowledge area that were submitted for publication. If it is considered as relevant, the article will be submitted to peer reviewers. Approved by the peer reviewers, if necessary, the article may return to the correspondent author for corrections. If the corrections are not returned within the required deadline, the article will be automatically canceled. Requested corrections not attended without justification may also lead to cancellation. After these revisions, the article will receive corrections of scientific nomenclature, English, references and Portuguese. Following these corrections, the article will be edited and published according to the order of receipt and approval.

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscriptions\]](#)

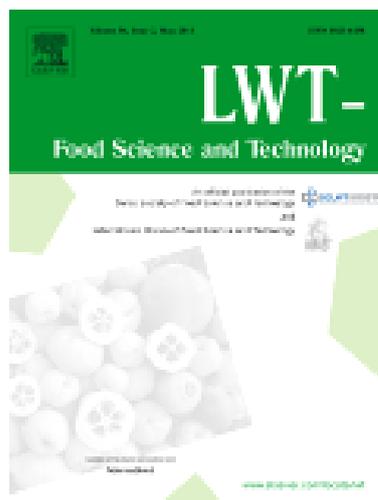
 All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Caixa Postal 3037, Campus Histórico
Caixa Postal
37200-000 Lavras - MG - Brasil
Tel.: +55 35 3829-1115
Fax: +55 35 3829-1532



editora@ufla.br

LWT- Food Science and Technology



ISSN: 0023-6438

LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

An official journal of the Swiss Society of Food Science and Technology (SGLWT/SOSSTA) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST). AUTHOR INFORMATION PACK TABLE OF CONTENTS

- Description
- Abstracting and Indexing
- Editorial Board
- Guide for Authors

DESCRIPTION

LWT - Food Science and Technology

is an international journal that publishes innovative papers in the fields of food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and nutrition. The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions written in English are welcomed in the form of review articles, short reviews, research papers, and research notes. Papers featuring animal trials are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

Database Coverage includes Current Contents, Cambridge Scientific Abstracts, Biological Abstracts, IFIS, Chemical Abstracts, Dairy Science Abstracts, Food Science and Technology Abstracts and AGRICOLA. 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 pages:
<http://support.elsevier.com>

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA Cambridge Scientific Abstracts Chemical Abstracts Current Contents Dairy Science Abstracts International Food Information Service Food Science and Technology Abstracts Science Citation Index Biological Abstracts ScienceDirect Scopus AGORA EMBiology Editor-in-Chief Katrin Hecht, Dept. Health Sciences and Technology, Lab. of Food and Nutrition Toxicology, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Schmelzbergstrasse 9, 8092, Zürich, Switzerland U.S. Editor Rakesh K. Singh, University of Georgia, Athens, Georgia, USA Review Editor Shridhar K. Sathe, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA Associate Editors Vijay Juneja, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Wyndmoor, Pennsylvania, USA Melanie Loessner, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zurich, Switzerland Catherine M.G.C. Renard, INRA Centre d'Avignon, Avignon, France Mingyong Xie, Nanchang University, Nanchang, China Editorial Board Members R. Amado, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zürich, Switzerland S. K. C. Chang, IACC 322, Fargo, North Dakota, USA J. Chirife, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina E. Choe, Inha University, Nam-Gu, Incheon, South Korea F. Escher, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zürich, Switzerland R. Gormley, Teagasc, Dublin, Ireland P. Gélinas, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), St.-Hyacinthe, Quebec, Canada D.G. Hoover, University of Delaware, Newark, Delaware, USA W. Kerr, University of Georgia, Athens, Georgia, USA W. Kneifel, Universität für Bodenkultur Wien (BOKU), Vienna, Austria U. Kulozik, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany C. Lacroix, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zürich, Switzerland K. Lorenz, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA H. N. Mishra, Indian Institute of Technology, Kharagpur, India G.S. Mittal, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada L. Nyström, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Zurich, Switzerland S. Quek, University of Auckland, Auckland, New Zealand R. N. Reddy, Food and Drug Administration (FDA), Summit-Argo, Illinois, USA Y.H. Roos, University College Cork, Cork, Ireland C.M. Rosell, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Paterna, Valencia, Spain P. Schieberle, Technische Universität München, Garching, Germany J. Shi, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Guelph, Ontario, Canada H. Singh, Massey University, Palmerston North, New Zealand W.E.L. Spieß, Max-Rubner-Institut; Federal Institute for Nutrition, Karlsruhe, Germany C.C. Tadini, Universidade de São Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil J.F. Thibault, Institut National de la Recherche Agronomique INRA, Nantes, France D. Topping, CSIRO (The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), Adelaide, South Australia, Australia H.M. Tuorila, University of Helsinki, Helsinki, Finland A. van Loey, K.U. Leuven Association, Heverlee, Belgium M. Venkatachalam, The Hershey Company, Hershey, Pennsylvania, USA S. Wang, Tianjin University, Tianjin, China H. Watzke, Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland L. Yu, University of Maryland, College Park, Maryland, USA

F. Zhong, Jiangnan University, Jiangsu, China
 AUTHOR INFORMATION PACK
 16 Mar 2014www.elsevier.com/locate/lwt3

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

LWT - Food Science and Technology is an official journal of the Swiss Society of Food Science and Technology (SGLWT/SOSSTA) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST). LWT - Food Science and Technology is an international journal that publishes innovative papers in the fields of food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and nutrition. The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication. Submission of a paper will be held to imply that it presents original research, that it has not been published previously, and that it is not under consideration for publication elsewhere. Papers featuring animal trials are outside the scope of the journal and will not be considered for publication. Types of paper Three types of peer-reviewed papers will be published: Timely Reviews. These concise reviews should present a focused aspect on a topic of current interest or an emerging field. They are not intended as comprehensive literature surveys covering all aspects of the topic, but should include all major findings and bring together reports from a number of sources.

They should aim to give balanced, objective assessments by giving due reference to relevant published work, and not merely present the prejudices of individual authors or summarise only work carried out by the authors or by those with whom the authors agree. Undue speculation should also be avoided. These reviews will receive priority in publication.

The reviews may address pertinent issues in food science, technology, processing, nutritional aspects of raw and processed foods and may include nutraceuticals, functional foods, use of "omics" in food quality, food processing and preservation, and food production. Topics to be covered should be at the cutting edge of science, well thought out, succinct, focused and clear. Ideally, the review should provide a view of the state of the art and suggest possible future needs and trends.

All articles will be subjected to peer review process.

Submit an abstract of the proposed review to the Reviews Editor (Professor Shridhar Sathe, ssathe@fsu.edu for consideration prior to preparing the full length manuscript. Abstract of the proposed work should include the following:

- a. The abstract should identify the need for the proposed article, the intended audience, and five key words.
 - b. Title (120 characters or less)
 - c. Short abstract (\leq 300 words).
 - d. Identify the address and contact information for the contact author. The contact information should include author name, postal address, telephone number, fax number, and email.
 - e. Anticipated time needed to complete the proposed work once the initial abstract has been approved.
- Manuscript Preparation
- a. All lines and pages must be continuously numbered.
 - b. All text should be double-spaced.
 - c. Total manuscript length \leq 3,000 words (text portion).

- d. Total number of Tables \leq 5.
 - e. Total number of figures \leq 5.
 - f. Maximum number of references (including those cited in tables and figures) not to exceed 50.
 - g. In the reference list identify five (5) key references (indicated by an * in front of the reference in the reference section). In two to three sentences explain why this reference is a key reference.
- Research Papers. Reports of complete, scientifically sound, original research which contributes new knowledge to its field. The paper must be organised as described in Article Structure below. Papers should not exceed 5000 words (approximately 18 typed pages)AUTHOR INFORMATION PACK16 Mar 2014
www.elsevier.com/locate/lwt4

Research Notes

. Brief reports of scientifically sound, original research of limited scope of new findings. Research Notes have the formal organisation of a full paper. Such notes will receive priority of publication. Research notes should not exceed 2500 words (approximately 9 typed pages)Contact details for submissionSubmission for all types of manuscripts to LWT - Food Science and Technologyproceeds totally online.Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/lwt> , you willbe guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.Revised papers received more than three months after reviewers' comments were sent may be treated as new submissions, at the discretion of the Editor. If the author has not replied to reminders/enquiries about revisions within 6 months, the paper will be considered to have lapsed, and any subsequent submission will be treated as a new submission and must be submitted to the journal using the above process, addressed to the Editor-in-Chief, with an explanation that it had previously been submitted to the journal.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.By submitting this manuscript, the authors agree that text, equations, or figures from previously

published articles or books have been clearly identified in full and their origin clearly explained in the adjacent text, with appropriate references given at the end of the paper. Duplication of text is rarely justified, even with diligent referencing. Exceptions may be made for descriptions of standard experimental techniques, or other standard methods used by the author in the investigation; but an appropriate citation is preferable. Authors who duplicate material from their own published work in a new article, without clearly identifying the repeated material and its source as outlined above, are self-plagiarising.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest> . Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

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 <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), 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 including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, 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. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author,

who AUTHOR INFORMATION PACK 16 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/lwt5 must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue : Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum. Copyright This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription. For Subscription articles Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). 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 (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). 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: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>). Retained author rights As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

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 agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. 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 their research funder Subscription • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>) • No Open Access publication fee

AUTHOR INFORMATION PACK 16 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/lwt6 All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to 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-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the

author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

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. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles. The publication fee for this journal is \$3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. 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 (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information. Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

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

Review Process A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Editor-in-Chief and Editors have the right to decline formal review of the manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal, 2) lacking technical merit, 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance, 4) fragmentary and provides marginally incremental results, or 5) is poorly written.

Referees Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. AUTHOR INFORMATION PACK 16 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/lwt7 Peer Reviews It is the journal policy to keep the peer reviewing anonymous. Names of reviewers are only revealed if they are in agreement with the request of the author. When submitting a manuscript, authors may indicate names of experts who are not suitable/appropriate for reviewing the paper.

PREPARATION

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: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). 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.

All lines must be consecutively numbered throughout the manuscript.

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.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc. 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.

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. 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.

AUTHOR INFORMATION PACK

16 Mar 2014 www.elsevier.com/locate/lwt12medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

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 upload all of your corrections within 48 hours. 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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). 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 (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>).

Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQand/or> contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>. © Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.co>