



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**GABRIELA ALVES DE ARAÚJO FERNANDES**

**Avaliação do potencial tecnológico e enzimático de bactérias ácido lácticas  
e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal**

Recife, 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

### **Avaliação do potencial tecnológico e enzimático de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) – UFRPE, como requisito final para obtenção do título de mestre.

Aluna: Gabriela Alves de Araújo Fernandes

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Recife, 2014

Ficha Catalográfica

F363a      Fernandes, Gabriela Alves de Araújo  
              Avaliação do potencial tecnológico e enzimático de  
              bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de coalho  
              artesanal / Gabriela Alves de Araújo Fernandes. -- Recife,  
              2014.  
              108 f.: il.

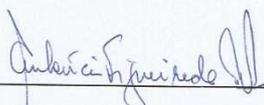
              Orientador (a): Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
              Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência  
              Animal) – Universidade Federal Rural de  
              Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,  
              Recife, 2014.  
              Inclui anexo(s), apêndice(s) e referências.

              1. Bactérias 2. Ácido lácticas 3. Enzimas extracelulares  
              4. Leveduras 5. Queijo de Coalho, Alimentos I. Porto, Ana Lúcia  
              Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 591.4

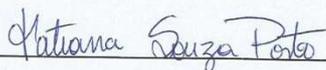
**Avaliação do potencial tecnológico e enzimático de bactérias ácido lácticas  
e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal**

BANCA EXAMINADORA



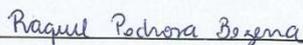
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora/Presidente)

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica Sede



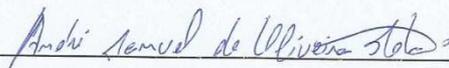
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Souza Porto (Interno)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de  
Garanhuns



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raquel Pedrosa Bezerra (Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMFA



Prof. Dr. André Manuel de Oliveira Mota (Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco - DMFA

Recife, 2014.

A todos que amo.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Nossa essa é sempre a parte mais complicada, pois você sempre esquece alguém, mas sendo sincera posso até não me recordar para escrever, mas meu coração sempre se lembra de quem amo.

Não poderia ser diferente do tradicional, então lá vou eu começar a agradecer pelo principal, Deus. Realmente preciso dar glória à presença dele e dos demais santos em minha vida, pois foram muitas as dificuldades para conseguir concretizar essa etapa, mas no final vai dar tudo certo! Também acendi tantas velas clamando ajuda divina que quase comecei um incêndio no Morro da Conceição.

Sem fugir a tradição, logo em segundo lugar não poderia deixar de mencionar toda minha família, pela qual eu tenho o maior prazer em lutar.

Pensei bem a quem agradecer agora e julguei que deveria dar “OBRIGADA” à orientadora, quer dizer as orientadas, afinal são duas.

Ana Porto é sempre um prazer integrar sua equipe e está aprendendo com a Senhora, principalmente quando o assunto é ter bom gosto para se vestir. Espero que estejamos usando indumentárias parecidas, assim como ocorreu na qualificação.

Para Taciana Cavalcanti, acho que não sou capaz de achar as palavras certas para expressar minha gratidão. Não tem como não admirar! Uma profissional excelente, um lado humano admirável e como mãe, aí é papel dos filhos avaliar. Mas pense, se ela já pega no pé dos “orientandos”, imagina só o que ela é capaz de fazer com os filhotes. Brincadeiras a parte, só quero deixar meu “MUITO OBRIGADA” por todas suas ações, compreensão, confiança, dedicação e tudo mais.

Agora sim, vem todo mundo que falta. Mas nem por isso menos importante. E haja gente, viu!

Foram muitos que trabalharam comigo para obter os resultados, logo não vou citar nomes, mas sinceramente esse grupo é show, mesmo sendo taxado de “os queijudos”.

Agradeço também a Polyanna Herculano e André Mota, os quais foram imensamente solícitos e contribuíram bastante para o desenvolvimento deste trabalho. Acredito que finalmente estes artigos serão publicados, se eu não ouvir de alguém que “falta o tchan do trabalho”.

Não posso me esquecer de agradecer aos amigos. E que amigos! Estavam sempre lá, em todas as horas, até para fazer experimentos aos 45 do segundo tempo. Não vou citar nomes, porque o número de bons amigos que tenho não cabe em palavras, mas sim, em sentimentos.

Obrigada aos profissionais da banca avaliadora, tanto os presentes na qualificação quanto na defesa da Dissertação.

Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas.

Devido à censura meus agradecimentos terminam por aqui.

## RESUMO

O queijo de Coalho é um produto típico do Nordeste do Brasil com microbiota bastante diversificada, inclusive bactérias ácido lácticas e leveduras. Estes micro-organismos influenciam nas características organolépticas do produto, e ainda podem atuar como probióticos ou na produção de substâncias de interesse industrial, tais como: enzimas, compostos aromáticos, ácido láctico, entre outros. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e avaliar o potencial tecnológico e enzimático de bactérias ácido lácticas e leveduras obtidas a partir de queijo de Coalho artesanal proveniente da região Agreste do Estado de Pernambuco (Municípios de Arcoverde, Capoeiras e Venturosa). No total foram isoladas 125 bactérias ácido lácticas e 15 leveduras, com predominância dos gêneros *Enterococcus* (52,8%) e *Candida* (46,66%), respectivamente. As bactérias ácido lácticas se mostraram mais promissoras quanto a produção do composto aromático diacetil em relação às leveduras. A maioria das bactérias ácido lácticas (96%) possui alta capacidade de acidificação. Na produção de proteases extracelulares utilizando o meio de soja, a levedura *Galactomyces geotrichum* foi a melhor produtora com  $120,5 \pm 1,2$  U/mL em 24h. Em relação à produção de proteases utilizando MRS caldo como meio de cultivo obtiveram-se resultados baixos, onde o isolado 6C, *Enterococcus* sp. foi o melhor produtor com  $34,2 \pm 0,43$  U/mL em 48h. Quanto à produção de  $\beta$ -galactosidase em soro de leite bovino, as leveduras foram melhores que as bactérias ácido lácticas, onde a maior atividade obtida foi  $33,8 \pm 0,26$  U/mL para a  $\beta$ -galactosidase extracelular neutra em 48h. Pode-se concluir que bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal podem ser excelente fonte para aplicação industrial, principalmente nas indústrias de alimentos.

**Palavras-chave:** bactérias ácido lácticas, enzimas extracelulares, leveduras, queijo de Coalho, alimentos.

## ABSTRACT

The Coalho cheese is a typical product of Northeastern Brazil. The microbiota of this cheese is very diverse, including lactic acid bacteria and yeasts. These microorganisms influence the organoleptic characteristics of the product and may act as probiotics or to the production of substances of industrial interest, such as enzymes, aromas, acid lactic, others. The objective of this study was to isolate, identify and assess technological and enzymatic potential of lactic acid bacteria and yeasts obtained from artisanal Coalho cheese of the Wasteland region of the State of Pernambuco (City Arcoverde, Capoeiras and Venturosa). In total, 125 lactic acid bacteria and 15 yeasts were isolated from artisanal Coalho cheese with predominance of the genus *Enterococcus* (52.8%) and *Candida* (46.66%), respectively. The lactic acid bacteria are most promising for the production of diacetyl flavor. Most of lactic acid bacteria (96%) have a high acidification. To the production of extracellular proteases using the medium of soybeans, the yeast *Galactomyces geotrichum* was more effective obtained  $120.5 \pm 1.2$  U/mL to proteolytic activity at 24 hours of growth. The production of extracellular protease using MRS broth as a growth medium was lower being the sample 6C, *Enterococcus* sp. the best producer with  $34.2 \pm 0.43$  U/mL at 48h. The production of  $\beta$ -galactosidase in whey, yeasts were better than the lactic acid bacteria. The highest activity obtained was  $33.8 \pm 0.26$  U/mL for extracellular  $\beta$ -galactosidase neutral at 48h. It can be concluded that lactic acid and yeasts isolated from artisanal Coalho cheese can be excellent source to industrial application, especially in food industries.

**Key-words:** lactic acid bacteria, extracellular enzymes, yeasts, Coalho cheese, food

## LISTA DE FIGURAS

### *Capítulo I*

<b>Figura 1.</b> Queijo de Coalho	18
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural do diacetil	29

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo I**

**Tabela 1.** Classificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas presentes em queijos de acordo com a morfologia, temperatura ótima de crescimento e tipo de fermentação do açúcar 20

### **Capítulo II**

**Tabela 1.** Produção de protease extracelular por bactérias ácidos lácticas cultivadas em APT caldo por 48h 72

**Tabela 2.** Atividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular e intracelular produzida por bactérias ácido lácticas cultivadas soro de leite por 48h 73

### **Capítulo III**

**Tabela 1.** Isolamento, identificação e produção de diacetil em leveduras obtidas a partir de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco 89

**Tabela 2.** Avaliação do potencial patogênico de leveduras obtidas de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco 90

**Tabela 3.** Produção de protease e  $\beta$ -galactosidase por *Galactomyces geotrichum* isolada de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco por 48 horas em soro de leite 91

**Tabela 4.** Produção de  $\beta$ -galactosidase (U/mL) por leveduras obtidas de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco cultivadas em soro de leite bovino por 48h. 92

## **LISTA DE ABRAVIAÇÕES**

**GRAS:** Generally Recognized as Safe, em português algo que remete a Geralmente Reconhecido como Seguro.

**L:** Levedura

**LDR:** Leite Desnatado Reconstituído

**MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**MRS:** Man, Rogosa & Sharpe. É um meio de cultivo para *Lactobacillus* sp. descrito em 1960.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>3. CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1 QUEIJO DE COALHO	18
3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS: TAXONOMIA E IMPORTÂNCIA	19
3.3 LEVEDURAS: TAXONOMIA E IMPORTÂNCIA	22
3.4 SORO DE LEITE	24
3.5 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E LEVEDURAS	25
3.5.1 CAPACIDADE ACIDIFICANTE	26
3.5.2 FORMAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS COM AROMA	28
3.5.3 PROTEASES	29
3.5.4 $\beta$ -GALACTOSIDASE	31
<b>4. REFERÊNCIAS</b>	<b>33</b>
<b>5. CAPÍTULO II – ARTIGO I – BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS</b>	<b>49</b>
<b>6. CAPÍTULO III – ARTIGO II - LEVEDURAS</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>99</b>
<b>8. NORMAS DA REVISTA</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos alimentares vêm alcançando lugar de elevado destaque nos meios científicos, isto devido à ascendente tendência mundial em se consumir produtos naturais e com propriedades funcionais (WROBLEWSKA et al., 2009).

Os laticínios detêm valores bastante relevantes no mercado brasileiro. Em 2013 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) constatou que foi produzido cerca de 34 milhões de leite (BRASIL, 2013). Além disso, o leite é utilizado como matéria-prima para a formulação de diversos produtos lácteos fermentados, os quais necessitam da adição de bactérias ácido lácticas para sua coagulação. Essas bactérias possuem propriedades probióticas, e ainda podem produzir metabólitos secundários associados à promoção da saúde (MILLS et al., 2011).

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo heterogêneo de micro-organismos que possuem capacidade de fermentar açúcares, sendo geralmente empregadas para contribuir com a textura, aroma, segurança microbiana e valor nutricional dos alimentos fermentados (SETTANNI e CORSETTI, 2008).

Além das BAL, as leveduras também podem ser encontradas participando da produção de alimentos fermentados. Elas são seres eucariontes, quimiorganotróficos e pertencentes ao Reino Fungi (BARNETT, 2000). Contribuem para o desenvolvimento do sabor dos queijos por produzirem metabólitos resultantes da fermentação da lactose, pela atividade proteolítica e lipolítica (WELTHAGEN e VILJOEN, 1998; PEREIRA-DIAS et al., 2000; CORBO et al., 2001; LOPANDIC et al., 2006; PRICE et al., 2014).

A utilização de BAL e leveduras para produzir produtos lácteos com funções especiais representam um grande avanço na busca por hábitos saudáveis e melhoria na saúde da população em geral, contribuindo desta forma para a qualidade de vida das pessoas (SOOMRO, MASUD e ANWAAR, 2002; GOLIC et al., 2013).

Além disso, os micro-organismos representam uma fonte tecnológica em potencial, devido à capacidade destes para produzir inúmeras substâncias, tais como, enzimas proteolíticas, metabólitos secundários, exopolissacarídeos, entre tantas outras que acabam por influenciar na qualidade final do alimento. E estas substâncias podem ser isoladas e aplicadas nas diversas indústrias (OLEMPSKA-BEER et al., 2006; EL-GHAISH et al., 2011).

Nas últimas décadas verificou-se o aumento do número de casos de doenças alérgicas alimentares, principalmente quanto à alergia ao leite de vaca (ALV), visando minimizar ou solucionar esta problemática tem se buscado diversas alternativas (HOCHWALLNER et al., 2013). Uma delas refere-se ao uso de proteases especiais, essas enzimas são produzidas por muitos micro-organismos considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ou seja, que não oferecem risco ao consumidor.

As proteases são capazes de degradar as proteínas do leite de vaca aumentando a digestibilidade do produto e conseqüentemente diminuindo seu potencial alergênico (JACOB et al., 2010), pois apesar do leite ser um dos alimentos mais completos, algumas pessoas não conseguem ingeri-lo, devido à presença de proteínas com epítomos alergênicos (LIRA et al., 2010).

Além das proteases, outras enzimas contribuem para aumentar a digestibilidade do leite de vaca, é o caso da  $\beta$ -galactosidase, enzima responsável por degradar a lactose - principal carboidrato presente no leite - em dois monossacarídeos, são eles, glicose e galactose (IQBAL et al., 2010).

A  $\beta$ -galactosidase, conhecida popularmente por lactase, possui grande valor para a indústria alimentícia, principalmente no desenvolvimento de produtos sem lactose. Pois as indústrias buscam alternativas para atender ao público que apresenta intolerância a lactose (SONG et al., 2010). Além disso, as indústrias querem minimizar ou solucionar as dificuldades tecnológicas observadas em produtos lácteos refrigerados, por exemplo, a cristalização da lactose (HARJU, KALLIOINEN e TOSSAVAINEN, 2012).

Sendo assim, pelo exposto, é relevante a avaliação do potencial tecnológico com vistas à produção de substâncias aditivas para a indústria de alimentos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar o potencial tecnológico e enzimático de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no Estado de Pernambuco.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Isolar bactérias ácido lácticas e leveduras a partir de queijo de Coalho artesanal produzido no Estado de Pernambuco;
- Identificar as bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal produzidos no Estado de Pernambuco através de testes fenotípicos e bioquímicos;
- Determinar o potencial aromático através da presença do composto diacetil produzido pelas bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijo de Coalho produzido no Estado de Pernambuco;
- Analisar o potencial de patogenicidade de leveduras isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido no Estado de Pernambuco;
- Avaliar o perfil enzimático de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de queijos de Coalho artesanal produzido no Estado de Pernambuco.

### **3. CAPÍTULO I**

#### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3.1 QUEIJO DE COALHO

O queijo de Coalho é um produto tipicamente do Nordeste brasileiro, muito popular e amplamente consumido pela população local e em todo o Brasil. É um queijo com sabor ácido e levemente salgado, resistente ao calor, assim o mesmo pode ser consumido assado (SILVA et al., 2012a).



**Figura 1.** Queijo de Coalho (Fonte: <http://www.sindfrutas.com.br>)

Trata-se de um produto de grande valor comercial, devido principalmente a simplicidade da tecnologia de fabricação e elevado rendimento do processo. Sua produção é realizada principalmente por pequenos e médios laticínios, além de propriedades do segmento da agricultura familiar, assim, tem contribuído para o crescimento socioeconômico desta região de maneira efetiva (SILVA et al., 2010; ARAUJO et al., 2012).

Os queijos podem ser classificados segundo diversos critérios, incluindo os tipos de micro-organismos envolvidos no processo de maturação, se a matéria prima é crua ou pasteurizada e se existe algum tratamento térmico (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijo de Coalho, define este produto como um queijo de consistência semi-dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Em geral este possui cor branca amarelada uniforme, sabor brando, acidez leve, salgado, com aroma característico (SDA, 2001; SILVA et al., 2012a).

Denomina-se queijo de Coalho artesanal aquele que é fabricado a partir de leite cru, isto é, que não sofre processo de pasteurização. Este tipo de queijo apresenta propriedades organolépticas típicas e aroma particular que estão associados a atributos do próprio leite, relacionados à raça e ao tipo de nutrição das vacas, ao processo de fabricação básico do queijo tradicional e à microbiota natural autóctone, responsáveis pela fermentação e maturação próprias da região produtora. Essa microbiota é composta em sua maioria por bactérias ácido lácticas selvagens, presentes na região e com diferenças metabólicas próprias que acabam por inferir características particulares a cada produto (SILVA et al., 2012b).

O queijo de Coalho é um produto bastante fabricado em todos os Estados do Nordeste, mas a maior produção concentra-se nos Estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (QUEIROZ, 2008; MENEZES, 2011). Em Pernambuco, o queijo de Coalho é um dos principais produtos produzidos na Região Agreste adquirindo importância fundamental na economia dos pequenos municípios, uma vez que constitui a principal fonte de renda da propriedade familiar e impulsiona a economia da região (CAVALCANTE et al., 2007; ARAUJO et al., 2012).

O queijo de Coalho possui uma microbiota composta por bactérias ácido lácticas e leveduras, esses micro-organismos contribuem para os atributos sensoriais observados neste queijo.

### **3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS: TAXONOMIA E IMPORTÂNCIA**

Bactérias ácido lácticas compõem um grupo bastante heterogêneo de micro-organismos que apresentam inúmeras diferenças fisiológicas. Esse termo bactérias ácido lácticas advém da capacidade destas para fermentar os açúcares primários em ácido láctico através da via metabólica homofermentativa ou heterofermentativa (MILLS et al., 2011). Essas bactérias podem estar presentes em produtos lácteos, como normalmente relatado, ou ainda podem ser encontradas em diversos outros alimentos (RIVERA-ESPINOZA e GALLARDO NAVARRO, 2010).

Dentre os nove gêneros que compõem as bactérias ácido lácticas, apenas cinco são amplamente encontrados em queijos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (CAVALCANTE, 2007; POT, 2008).

As bactérias ácido lácticas são Gram-positiva, catalase negativa, não formadora de esporos, baixa quantidade de guanina e citosina, anaeróbia facultativa (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010). Como mencionado anteriormente, elas podem ser classificadas em dois subgrupos bioquímicos com base nos produtos da sua fermentação. Nesta classificação, as bactérias homofermentativas compreendem aquelas que convertem glicose a ácido láctico, enquanto que as heterofermentativas são aquelas que produzem além do ácido láctico, outros produtos como dióxido de carbono, ácido acético e etanol (FOX, 2000; CARR, CHILL e MAIDA, 2002). Essa classificação pode ser observada abaixo, na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas presentes em queijos de acordo com a morfologia, temperatura ótima de crescimento e tipo de fermentação do açúcar.

<b>Gêneros</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Temperatura ótima</b>	<b>Tipo de fermentação</b>
<i>Lactococcus</i>	Cocos	30°C	Homofermentativo
<i>Streptococcus</i>	Cocos	42°C	Homofermentativo
<i>Enterococcus</i>	Cocos	42°C	Homofermentativo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos	30°C	Heterofermentativo
<i>Lactobacillus</i>	Bastões	30 e 42°C	Homofermentativo / Heterofermentativo

**Fonte:** Adaptado de Fox et al. (2000) e Carr, Chill e Maida (2002)

Devido suas propriedades metabólicas, essas bactérias são geralmente empregadas em alimentos fermentados, devido sua significativa contribuição na formulação de aroma, sabor, textura, valor nutricional e segurança microbiológica (CAPLICE e FITZGERALD, 1999; SETTANNI e MOSCHETTI, 2010), tais como vinhos, produção de embutidos fermentados, queijos,

iogurtes, entre outros alimentos (ROJO BEZARES et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2010).

As bactérias ácido lácticas são realmente muito importantes para a indústria de alimentos, haja vista que elas são capazes de produzir ácidos orgânicos, substâncias antimicrobianas e outros metabólitos a partir de açúcares, e assim promover melhoria nos produtos comerciais (CIZEIKIENE et al., 2013; MAGGI et al., 2013). Esse composto provoca diminuição do pH do leite, e conseqüentemente cria condições adversas a proliferação de micro-organismos patogênicos (AYAD et al., 2004; CIZEIKIENE et al., 2013; SETTANNI et al., 2013).

A fermentação realizada pelas bactérias ácido lácticas também envolve processos bioquímicos, como proteólise e lipólise (DEETH, 2002; LOPEZ-KLEINE e MONNET, 2011), e contribuem ainda mais para o desenvolvimento de aromas e sabores específicos presentes nos fermentados (RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

Quando os alimentos são produzidos de forma tradicional ou artesanal, o sensorial do produto geralmente é mais intenso e marcante, por que o leite não passou pelo processo de pasteurização, o qual desnatura proteínas, modifica o sabor e diminui a concentração de bactérias ácido lácticas, as quais são responsáveis por inúmeras características organolépticas apreciáveis em queijos (SILVA, 2013).

Como o potencial enzimático de espécies usadas como fermentos na produção de queijos comerciais é restrito, a pesquisa por novas espécies com uma maior produção e diversidade enzimática tem aumentado, porque a indústria alimentícia necessita de inovações e produtos mais apreciáveis (GONZÁLEZ et al., 2010; STEELE et al., 2013).

O desenvolvimento do aroma e sabor dos queijos é um processo bioquímico dinâmico e complexo que é influenciado por três fatores primordiais: composição do leite, condições de processamento, e micro-organismos e suas enzimas presentes na matriz do queijo (CARVALHO, 2007; STEELE et al., 2013). Assim esses fatores devem ser bem controlados para garantir a qualidade do produto fabricado.

Além das bactérias ácido lácticas, as leveduras também tem ganhado destaque nos processos fermentativos que originam produtos alimentícios com qualidades organolépticas especiais.

### **3.3 LEVEDURAS: TAXONOMIA E IMPORTÂNCIA**

As leveduras pertencem ao reino *Fungi*, inseridas mais precisamente, nos filos Ascomycota e Basidiomycota, e entre os fungos mitospóricos, antigos Deuteromycetes (FUNKE et al., 2011). Possuem distribuição abrangente, podendo ser encontradas nos mais diversos substratos, por exemplo, solo, água, vegetais, animais, e até bebidas e alimentos (CAPECE e ROMANO, 2009; PERRICONE et al., 2014).

As leveduras apresentam um talo predominantemente unicelular, podem realizar reprodução assexuada por brotamento ou fissão, e não formam corpos de frutificação, estas características as diferenciam dos demais fungos. Entretanto as leveduras ainda pode apresentar reprodução sexuada, onde são capazes de formar esporos ou ainda serem dimórficas, isto é, apresentar tanto a reprodução assexuada quanto sexuada a depender da influência do meio externo (PURRINOS et al., 2013).

Elas ainda caracterizam-se por apresentar parede celular rígida, núcleo organizado com membrana nuclear (célula eucariótica), aclorofiladas, nutrição do tipo heterotrófica por absorção e ausência de motilidade (BARNETT et al., 2000; FORSYTHE, 2013).

A taxonomia convencional de leveduras caracteriza-se por ser uma tarefa laboriosa, visto que esta se baseia em aproximadamente 100 testes morfológicos e bioquímico/fisiológicos. Essas técnicas clássicas detêm alta credibilidade no mundo científico, pois muitas já foram bem estudadas por diversos pesquisadores, tais como, KREGGER VAN RIJ (1984), YARROW (1998) e BARNETT et al. (2000), os quais afirmam que a rotina de identificação clássica de leveduras é um trabalho longo que envolve diversos parâmetros, entre eles:

- a) caracterização morfológica da colônia através de exames macroscópicos da colônia e microscópicos;
- b) tipo de reprodução;
- c) caracterização bioquímica através de testes de assimilação e fermentação de carboidratos, sais, etc;
- d) caracterização fisiológica com crescimento da colônia em diferentes temperaturas;
- e) testes complementares como hidrólise da uréia, degradação de amido, reação ao corante *diazonium blue b* (DBB), produção de ácido acético, entre outros.

Outra alternativa para a identificação é a biologia molecular, esta forma é bastante eficiente e rápida, entretanto seu custo ainda é elevado, assim esta característica delimita o uso desta técnica (ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2007; ÁLVAREZ-MARTÍN et al., 2008; PADILLA, MANZANARES e BELLOCH, 2014).

Algumas espécies de leveduras são importantes porque podem causar enfermidades em plantas e animais, incluindo o homem, pois demonstram habilidade em produzir enzimas extracelulares, como proteases, fosfolipases, amilases e uréase. Estas características geralmente estão associadas a fatores de patogenicidade e virulência quando se trata da relação fungo hospedeiro (MENDES-GIANNINI et al., 1997; MIDGLEY et al., 1998). Assim o estudo da atividade enzimática contribui para o esclarecimento de inúmeros aspectos relacionados à patogenicidade dos fungos e permite verificar se o alimento em questão encontra-se adequado ao consumo (BROOKS et al., 2012).

As leveduras também apresentam importância como agentes biodeterioradores, devido à capacidade de transformar a matéria orgânica, assim elas alteram as características dos alimentos e pode inviabilizar seu consumo (SOUHAUG, 2011). Entretanto elas se bem utilizadas pelas indústrias dos alimentos, elas podem conferir características organolépticas desejadas aos produtos, atuando como agentes tecnológicos e melhorando os aspectos sensoriais dos produtos, ou ainda podem conferir papel probiótico e promover

bem-estar ao consumidor, por exemplo, melhora do trânsito do trato gastrointestinal, aumento da disposição para realizar atividades, entre outras (PERDESEN et al., 2012; MARTINS, MARTINS e BARBOSA, 2013; PERRICONE et al., 2014).

As leveduras são uma excelente alternativa com aplicabilidade industrial, devido ao potencial para produzir produtos de interesse comercial, e ao baixo custo de produção (LIMA et al., 2009; VIANA et al., 2010; GOLIC et al., 2013). Essas características incrementam a utilização destas para fins tecnológicos.

A utilização de subprodutos para o crescimento de micro-organismos com o objetivo de produzir substâncias de alto valor agregado é uma alternativa viável (PESSOA JUNIOR, 1991). Entre esses subprodutos destaca-se o soro do leite.

### **3.4 SORO DE LEITE**

O soro de leite, também é conhecido por lactossoro, é um subproduto muito importante das queijarias, sendo entendido como o líquido remanescente após a precipitação e remoção da caseína, principal proteína do leite (TORRES, 2005). A produção de queijo no mercado brasileiro vem crescendo a cada ano, e assim, conseqüentemente há uma maior produção de soro de leite (THAMER e PENNA, 2005; BATISTA, 2011).

Para se produzir 1kg de queijo, como o queijo de Coalho, necessita-se de 10 litros de leite bovino em média, o que resulta em torno de 9 litros de soro (RICHARDS, 2002), com isso o soro do leite pode ser visto sob dois aspectos bem distintos. Primeiramente como agente de poluição, se descartado inadequadamente, devido ao volume produzido e a falta de afinidade com a água, que gera transtornos ambientais, principalmente em relação a poluição de água potável (CICHELLO, RIBEIRO e TOMMASO, 2013). Ou ainda pode ser entendido como um produto nobre, afinal possui propriedades nutricionais apreciáveis (NEVES, 2001).

Em geral, o lactossoro é tratado como resíduo pela maioria das queijarias do Brasil, e acaba sendo descartado inadequadamente. Todavia, atualmente a legislação ambiental brasileira está mais rígida, logo as indústrias

tem buscado alternativas para aproveitamento desse subproduto (FLORÊNCIO et al., 2013). Uma delas é a utilização deste em processos fermentativos com aplicação nas mais diversas áreas de produção de alimentos, afinal o lactossoro tem alto valor nutricional e propriedades funcionais importantes, tais como, emulsificante, espumante e gelificante, o que o torna um substrato interessante para as indústrias (ROSANELI et al., 2002; CANILHA et al., 2006).

O soro de leite pode ser utilizado para cultivar micro-organismos que produzem metabólitos de interesse industrial, como é o caso das bactérias ácido lácticas e levedura (PANESAR et al., 2007; KOLLER et al., 2013). Em segundo lugar pode ser consumido em forma de produtos lácteos que trazem diversos benefícios para o desenvolvimento do próprio produto e a saúde do consumidor, por exemplo, melhoria no aroma, textura e valor nutricional; aumento da vida de prateleira, produção de efeito probiótico (TORTELLI et al., 2008).

### **3.5 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS E LEVEDURAS**

O crescente interesse da sociedade em consumir alimentos saudáveis vem impulsionando o desenvolvimento do mercado de alimentos funcionais (SUVARNA, BODY, 2005). E como existe a necessidade contínua de aprimoramento das técnicas industriais para que se atinja uma melhor produção industrial, logo se faz necessário a buscar por micro-organismos com propriedades tecnológicas aplicáveis de excelência (ABDEL-RAHMAN et al., 2013).

De acordo com Komatsu et al. (2008) e Lima et al. (2009), entende-se alimentos funcionais como sendo aqueles capazes de garantir efeitos nutricionais adequados e que podem proporcionar benefícios adicionais em uma ou mais funções do organismo, e conseqüentemente geram melhorias à saúde do consumidor.

Dentre os alimentos que tem demonstrado avanços mercadológicos expressivos sob essa perspectiva de funcionalidade estão os produtos lácteos (NIELSEN, 2009). Eles são bastante apreciados, contribuírem com a nutrição básica, e ainda são benéficos ao consumidor, devido à presença de micro-

organismos probióticos e de metabólitos produzidos por eles durante a fermentação (ANTUNES et al., 2007; DONKORA et al., 2007; MOTARJENI et al., 2014).

A ação de micro-organismos específicos para a fermentação do leite acabam por diminuir seu pH, modificando suas características organolépticas e possibilitando a formação de outros produtos, tais como, iogurtes, queijos, bebidas lácteas, coalhadas, etc (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005). Em geral, os micro-organismos mais utilizados no processo fermentativo do leite são as bactérias lácticas, entretanto ainda podem ser usadas algumas bifidobactérias e até leveduras (PIMENTEL, 2005).

Para promover benefícios à saúde do consumidor, esses micro-organismos devem permanecer viáveis, ativos e abundantes no produto final, durante o prazo de validade estipulado (RITTER, 2007). Então este alimento funcional que contém micro-organismos probióticos podem contribuir para a saúde do consumidor, atuando na prevenção de infecções intestinais e diarreias, efeito anticarcinogênico (WOLLOWSHI, RECHKEMMER e ZOBEL, 2001), auxiliar na redução dos níveis de colesterol (SEPPO et al, 2003), melhorar a digestão da lactose (MEDEIROS et al., 2008; PARK e OH, 2010), controle da microbiota intestinal, diminuição da população de patógenos pela produção de ácido acético e láctico, bacteriocinas e demais compostos antimicrobianos (DE VUYST e LEROY, 2007), estimular o sistema imune e diminuir a constipação (CAO e FERNÁNDEZ, 2005; SAAD, 2006).

### **3.5.1 Capacidade acidificante**

Os micro-organismos possuem grande importância econômica, visto que estas desempenham importante papel na fermentação de ampla variedade de alimentos. Suas atividades metabólicas influenciam no desenvolvimento de propriedades organolépticas desejáveis, permitindo assim a conservação do produto, além de elevar o valor nutritivo deste (ALEXANDRE et al., 2002; GALIA et al., 2009).

As bactérias ácido lácticas são amplamente utilizadas como culturas iniciadoras para fermentar o leite, devido à capacidade delas em produzir ácido láctico através do catabolismo da lactose. Este composto apresenta fórmula molecular  $C_3H_6O_3$  e estrutural  $CH_3 - CH - COOH$  (NELSON e COX, 2008), e acrescenta ao leite fermentado um sabor ligeiramente ácido, atividade antimicrobiana, propriedades nutricionais e organolépticas apreciáveis (GALIA et al., 2009).

A capacidade de alguns micro-organismos, principalmente bactérias ácido lácticas, para produzir elevada quantidade de ácidos orgânicos, inclusive ácido láctico, através da fermentação dos carboidratos presente no alimento, provoca como consequência a redução do pH, e este é o fator primordial em que se baseia a atividade antimicrobiana. Ainda podem ser produzidas outras substâncias inibitórias, por exemplo, peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio etc., que conferem segurança ao alimento (BROMBERG et al., 2006; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

O ácido láctico é um ácido orgânico comumente utilizado como biopreservante alimentar (RODRIGUÉZ SAUCEDA, 2010). Trata-se de um composto que confere ao leite fermentado um sabor ligeiramente ácido, apresenta atividade antimicrobiana, protegendo esse alimento de micro-organismos adulterantes e patogênicos, e ainda confere propriedades organolépticas particulares para a formação do produto final, e ainda eleva o valor nutricional do alimento em que está inserido (BOTERO et al, 2013).

A acidificação em alimentos provocada pela produção do ácido láctico contribui para a redução de patógenos, haja vista que a maioria dos micro-organismos que causam doenças possuem uma faixa de pH ótimo em torno da neutralidade ou em condições ligeiramente alcalinas para seu crescimento, assim o processo de acidificação irá atuar como limitante no desenvolvimento destes (JATOBÁ et al., 2008).

Em contra partida, a capacidade acidificante utilizando leveduras em leite e derivados lácteos é pouco explorada, tendo mais viabilidade o uso destas no processo de fermentação de pão, cerveja e vinho (SICARD e LEGRAS, 2011; SUÁREZ-LEPE e MORATA, 2012).

Todos os ácidos tem atividade antimicrobiana, entretanto a atividade depende de outros fatores, tais como: quantidade produzida e características físico-químicas de cada ácido. A acidificação em alimentos deve ser controlada, visando proporcionar características agradáveis ao produto, afinal se ela ocorrer em excesso pode prejudicar o sensorial do produto e não torná-lo agradável ao consumo (GOMÉZ e VASQUEZ, 2011).

### **3.5.2 Formação de compostos voláteis com aroma**

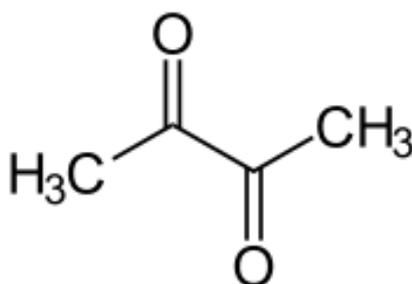
A ação enzimática que ocorre em produtos lácteos, principalmente durante a maturação de queijos, gera a formação de compostos voláteis. Sabe-se que alguns compostos são os principais responsáveis por produzir o aroma característico lácteo. Entre esses aromas os mais relevantes são: diacetil ou butanodiona ( $C_4H_6O_2$ ) e acetoína ou 3-hidroxi-butanona ( $C_4H_8O_2$ ), e são eles os principais componentes que acarretam no aroma amanteigado presente no produto, e, além disso, ainda podem atuar como “*carriers*” de diversos outros aromas agregando valor significativo na formação dos aromas (CFR, 2011; RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

Ambos os compostos mencionados acima demonstram características aromáticas bastante similares, todavia o composto diacetil é de fato mais apreciado no mercado, devido às propriedades químicas que apresenta, e que o tornam mais eficiente quando comparado a acetoína, assim o potencial deste como aditivo é mais apreciado e explorado (GAVA, 2009; CADWALLADER e SINGH, 2009).

O diacetil é um composto de alto valor aromático, muito requerido por certas indústrias, principalmente por aquelas que utilizam leite como sua matéria-prima para o desenvolvimento dos seus produtos, haja vista que este possui capacidade para produzir o aroma característico dos produtos lácteos, tendo traço amanteigados. Entretanto sua presença pode ser indesejável em outros produtos, por exemplo, suco de maçã, cerveja e bebidas alcoólicas (GARCÍA-QUINTÁNS et al., 2008; RINCON-DELGADILLO, LOPEZ-HERNANDEZ e RANKIN, 2013).

O composto diacetil é conhecido por diversos outros nomes, entre eles: 2,3 butanodiona, biacetil, dimetil dicetona, dimetil glioxal ou 2,3 dicetobutano;

sua fórmula é  $C_4H_6O_2$ ; possui cor amarela esverdeada, peso molecular de 86,09 e ponto de ebulição  $88^\circ C$  (BLANK, 2009). É produzido por via sintética a partir da butanona e por via fermentativa através de diversos micro-organismos, especialmente bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, além de leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, e em geral esses micro-organismos usam glicose, lactose, ou qualquer outra fontes de carbono como substrato (CLARK e POTTER, 2007; PAPAA et al., 2013; PADILLA et al., 2013).



**Figura 2.** Fórmula estrutura do diacetil (Fonte: <http://qnint.sbgq.org.br>)

Em geral, as bactérias ácido lácticas atraem mais a atenção da indústria, devido ao fato delas serem mais estudadas e apresentarem resultados mais significativos para a produção deste composto em um curto período de tempo, já as leveduras também apresentam potencial para a produção desse aroma, entretanto com menor expressão. E como na visão industrial é necessário maior desempenho em menor espaço de tempo, então as bactérias ácido lácticas são preferidas, e elas têm sido utilizadas para gerar patentes e proporcionar maior eficiência de processos industriais para as empresas que as utilizam (PAPAA et al., 2013; SALMERÓN, THOMAS e PANDIELLA, 2014).

A principal aplicabilidade desse aroma destina-se a produção de queijos, manteigas ou substitutos para os aromas naturalmente desenvolvidos nesses produtos (HILL e KETHIREDDIPALLI, 2013).

### **3.5.3 Proteases**

As peptidases, peptídeo hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e peptídeos. Estas

enzimas pertencem a subgrupo 4 da classe das hidrolases e sua nomenclatura é realizada de acordo com o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando peptídeos terminais ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente (NELSON e COX, 2011; TAVANO, 2013).

Há uma tendência mundial para utilizar essas enzimas nos mais diversos tipos e processos industriais, tais como, indústrias de detergentes, processamento de alimentos, produtos farmacêuticos, biorremediação, biossíntese e biotransformação (JELLOULI et al, 2009; DENG et al., 2010), entretanto as fontes comerciais disponíveis até o momento não estão atendendo a demanda crescente do mercado (SUNDARARAJAN, KANNAN e CHITTIBABU, 2010), logo se faz necessário à procura por novas fontes produtoras de protease, entre elas, podemos citar os micro-organismos, inclusive bactérias ácido lácticas e leveduras (GUPTA et al., 2002; DAVID et al., 2009; PUNITHA et al., 2009).

O uso de proteases especiais produzidas por micro-organismos considerados GRAS é uma demanda crescente no mercado, pois estas substâncias podem degradar as proteínas do leite de vaca facilitando sua digestibilidade e diminuindo seu potencial alergênico, e como os micro-organismos GRAS são fontes confiáveis e de baixo custo para as indústrias, então o interesse pelo uso deles é elevado (JACOB et al., 2010)

Essas enzimas podem ser úteis na degradação de proteínas que apresentam potencial alergênico, por exemplo, caseínas e  $\beta$ -globulinas, as quais são relatadas como as principais proteínas alergênicas presente no leite de vaca (COCCO et al., 2000; GAUDIN et al., 2008). A busca por diversos processos tecnológicos que visam minimizar essa alergenicidade têm-se obtido resultados positivos através da utilização de tratamentos térmicos, enzimáticos, enriquecimento e glicosilação, e assim impulsiona investimento de pesquisas que visam minimizar os efeitos da alergia por leite de vaca (TAHERI-KAFRANI et al., 2009).

Naturalmente durante o processo de fermentação, ocorre à proteólise, um processo que reduz o número de epítomos alergênico e conseqüentemente diminui a capacidade de alergenicidade do leite através da hidrólise das suas proteínas tornando-as mais assimiláveis (EL-GHAISH et al., 2011). Em queijos, a proteólise é um importante parâmetro para as características organolépticas, especialmente quanto ao sabor, aroma e textura, assim a ação das enzimas é de extrema relevância, sendo fundamental para o resultado final do produto (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010).

Em geral, as bactérias ácido lácticas e leveduras possuem um sistema enzimático proteolítico capaz de degradar as proteínas do leite levando a formação de aminoácidos livres, assim acabam por contribuir no desenvolvimento das características organolépticas do produto fermentado, tornando-os mais apreciados (EL-GAISH et al., 2011). As características organolépticas são aquelas perceptíveis através do paladar, olfato e visão. No leite observa-se o aspecto geral, sabor, odor e coloração (SILVA et al., 2010).

Além das proteases, diversas outras enzimas também são importantes a nível industrial, é o caso das  $\beta$ -galactosidases, as quais são responsáveis pela hidrólise da lactose.

#### **3.5.4 $\beta$ -galactosidase**

A enzima  $\beta$ -D-galactosil galactohidrolase ( $\beta$ -galactosidase, E.C. 3.2.1.23, trivialmente chamada de lactase), é uma enzima comercial importante, pois catalisa a hidrólise de  $\beta$ -galactopiranosídeos, como a lactose, que é o açúcar do leite, um dissacarídeo formado pela glicose e galactose, com baixo poder adoçante (IQUAL et al., 2010; TOMAL, 2010).

O valor nutricional da lactose apresenta limitação, devido à grande proporção de pessoas ao redor do mundo que não possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase como componente do seu trato gastrointestinal, e por isso não podem utilizá-la, o que gera intolerância a lactose (RODRIGUES et al., 2008; SONG et al., 2010). Em geral, estes indivíduos intolerantes ao ingerir algum alimento com lactose acabam por apresentar quadros de inchaço abdominal,

diarreia, e diversos outros distúrbios gastrointestinais (MEDEIROS et al., 2008; PARK e OH, 2010).

A hidrólise da lactose tem uma grande relevância na indústria de alimentos, principalmente no desenvolvimento de produtos sem lactose. Além disso, a formação de cristais de lactose é comumente observada em sorvetes e produtos lácteos refrigerados, sendo considerado um defeito tecnológico, por isso a hidrólise é uma etapa importante. Então investir na procura por fontes com baixo custo produtoras dessa enzima é uma excelente estratégia (SONG et al., 2010; HARJU, KALLIOINEN e TOSSAVAINEN, 2012).

As possíveis fontes produtoras de enzimas em geral são animais, plantas, bactérias, leveduras e fungos, contudo as fontes microbianas se destacam devido à facilidade fermentativa de produção, elevada atividade e geralmente boa estabilidade (PARK e OH, 2010; ZHOU et al., 2013).

Outra utilização da  $\beta$ -galactosidase a nível industrial é a produção de oligossacarídeos relacionados com transglicosilação permitindo a transferência de galactose do dissacarídeo lactose, produzindo galacto-oligossacarídeos promissores agentes prebióticos (RHIMI et al., 2009, IQBAL et al., 2010).

Além da produção de enzimas importantes para a tecnologia de alimentos, a investigação sobre as propriedades tecnológicas de bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas de produtos artesanais, como o queijo de Coalho, se faz necessário para selecionar cepas consideradas ideais para a formulação de fermentos iniciadores com o objetivo de uniformizar as características sensoriais de produtos a base de matéria prima crua. Afinal a busca pelo melhor micro-organismo, pela técnica mais eficiente e produtos mais apreciados é constante no setor industrial, inclusive na área de alimentos (JELEN, 2011).

#### 4. REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D.P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, 2002.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 8, p. 961-967, 2007.
- ÁLVAREZ-MARTÍN, P. et al. Interaction between dairy yeasts and lactic bacteria strains during milk fermentation. **Food Control**, v. 19, n. 1, p. 62-70, 2008.
- ARAUJO, J. B. C. et al. Pesquisa participativa e o novo modelo de produção de queijo coalho artesanal da comunidade de Tiasol, em Tauá, CE. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v. 29, n. 1, p. 213-241, 2012.
- AYAD, E. H. E. et al. Application of wild starter cultures for flavor development in pilot plant cheese making. **International Dairy Journal Baking**, v. 10, n. 3, p. 169-179, 2000.
- BANERJEE, U. C. et al. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 213-219, 1999.
- BARNETT, J.A. PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast – Characteristics and Identification**, 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811p.
- BECERRA, M. ET AL. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8-9, p. 506–512, 2001.
- BLANK, I. **Furan in Processed Foods**. In: Gilbert, J., Şenyuva, H. Z. editor. **Bioactive Compounds in Food**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2009;p. 291–322.

BOTERO, A.P.B. et al. Detection of lactic acid isomers: Metabolites of bacteria lactic acid isolated from Colombia sourdough. **Europe PubMed Central**, v. 45, n. 3, p. 205-206, 2013.

BOTERO, S. P. B. et al. Detección de isómeros del ácido láctico: metabolitos de bacterias ácido lácticas aisladas de masas ácidas fermentadas colombianas. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 3, p. 205-206, 2013.

BRASIL. Projeções do Agronegócio, Brasil 2013/14 a 2022/23, 4ª edição, Distrito Federal, Brasília.

BROMBERG, R. et al., Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus latis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BROOKS, J. C. et al. Survey of raw milk cheese for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 154-158, 2012.

CADWALLADER, K. R.; SINGH, T. K Flavours and off-flavours in milk and dairy products. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. New York, NY: Springer-Verlag; 2009, p. 631–690.

CAPLICE, E; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CAPECE, C.; ROMANO, P. “Pecorino di Filiano” cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 180-184, 2009.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. New York, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2000.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. Tese de Doutorado - USP, 2007, 154 p.

CAVALCANTE, J.F.M. et al. Processamento do queijo de coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p.205-214, 2007.

CFR. 2011. Dry curd cottage cheese (21CFR133.129), p. 320–321 *In* **Code of Federal Regulations**, Title 21, v. 2. US Government Printing Office, Washington, DC.

CHAO, S. H. et al. *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile *Lactobacillus* species isolated from stinky tofu brine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2555-2559, 2008.

CIZEIKIENE, D. et al. antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 539-545, 2013.

CLARK, S.; POTTER, E. D. Cottage Cheese. *In*: **Handbook of Food Products Manufacturing**, Chapter 26, p. 618–63, 2007.

CORBO, M. R. et al. Occurrence and characterization of yeast isolated from milk and dairy products of Apulia region. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 147–152, 2001.

COCCO, R.R.; JÄRVINEN, K.M.; SAMPSON, H.A.; BEYER, K, Mutational analysis of major, sequential IgE-binding epitopes in a S1-casein, a major cow's milk allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 433-437, 2003.

DAVID, L. et al. Marine genetic resources: are view of scientific and commercial interest. **Marine Policy**, v. 33, p. 183–194, 2009.

DEETH, H.C. Lipids | Lipolysis. **Encyclopedia os Dairy Products Sciences**, 2002, p. 1595-1600.

DE JONG, C. et al. Chapter 66 – Use of the micro-scale platform for high throughput screening of flavor characteristics in strains (Yeast/LAB) for alcoholic beverages. **Flavour Science**, p. 355-359, 2014.

DENG, A. et al. Purification and characterization of a surfactante-stable high-alkaline protease from *Bacillu* sp. B001. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7100-7106, 2010.

EI-GHAISH, S. et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. **Trends in Food Science e Technology**, v. 22, p. 509-516, 2011.

FEIJOO, G. et al. Use of cheese whey as a substrate to produce mangenese peroxidase by *Bjerkandera* sp. BOS55. **Journal of industrial microbiology biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 86-90, 1999.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais**, n. 15, 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Editora: ARTMED. 2ª EDIÇÃO, 2013, 602 p.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v.19, p. 3-11, 2009.

FOX, P.F. et al. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg: Aspen Publisher, 2000, cap. 5, p. 54-97.

FUNKE, B. R. et al. **Microbiologia** - 10ª Edição. Editora Artmed, 2011.

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. Editora Globo, São Paulo, 1990, 296 p.

GALIA, W. et al. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytica and acidifying properties. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 89-95, 2009.

GARCÍA-QUINTÁNS, N. et al. Activation of the diacetyl / acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv.diacetylactis CRL264 by acidic growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.7, p. 1988–1996, 2008.

GAUDIN, J. C. et al. Assessment og the IgE-mediated immune response to milk- specific proteins in allergic patients using microarrays. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 4, p. 686-693, 2008.

GAVA, A.J. **Tecnologia de Alimentos - Princípios e Aplicações**. Editora Nobel. Edição 1, 2009. 512 p.

GENTES, M. C.; ST-GELAIS, D.; TURGEON, S. L. Gel formation and rheological propiedades of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 645-661, 2011.

GOLIC, N. et al. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia . **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p. 294–300, 2013.

GÓMEZ, J. S.; VÁSQUEZ, G. Aplicación de agentes antimicrobianos orgánicos em la inhibición de *Salmonella* spp. em harina de pescado exportación. **Repositorio de la Escuela Superior Politécnica del Litoral** (Articulo Informe Profesional), 2011.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre**, 2001.

GONZALÉZ, L. et al. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 592-597, 2010.

GÓRECKI, R. K. et al. Adaptative potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in its 7 plasmids. **Plos One**, v. 6, n. 7 - e22238, 2011.

GUIMARÃES, F.F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n.1, p. 38-51, 2009.

GUPTA, R., BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15–32, 2002).

HILL, A. R.; KETHIREDDIPALLI, P. Chapter 8 - Dairy Products: Cheese and Yogurt. **Biochemistry of Foods (Third Edition)**, p. 319-362, 2013.

HOCHWALLNER, H. et al. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. **Methods**, 2013.

HSU, C.A; YU, R.C; CHOU, C.C; Production of  $\beta$ -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 197– 206, 2005.

HURJU, M.; KALLIONEM, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2012.

IQBAL, S. et al. Beta-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, p.1408–1416, 2010.

JACOB, C.M. et al. Polimorfismo de interleucina 10 e persistência da alergia ao leite de vaca. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 33, n. 3, 2010.

JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms. The hemiascomycetus yeasts. **International Journal Food Microbiology**, v. 122, p. 321-326, 2008

JANSSENS, L. et al. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 195-215, 1992.

JATOBÁ, A. et al. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-nylo como probiótico. **Pesq. agropec. bras.**, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008

JELLEN, P. Whey Processing | Utilization and Products. *In* **Encyclopedia of Dairy Science (Second Edition)**, San Diego, 2011, p. 731-737.

JELLOULI, K. et al. **Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1**. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 939-948, 2009.

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

KANMANI, P. et al. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* P180 and its functional characteristics activity in vitro. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4827–4833, 2011.

KLAENHAMMER, T. R et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 393-409, 2005.

KOKA, R.; WEIMER, B.C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, p.75–79, 2000.

KOSIKOWSKI, F. V. Our Industry Today. **J. Dairy Sci.**, v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeast: a Taxonomic Study**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, 1028p.

LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LOPEZ-KLEINE, L.; MONNET, V. Lactic Acid Bacteria | Proteolytic Systems. **Encyclopedia of Dairy Science (Second Edition)**, 2011, p. 49-55.

LIMA, C.D.L.C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, 2009.

LIN, T.Y.; Chien, M.F.C. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v.100, p.1419–1423, 2007.

LIRA, T.B.F. et al. Avaliação de variáveis que influenciam a hidrólise enzimática da caseína do leite de cabra Moxotó. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.9, p.1036-1043, 2010.

LOPANDIC, K. et al. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, v. 23, p. 341–350, 2006.

MAGGI, M. et al. Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and fumagillin efficiency. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 474-483, 2013.

MAHONEY, R.R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, p. 147-154, 1998.

MARTHE, D.B. et al. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v.33, n.6, p. 1389-1393, 2010.

MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.F. Probióticos: microrganismos benéficos. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**, v. 1, n.1, 2013.

MEDEIROS, F. O. et al. Ondas ultrassônicas de vidro: um novo método de extração de beta-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MENEZES, S.S.M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)**, v.28, n.1, 2011.

MILLS, S. et al. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 377-401, 2011.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 5 edição. 2010. Editora Elsevier. 960 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 2011, Edição 5, 1304 p. Editora Artmed.

NEVES, K. C. S. et al. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, 2006.

NIELSEN, D.S. et al. *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, 1468-1472, 2007.

NORO, G., GONZÁLEZ, F.H.D., CAMPOS, R., DÜRR, J.W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

OLEMPKA-BEER, Z.S. et al. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144-158, 2006.

OLIVEIRA, A. F et al. Monitoramento físico-químico da qualidade do leite pasteurizado integral no município de Lins/SP em outubro de 2010. **Revista Cognitio**, n. 1, 2011.

PADILLA, B. et al. Potential impact of dairy yeasts on the typical flavour of the traditional ewes' and goats' cheeses. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 89-95, 2013.

PADILLA, B.; MANZANARES, P.; BELLOCH, C. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hanseni* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. **Food Microbiology**, v. 38, p. 160-166, 2014.

PAPPA, E. C. et al. Formation of volatile compounds in Teleme cheese manufactured with mesophilic and thermophilic dairy starters. **Small Ruminant Research**, v. 111, n. 1-3, p. 110-119, 2013.

PARK, A. R.; OH, D. K. Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current stage and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1279-1286, 2010.

PESSOA JÚNIOR, A. 1991. 187p. **Produção de Proteína Microbiana a Partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação

de Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, Brasil.

PERDERSEN, L. L. et al. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 144-151, 2012.

PEREIRA-DIAS, S. et al. Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 55–63, 2000.

PERRICONE, M. et al. Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. **Food Microbiology**, v. 38, p. 26-35, 2014.

PRICE, E.J. et al. Study of the influence of yeast inoculum concentration (*Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*) on blue cheese aroma development using microbiological models. **Food Chemistry**, v. 125, p. 464–472, 2014.

POT, B. **The taxonomy of lactic acid bacteria**. In: Corrieu G., LUQUET, F.M. (coordonnateurs) Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments. Paris: Lavoisier, 2008, 849 p.

PUNITHA, V. et al. Chemical degradation of melanin in enzyme based dehairing and fibre opening of buff calfskins, **Clean Technol. Environ. Policy**, v. 11, p. 299–306, 2009.

PURRINOS, L. et al. Study of the counts, species and characteristics of the yeast population during the manufacture of dry-cured “Iacón”. Effect of salt level. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 12-18, 2013.

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

RHIMI, M. et al. Exploring the acidotolerance of beta-galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: an attractive enzyme for lactose bioconversion. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 775-784, 2009.

RHIMI, M. et al. Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a beta-galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 7, p. 515-525, 2010.

RINCON-DELGADILLO, M. I. et al. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1128-1139, 2012.

RINCON- DELGADILLO, M. I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; RANKIN, S.A. Short communication: Reactivity of diacetyl with cleaning and sanitizing agents. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 105-111, 2013.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p.1-11, 2010.

RODRÍGUES, A. P. et al. *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase crystallization using full-factorial experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 178-182, 2008.

RODRIGUES SAUCEDA, E.N. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **Ra Ximhai**, v. 7, n. 1, 2011.

ROJO-BEZARES, B. et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.234-240, 2006.

ROMERO, F. J. et al. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochem.**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.

RYCROFT, C.E. et al. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 878-887, 2001.

SANI, R. K. et al. **Folia Microbiologica**, v. 44, p. 367–371, 1999 .

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, n. 4, 2004.

SALMERÓN, I.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S.S. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulation. **Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 140-144, 2014.

SALMIEN, S. et al. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. **Bioscience Microflora**, v. 15, p. 61-67, 1996.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, queijo de Coalho e queijo Manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2001. Seção 1, p.13.

SENER, N., APAR DK, ÖZBEK B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and beta-galactosidase stability under sonication. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1493-1500, 2006.

SETTANNI, L. et al. Selected lactic acid bacteria as a hurdle to the microbial spoilage of cheese: Application on a traditional raw ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 126-132, 2013.

SETTANNI, L.; CORSSETI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.

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

SICARD, D.; LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229-236, 2011.

SILVA, C.S.B. 2013. 70p. **Produção de fermento láctico endógeno para a produção de queijo de Coalho com características do Sertão Alagoano**. Dissertação de mestrado em Nutrição. Universidade Federal de Alagoas, Brasil.

SILVA, J.N.G.; SANTOS, A.B.; MENEZES, S.S.M. Queijo de Coalho caseiro: Territorialidade da Agricultura Camponesa nos Municípios Sergipanos de Garuru e Monte Alegre de Sergipe. *In: VI Simpósio Internacional de Geografia Agrária – VII Simpósio Nacional de Geografia Agrária – 1ª Jornada de Geografia das Águas*, 2010.

SILVA, R. A. et al. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1732-1738, 2012a.

SILVA, R. A. et al. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, p. 1533–1538, 2012b.

SINGH, J.; VOHRA, R. M.; SAHOO, D. K. Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1093-1101, 2004.

SOOMRO, A.H.; MUSUD, T.; ANWAAR, K. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in food preservation and human health – A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 20-24, 2002.

SOURHAUG, T. **Yeasts and Molds | Spoilage Molds in Dairy Products.** Encyclopedia of Dairy Science (Secound Edition), p. 780-784, 2011.

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

SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking. **Trends in Food Science e Technology**, v. 23, n. 1, p. 39-50, 2012.

SUNDARARAJAN, S.; KANNAN, C.N.; CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillua cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing gent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 128-133, 2011.

TAVANO, O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.90, p.1-11, 2013.

TAHERI-KAFRANI, A. et al. Effects of heating and glycation debeta-lactoglobuli on its recognitions by IgE of sera from cow milk allergy patients. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4974-4982, 2009.

TOMAL, A. A. B. et al. Avanços tecnológicos na obtenção, purificação e identificação de galactooligossacarídeos e estudo de suas propriedades prebióticas. **Científica, Ciências biológicas e da saúde**, v. 12, n. 4, p. 41-49, 2010.

VASILJEVIC, T; JELEN, P. Production of  $\beta$ -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Innovative Food Science e Emerging Technologies**, v. 2, p. 75-85, 2001.

VIANA, D. A. et al. Production and Stability of Protease from *Candida buinensis*. **Applied. Biochemistry and Biotechnology**, v.162, n.162, p.830–842, 2010.

WELTHAGEN, J.J.; VILJOEN, B.C. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p.1885-194, 1998.

WRÓBLEWSKA, B. et al. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of Kefir. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 2334-2445, 2009.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: Kurtzma, C.P; Fell, J.W. **The Yeast: a taxonomic study**, 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publish, 1998, p.77-100.

ZHOU, H.X. et al.  $\beta$ -Galactosidase over-production by a *mig1* mutant of *Kluyveromyces marxianus* KM for efficient hydrolysis of lactose. **Biochemical Engineering Journal**, v.76, p. 17-24, 2013.

## 5. CAPÍTULO II

### ARTIGO II – BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS A SER SUBMETIDO À REVISTA CERES - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA



1 **Diversidade e potencial tecnológico de bactérias ácido láticas de interesse em**  
2 **alimentos**

3

4 *Gabriela Alves de Araújo Fernandes<sup>2</sup>, Meire dos Santos Falcão de Lima<sup>3</sup>, Tatiana*  
5 *Pereira Shiu Lin Liu<sup>4</sup>, Elaine Cristina da Silva<sup>5</sup>, Bruno Simões Veloso<sup>6</sup>, Priscila*  
6 *Danielly Santos de Barros<sup>7</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>8</sup>, Maria Taciana Holanda*  
7 *Cavalcanti<sup>9</sup>*

8

9 **RESUMO**

10 O queijo de Coalho é um produto típico do nordeste brasileiro e muito  
11 consumido. Sua microbiota é composta principalmente por bactérias ácidos láticas que  
12 contribuem significativamente para as características organolépticas do produto final.  
13 Essas bactérias produzem diversos metabólitos com aplicabilidade industrial,

<sup>1</sup>Este trabalho é parte da dissertação de mestrado da primeira autora com fonte financiadora da FACEPE e CNPq

<sup>2</sup>Bióloga, Mestre. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. (81) 3320-6345. gabrielaaaf@gmail.com (autora para correspondência).

<sup>3</sup>Licenciada em Biologia, Mestre. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. meirefalcão19@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Bióloga, Bacharela. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. tatiliu@hotmail.com

<sup>5</sup>Bióloga, Estudante de Graduação. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>6</sup>Biólogo, Bacharel. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. polyanna.nunes@bol.com.br

<sup>7</sup>Licenciada em Biologia, Estudante de Graduação. Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>8</sup>Licenciada em Química, Doutora. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. analuporto@yahoo.com.br

<sup>9</sup>Médica Veterinária, Doutora. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede – Recife, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. mtcvsoares@yahoo.com.br

14 principalmente na área de alimentos. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a  
15 diversidade e o potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de  
16 Coalho artesanal do Estado de Pernambuco visando sua aplicação na indústria de  
17 alimentos. No total foram isoladas 125 bactérias ácido lácticas, onde o gênero  
18 *Enterococcus* predominou entre os isolados (52,8%). Para as propriedades tecnológicas  
19 foram avaliados os seguintes parâmetros: capacidade acidificante, produção de diacetil,  
20 protease extracelular, e  $\beta$ -galactosidase intra e extracelular. A maioria das bactérias  
21 ácido lácticas demonstrou ter potencial tecnológico para aplicação na indústria  
22 alimentícia com a produção de diacetil, enzimas proteases e  $\beta$ -galactosidase.

23 **Palavras-chaves:** protease extracelular, diacetil, queijo de Coalho, bactérias ácido  
24 lácticas,  $\beta$ -galactosidase.

25

## 26 **ABSTRACT**

27 The Coalho cheese is a typical product of the Brazilian Northeast, widely  
28 consumed across country. The microbiota of Coalho cheese is mainly composed by  
29 lactic acid bacteria, which contribute significantly to the organoleptic characteristics of  
30 the cheese. These bacteria produce several metabolites with industrial applicability  
31 especially to foods. The aim of this study was to identify and assess the technological  
32 potential of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese from Agreste of  
33 the State of Pernambuco to applicability in the food industry. In total, were isolated 125  
34 lactic acid bacteria, and the genus *Enterococcus* predominate among the isolates  
35 (52.8%). For the technological properties the following parameters were evaluated:  
36 acidifying capacity, production of diacetyl, extracellular protease, extracellular and

37 intracellular  $\beta$ -galactosidase. Most of the lactic acid bacteria showed a great  
38 technological potential for application in the food industry.

39 **Key words:** extracellular protease, diacetyl, Coalho cheese, lactic acid bacteria and  $\beta$ -  
40 galactosidase.

41

## 42 INTRODUÇÃO

43 O queijo de Coalho é um produto típico e popular do Nordeste do Brasil, muito  
44 apreciado nesta região e em todo o território brasileiro. Esse queijo possui um sabor  
45 levemente salgado e ácido, é resistente ao calor, podendo ser consumido assado. É  
46 produzido principalmente nos Estados do Nordeste do Brasil, como Pernambuco, Rio  
47 Grande do Norte, Ceará e Paraíba. Representa uma considerável parcela da economia  
48 regional, sendo sua produção uma fonte significativa de renda para os produtores rurais  
49 (Silva et al., 2012a; Queiroga et al., 2013).

50 As bactérias ácido lácticas estão presentes nos derivados lácteos fermentados,  
51 inclusive no queijo de Coalho, e contribuem para as propriedades sensoriais destes  
52 produtos (Machado, 2011; Pogacic et al., 2013).

53 Estas bactérias são Gram-positivas, ácido-tolerantes, normalmente não  
54 esporulantes, catalase e oxidase negativas, e estão divididas em homofermentativas ou  
55 heterofermentativas. As homofermentativas são aquelas capazes de produzir unicamente  
56 ácido lático a partir da lactose, enquanto que as heterofermentativas produzem ácido  
57 lático, dióxido de carbono, etanol e demais compostos (González et al., 2010). Esses  
58 produtos do metabolismo microbiano contribuirão para o desenvolvimento de aroma,

59 textura, valor nutricional e preservação dos alimentos fermentados, e podem está  
60 associados a efeitos de promoção a saúde (Mills et al., 2011).

61 A importância das bactérias ácido lácticas refere-se à elevada diversidade de suas  
62 características fisiológicas e metabólicas, além das propriedades probióticas e  
63 tecnológicas (Silva et al., 2012b). Elas estão inseridas como micro-organismos GRAS  
64 (Generally Recognized As Safe), isto é, aqueles que não conferem risco a saúde de seus  
65 consumidores (Jacob et al., 2010). Sendo assim, elas possuem numerosas aplicações na  
66 indústria de alimentos, tais como, realçadoras das características organolépticas de  
67 produtos fermentados e proteção competitiva contra bactérias patogênicas que  
68 colonizam o trato gastrointestinal humano (Settanni & Moschetti, 2010).

69 As bactérias ácido lácticas são capazes de produzir compostos aromáticos  
70 voláteis, entre eles encontra-se o diacetil. Esse composto confere o aroma  
71 “amanteigado”, bem característico e bastante apreciado em derivados lácteos (Tavaria et  
72 al., 2006). A maior parte do diacetil encontrado nos produtos lácteos é formada através  
73 do processo de fermentação por ação de culturas iniciadoras utilizadas na fabricação do  
74 produto. Além disso, ainda pode atuar como coadjuvantes de diversos outros aromas  
75 agregando valor significativo no produto final (Rincon-Delgadillo et al., 2012).  
76 Entretanto, muitos outros metabólicos microbianos podem ser produzidos pelas  
77 bactérias ácido lácticas, por exemplo, enzimas. Tais substâncias podem ser aplicadas nas  
78 diversas indústrias (El-Ghaish et al., 2011).

79 As proteases são uma das classes de enzimas mais relevantes a nível industrial  
80 (González et al., 2010; Sundararajan et al., 2011). As enzimas proteolíticas produzidas  
81 por micro-organismos influenciam no processamento de produtos lácteos, pois a

82 proteólise é um processo bioquímico fundamental que interfere nas características  
83 organolépticas dos produtos, em especial, textura e aroma (Settanni & Moschetti, 2010).

84 Além disso, essas enzimas podem ser úteis na degradação de proteínas com  
85 potencial alergênico presente no leite de vaca, como é o caso das caseínas e  $\beta$ -  
86 lactoglobulina, assim tais enzimas atuam aumentando a digestibilidade e diminuindo o  
87 potencial alergênico presente no leite e seus derivados (Jacob et al., 2010).

88 A lactose é o açúcar do leite, e seu uso como ingrediente em produtos  
89 alimentícios é bastante limitado, devido sua baixa solubilidade, baixa doçura e alta  
90 incidência de indivíduos com intolerância à lactose (Vieira et al., 2013). A elevada  
91 concentração de lactose em produtos lácteos acarreta em uma textura granulada  
92 indesejável (Song et al., 2010). Além disso, a lactose provoca graves problemas no  
93 tratamento de efluentes das indústrias de leite, devido à sua baixa biodegradabilidade, a  
94 qual é responsável pelo aumento da demanda bioquímica de oxigênio (Novalin et al.,  
95 2005; Hatzinikolaou et al., 2005). Assim, as indústrias alimentícias buscam alternativas  
96 para minimizar ou solucionar essas eventualidades, e uma delas é a busca por micro-  
97 organismos promissores para produção de  $\beta$ -galactosidase, a enzima responsável por  
98 degradar a lactose, e sua aplicação para finalidades biotecnológicas (Zárate & Chaia,  
99 2012).

100 O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e o potencial tecnológico de  
101 bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal do Estado de Pernambuco  
102 visando sua aplicação na indústria de alimentos.

103

104 **MATERIAL E MÉTODOS**

105 As amostras de queijo de Coalho foram coletadas em unidades produtoras de  
106 três municípios da região Agreste do Estado de Pernambuco (Municípios de Arcoverde,  
107 Capoeiras e Venturosa), Brasil, no ano de 2011. Em seguida foram acondicionadas em  
108 sacos plásticos e caixa isotérmica contendo gelo, transportadas para o laboratório de  
109 Tecnologia de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco  
110 (UFRPE), onde foram isoladas e analisadas.

111 Para o isolamento, o queijo de Coalho artesanal foi subdividido aleatoriamente e  
112 macerado, em seguida 25g foi homogeneizado em 225 ml de citrato de sódio 2% (Vetec  
113 - Brasil). A seguir foram realizadas diluições seriadas até  $10^6$  e  $10^7$ , em solução de água  
114 peptonada esterilizada a 0,1% (Frank et al., 1992). As alíquotas foram plaqueadas em  
115 ágar APT (Himedia - Índia) nas temperaturas ideais de crescimento para bactérias ácido  
116 lácticas,  $30\pm 1^\circ\text{C}$  e  $37\pm 1^\circ\text{C}$  por 48h, onde as colônias foram selecionadas aleatoriamente  
117 através de características macroscópicas e repicadas duas vezes para assegurar sua plena  
118 purificação.

119 Os isolados foram submetidos a testes preliminares de identificação utilizando as  
120 seguintes técnicas: coloração de Gram, teste de catalase e crescimento em leite  
121 desnatado reconstituído (LDR) a 12% (Molico, Nestlé - Brasil).

122 A manutenção das culturas isoladas foi realizada sob a forma de estoque  
123 congelado, utilizando glicerol 20% e armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  e  $-80^\circ\text{C}$ .

124 A identificação de gênero foi realizada segundo Carvalho (2007) utilizando  
125 testes bioquímicos e fenotípicos, com base no crescimento das culturas nas seguintes  
126 condições: temperaturas de 10 e  $45^\circ\text{C}$ ; pH de 4,4 e 9,6; teor de NaCl 6,5%; e produção  
127 de  $\text{CO}_2$  a partir da glicose. Para uma confirmação do gênero *Streptococcus* foi realizado  
128 teste adicional de cultivo a  $60^\circ\text{C}$ .

129 Na verificação da produção do composto volátil diacetil as bactérias ácido  
130 lácticas foram reativadas em MRS caldo, em seguida inoculadas em leite UHT comercial  
131 (Parmalat, Garanhuns – PE), incubadas nas temperaturas ideais de cultivo por até 48h.  
132 Posteriormente foram submetidas à metodologia qualitativa colorimétrica descrita por  
133 Furtado (1940), que utiliza creatina 1% e hidróxido de sódio a 10N para avaliar a  
134 presença da produção do composto aromático diacetil, onde a alteração da cor do meio  
135 de cultivo para vermelho indica resultado positivo para produção de diacetil, com a  
136 intensidade da coloração mensurada numa escala de 0 a 3, onde “0” indica ausente, “1”  
137 fraco, “2” moderado e “3” forte.

138 Para a avaliação da capacidade acidificante as bactérias ácido lácticas foram  
139 reativadas três vezes, entretanto a última reativação foi por 18 h. A seguir as culturas  
140 foram centrifugadas a  $10.192 \times g$  por 10 min a 4 °C, e a massa celular lavadas com água  
141 peptonada estéril a 1%, inoculadas em leite integral UHT comercial (Parmalat,  
142 Garanhuns – PE) sendo avaliados 3 pontos: 0, 3 e 24 h. A atividade foi realizada  
143 segundo Franciosi et al. (2009) e a taxa de acidificação foi calculada de acordo com  
144 Ayad et al. (2004), onde as culturas classificadas como rápidas, médias ou lentas  
145 acidificantes, dependendo da capacidade deste para decair o pH inicial do leite em pelo  
146 menos 0,4 U após 3 h de fermentação. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

147 Para a seleção da melhor bactéria ácido láctica produtora de protease extracelular,  
148 as bactérias foram submetidas à metodologia descrita por Teixeira et al. (1996), a qual  
149 consiste num método qualitativo realizado em placa, utilizando leite 1 %, gelatina 0,5 %  
150 e ágar 1,5 %, onde o sobrenadante metabólico (100µl) do micro-organismo é inoculado  
151 em um poço no centro da placa por 18h a temperatura de  $30 \pm 1$  °C. Em caso positivo de  
152 atividade forma-se um halo translúcido, o qual deve ser mensurado com o auxílio de

153 paquímetro, e em caso negativo, nenhum halo é formado. Foram consideradas boas  
154 produtoras, aquelas que apresentaram halo  $\geq 5$  mm.

155 Enquanto para a produção e determinação de atividade proteásica, apenas foram  
156 utilizadas as bactérias que foram as melhores produtoras na seleção. E m seguida essas  
157 bactérias foram submetidas a cultivo estático em meio APT caldo nas condições ideais  
158 de temperaturas para cada isolado ( $30\pm 1^\circ\text{C}$  e  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 h. Após esse período, as  
159 culturas foram centrifugadas a  $10.192 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante extracelular  
160 foi congelado e armazenado para análises futuras. A atividade proteásica foi  
161 determinada de acordo com Leighon & Doi (1973), onde uma unidade de atividade foi  
162 definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,1 na densidade  
163 óptica em 1 hora a 440 nm.

164 Para a produção e determinação de  $\beta$ -galatosidase extracelular e intracelular, as  
165 bactérias foram inoculadas em soro de leite de vaca obtido a partir da fabricação do  
166 queijo de Coalho artesanal, na proporção 1/9 (v/v). A incubação foi estática, com a  
167 temperatura ótima para cada isolado ( $30\pm 1^\circ\text{C}$  ou  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 48 h. Após esse período,  
168 as culturas foram centrifugadas a  $10.192 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ , e o sobrenadante  
169 extracelular foi congelado e armazenado para análises futuras.

170 A massa celular precipitada durante a centrifugação foi tratada para obtenção do  
171 material intracelular através da lise celular por ultrassom (Ultrasonic Clean – Unique  
172 1600A) por 1 h a  $4^\circ\text{C}$ , com posterior centrifugação realizada nas condições anteriores  
173 mencionadas. O sobrenadante obtido a partir da massa celular foi congelado para a  
174 avaliação da  $\beta$ -galactosidase intracelular.

175 A determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase foi realizada segundo os  
176 procedimentos descritos no Food Chemical Codex (National Academy of Sciences,  
177 2005). O substrato cromogênico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG - Sigma) foi  
178 dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,05 M. A quantidade de substrato e enzimas  
179 utilizados foi 2 mL e 0,5 mL, respectivamente. No tempo zero, 0,5 mL da solução  
180 enzimática foi adicionada à solução de ONPG e incubada por 15 min. O ensaio foi  
181 parado com adição de 0,5 mL de carbonato de sódio a 10% e a absorbância determinada  
182 a 420 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1mM do  
183 o-nitrofenol do ONPG por minuto sob as condições deste ensaio. Todos os  
184 experimentos foram realizados em duplicata.

185

## 186 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

187 No total foram isoladas 125 bactérias ácido lácticas de três queijos de Coalho  
188 artesanal provenientes da região Agreste de Pernambuco, sendo 15 referentes ao queijo  
189 do Município Capoeiras (12%), 28 no queijo do Município Arcoverde (22,4%) e 82 no  
190 queijo do Município Venturosa (65,6%).

191 A identificação bioquímica revelou a diversidade da microbiota de bactérias  
192 ácido lácticas presente no queijo de Coalho artesanal, com predominância de cocos,  
193 sendo *Enterococcus* (52,8%) o gênero mais encontrado, *Streptococcus* (17,6%),  
194 *Leuconostoc* (2,4%) e *Lactococcus* (1,6%), e por fim, *Lactobacillus* (8,8%), entretanto  
195 16,8% dos isolados não foram identificados, devido suas características atípicas.

196 Os resultados de identificação corroboram com os obtidos por Carvalho (2007) e  
197 Cavalcante (2007), os quais relatam a predominância de representantes *cocos* de

198 bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho. A diversidade de espécies dessas  
199 bactérias é influenciada pela natureza do material onde estas se encontram inseridas,  
200 como reporta Bissonnette et al. (2000) e Malek et al. (2012), assim o tipo do queijo  
201 pode inferir determinada prevalência de um gênero específico de bactérias ácido lácticas.

202 O gênero *Enterococcus* foi o mais representativo entre as bactérias ácido lácticas  
203 isoladas, este resultado está de acordo com o relatado por Freitas (2011) e Carvalho  
204 (2007), onde constatou-se a prevalência deste gênero em queijo de Coalho. Além disso,  
205 o gênero *Enterococcus* tem sido frequentemente relatado com integrante da microbiota  
206 láctea de queijos artesanais brasileiros (Guedes Neto, 2004; Cavalcante et al., 2007) e de  
207 diversos queijos espalhado pelo mundo (Golic et al., 2013; Saxer et al., 2013; Pangallo  
208 et al., 2014). Isto é possível devido a sua elevada capacidade de adaptação às condições  
209 desfavoráveis de crescimento e resistência (Carvalho, 2007).

210 O gênero *Streptococcus* apresentou a segunda maior representação dentre as  
211 bactérias ácido lácticas, tais resultados estão de acordo com as atividades de Carvalho  
212 (2007), o qual encontrou representações percentuais muito representativas deste gênero.

213 Embora o gênero *Lactococcus* tenha apresentado a menor representação  
214 percentual, ele é extremamente desejável na produção de queijos, pois confere ao  
215 produto sabor e aroma característico. Todavia os resultados obtidos nesse estudo estão  
216 diferentes dos relatados por Guedes Neto (2004), que verificou a grande incidência  
217 deste gênero em queijos artesanais, e também dos resultados de Ayad et al. (2004) que  
218 apresentou o gênero como predominante entre as bactérias ácido lácticas selvagens  
219 isoladas de produtos lácteos tradicionais.

220 Apesar da baixa habilidade acidificante e proteolítica o gênero *Leuconostoc*, este  
221 também contribui para produção de derivados lácteos, sendo utilizado como  
222 coadjuvantes para produção de aromas (Hassan & Frank, 2001). Os resultados obtidos  
223 para *Leuconostoc* estão de acordo com os relatos de Badis et al. (2003), onde este  
224 gênero apresentou a menor representação percentual entre as bactérias lácticas isoladas a  
225 partir de leite de cabra cru da Argélia. Os relatos de Freitas (2011) também infere que  
226 este gênero corresponde à minoria dos isolados em produtos lácteos.

227 Os resultados para a produção de diacetil foram satisfatórios, pois 98 bactérias  
228 ácido lácticas (78,4%) foram capazes de produzir tal composto, sendo 11 (8,8%) fortes  
229 produtoras desta substância, 42 (33,6%) produtoras moderadas e 45 (36%) fracas  
230 produtoras, entretanto 27 (21,6%) não foram capazes de produzir o composto aromático  
231 em quantidades suficientes para a detecção pelo método de escolha.

232 Para a indústria de alimentos o composto diacetil é bem apreciado na  
233 fermentação de laticínios. Em geral, cepas de *Lactococcus* são bastante utilizadas para  
234 produzir diacetil, e conseqüentemente aprimoram as características de produtos lácteos  
235 (Passerini et al., 2013). Contudo, outras cepas podem ser utilizadas com maior  
236 eficiência, por este motivo muitos pesquisadores buscam novas fontes microbianas. E  
237 como neste trabalho verificou-se que as melhores produtoras de diacetil foram  
238 *Enterococcus*, logo se pode afirmar que fontes microbianas diferentes das tradicionais  
239 podem ser mais eficientes para aplicação industrial.

240 Segundo Passerini et al. (2013) a capacidade de cepas ambientais em produzir  
241 compostos aromáticos depende de fatores genéticos e fisiológicos inerentes a cada

242 micro-organismo, o que impulsiona ainda mais a busca pelo melhor micro-organismo  
243 para cada finalidade industrial específica.

244 Para a avaliação da capacidade acidificante foram selecionadas aleatoriamente  
245 75 bactérias ácido lácticas (60%). Foram contempladas todos os exemplares do queijo  
246 de Coalho artesanal do Município de Arcoverde e Capoeiras, entretanto apenas 32  
247 isolados do queijo do Município Venturosa foram avaliados.

248 Segundo Ayad et al. (2004), as bactérias ácido lácticas são consideradas rápidas  
249 acidificantes quando conseguem reduzir o pH inicial do leite em pelo menos 0,4U com  
250 apenas 3h de fermentação. Assim, os resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir  
251 que a maioria das bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal  
252 demonstrou um perfil de rápida acidificante (96%) produzindo grande quantidade de  
253 ácido láctico nas primeiras horas de fermentação, apenas 5 (4%) foi considerada lenta.  
254 O isolado mais promissor para esta atividade foi o N° 40, Venturosa, *Lactobacillus* sp.,  
255 que reduziu o pH do leite em 1,68U em 3h de fermentação.

256 Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Silva (2010), o qual utilizou  
257 *Streptococcus thermophilus* como um padrão de rápida acidificação, sendo este capaz  
258 de reduzir o pH em 1,07U em 3:10h de fermentação.

259 Para a fabricação de produtos lácteos, dois fatores devem ser levados em  
260 consideração na formulação final do produto. O primeiro é a velocidade de acidificação  
261 e o segundo remete-se a intensidade de produção de ácidos (Maurício, 2003), isso  
262 porque, segundo Albenzio et al. (2001), a atividade acidificante de cada cepa está  
263 relacionada com sua capacidade específica para quebrar as substâncias no meio e torná-  
264 las assimiláveis. Portanto, as bactérias ácido lácticas rápidas acidificantes têm potencial

265 tecnológico como culturas iniciadoras (*starters*), pois a acidez é essencial para que  
266 ocorra a coagulação do leite, redução de micro-organismos patogênicos e deteriorantes  
267 (Ayad et al., 2004; Cizeikiene et al. 2013; Settanni et al., 2013), conservação do  
268 fermentado (El-Ghaish et al., 2011), características organolépticas adequadas (Queiroga  
269 et al., 2013). Todavia as bactérias ácido lácticas com atividade lenta podem ser utilizadas  
270 como culturas secundárias para equilibrar o teor de umidade do leite e seus derivados  
271 (Crow et al., 2001).

272         Em relação à seleção do melhor micro-organismo para produção de protease  
273 extracelular, 114 isolados obtiveram resultado positivo (91,2%) e apenas 11 (8,8%) não  
274 foram capazes de produzir a atividade. Sendo que, 37 dos isolados (29,6%) foram  
275 enquadradas como boas produtoras de protease extracelular em placa, logo tais bactérias  
276 demonstram um excelente potencial para aplicação industrial. A melhor produtora foi a  
277 bactéria N° 145 isolada do queijo de Coalho do Município Venturosa, *Enterococcus* sp.,  
278 que alcançou um halo de 100 mm.

279         Na Tabela 1 encontram-se dispostos os resultados obtidos para a produção de  
280 protease extracelular pelas melhores bactérias ácidos lácticas isoladas de queijo de  
281 Coalho artesanal do Agreste de Pernambuco sob cultivo em meio APT caldo por 48h.  
282 Onde se pode observar que a produção variou entre o  $24,45 \pm 0,49$  a  $34,17 \pm 0,43$ U/ml,  
283 tendo o isolado N° 6 do queijo de Coalho do Município Capoeiras, *Enterococcus* sp.,  
284 alcançado a maior atividade.

285         Esses resultados são inferiores aos relatados por Sundararajan et al. (2011) que  
286 trabalhou com *Bacillus cereus* VITSN04 em cultivo de ágar nutritivo por 48h obtendo  
287 uma atividade máxima de  $167,07 \pm 0,38$ U/ml. Entretanto, constatou que a produção de

288 protease também sofre influencia do meio de cultura, quando utilizou o mesmo isolado  
289 em diversos outros meios e as atividades foram as seguintes: nutriente  
290 (167,07±0,3U/ml), malte (136,1±0,7U/ml), extrato de levedura (197±0,4U/ml), e extrato  
291 de carne (143,8±0,9L/ml). Assim deve-se procurar selecionar o meio de cultivo mais  
292 promissor para cada aplicabilidade desejada.

293 Na Tabela 2 estão os melhores resultados obtidos para a produção de  $\beta$ -  
294 galactosidase extracelular e intracelular por bactérias ácido lácticas cultivadas em soro de  
295 leite por 48h. Pode-se observar que a produção de  $\beta$ -galactosidase por bactérias ácido  
296 lácticas foi baixa. A maior atividade foi obtida pelo isolado N° 182, Venturosa,  
297 *Streptococcus* sp., o qual obteve 8,5±0,13U/ml.

298 Estes resultados diferem dos obtidos por Hsu et al. (2007) que relatou atividade  
299 máxima de 36,75U/ml, após 10h de cultivo utilizando *Bifidobacterium longum* sob  
300 biorreator, entretanto otimizou seu meio de cultivo com condições de temperatura, pH e  
301 agitação, comprovando que estes fatores alteram a produção de  $\beta$ -galactosidase. Ustok  
302 et al. (2010) também constatou as influências desses fatores sob a produção de  $\beta$ -  
303 galactosidase quando trabalhou com *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* e  
304 *Streptococcus thermophilus*.

305

## 306 CONCLUSÃO

307 O queijo de Coalho demonstrou ser uma excelente fonte para o isolamento de  
308 bactérias ácido lácticas. Além disso, as propriedades tecnológicas obtidas de fontes  
309 microbianas, especialmente de micro-organismos GRAS, são cada vez mais atrativas,

310 tendo em vista a promoção do conceito de alimentos funcionais na atualidade, além do  
311 que, o uso frequente de bactérias ácido lácticas para a formulação de produtos lácteos  
312 promove características organolépticas apreciáveis.

313 O uso de soro de leite como um meio de cultivo pode ser uma excelente  
314 alternativa para reaproveitamento deste resíduo agroindustrial e proporcionar uma  
315 oportunidade para posterior transformação em produtos de consumo.

316

### 317 **AGRADECIMENTOS**

318 A equipe agradece a Fundação de Amparo á Ciência e Tecnologia do Estado de  
319 Pernambuco (FACEPE) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e  
320 Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Também agradece ao suporte técnico do  
321 Laboratório de Tecnologia de Bioativos (Labtecbio) e ao Laboratório de Biotecnologia  
322 no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq), ambos nas instalações da Universidade  
323 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 324 **REFERÊNCIAS**

325 Albenzio M, Corbo MR, Rehman SU, Fox PF, Angelis M, Corsetti A, Sevi A & Gobetti  
326 M (2001) Microbiological and biochemical characteristics of canestrato pugliese cheese  
327 made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. International  
328 Journal Food Microbiology, 67:35-48.

329 Alfonzo A, Ventimiglia G, Corona O, Gerlando RD, Gaglio R, Francesca N, Moschetti  
330 F & Settenni L (2013) Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of  
331 wheat flours. Food Microbiology, 36:343-354.

- 332 Ayad EHE, Verheul A, Wouters JTM & Smit G (2000) Application of wild starter  
333 cultures for flavor development in pilot plant cheese making. *International Dairy*  
334 *Journal*, 10:169-179.
- 335 Badis A, Guetarni D, Moussa-Boudjemâa B, Hennic DE, Tornadijod ME & Kihal M  
336 (2003) Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's  
337 milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21:343-349.
- 338 Bissonnette F, Labrie S, Deveau H, Lamoureux M, Moineau S. (2000) Characterization  
339 of mesophilic mixed start cultures used for the manufactura of aged Cheddass cheese.  
340 *Journal Dairy Science*, 83:620-627.
- 341 Cavalcante JFM, Andrade NJ, Furtado MM, Ferreira CLLF, Pinto CLO & Elard E  
342 (2007) Processamento do queijo de coalho regional empregando leite pasteurizado e  
343 cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:205:214
- 344 Carvalho JDG (2007) Caracterização da microbiota láctica de queijo de Coalho artesanal  
345 produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. Tese de Doutorado.  
346 Universidade de São Paulo, São Paulo, 154p.
- 347 Cizeikiene D, Joudeikiene G, Paskevicius A & Bartkiene E (2013) Antimicrobial  
348 activity of lactic bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from  
349 food and their control in the bread. *Food Control*, 31:539-545.
- 350 Crow V, Curry B & Hayes M (2001) The ecology of non-starter lactic acid bacteria  
351 (NSLAB) and their use as adjuntas in New Zealand Cheddar. *International Dairy*  
352 *Journal*, 11:275-283.

- 353 El-Ghaish S, Ahmadova A, Hadji-Sfazi I, Mechrifi KEE, Bazukyan I, Choiset Y,  
354 Rabesona YCH, Sitohy Mahmoud, Popov YG, Kuliev AA, Mozzi F, Chobert JM &  
355 Haertlé T (2011) Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and  
356 for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology*,  
357 22:509-516.
- 358 Franciosi E, Settanni L, Cavazza A, Poznanaki E (2009) Biodiversity and technological  
359 potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal*,  
360 19:3-11.
- 361 Frank JF, Christen GL & Bullerman LB (1992) Test for groups of microorganisms. In:  
362 Marshall RT *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16<sup>a</sup> ed.  
363 Washington: American Public Health Association, p.271-286.
- 364 Freitas WC (2011) Aspectos higiênicos-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica  
365 de leite cru, queijo de coalho e soro de leite produzido no Estado da Paraíba. Tese de  
366 Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 91p.
- 367 Furtado MM (1990) *A arte e a ciência do queijo*. Editora Globo, São Paulo, 296p.
- 368 Guedes Neto LG. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e*  
369 *identificação de *Staphylococcus* spp. e de bactérias acidoláticas e de sua atividade*  
370 *antagonista in vitro* (2004) *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas  
371 Gerais, Belo Horizonte, 94p.
- 372 Golic N, Cadez N, Terzic-Vidojevic A, Suranka H, Beganovic J, Lozo J, Kos B,  
373 Suskovic J, Raspor P & Topisirovic L (2013) Evaluation of lactic acid bacteria and  
374 yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain

- 375 regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food*  
376 *Microbiology*, 166:294–300.
- 377 González L, Sacritán N, Arenas R, Fresno JM & Tornadijo ME (2010) Enzymatic  
378 activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional  
379 Spanish cheese. *Food Microbiology*, v. 27, p. 592-597, 2010.
- 380 Harju M, Kallioinen H & Tossavainen O (2012) Lactose hydrolysis and other  
381 conversions in dairy products: technological aspects. *International Dairy Journal*, 22,  
382 104–109.
- 383 Hassan NA & Frank JF (2001) Starter cultures and their use. In: Marth EH & Steele JL.  
384 *Applied Dairy Microbiology*. New York. 151-206
- 385 Hatzinikolaou DG, Katsifas E, Mamma D, Karagouni AD, Christakopoulos P & Kekos  
386 D (2005) Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by  
387 a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering*  
388 *Journal*, 24:161–172
- 389 Hsu CA, Yu RC, Lee SL & Chou CC (2007) Cultural condition affecting the growth  
390 and production of  $\beta$ -galactosidase by *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 in a jar  
391 fermenter. *International Journal of Food Microbiology*, 116:186-189
- 392 Jacob CM, Oliveira LC, Goldberg AC, Okay TS, Gushken AKF, Watanabe L, Castro  
393 APM, Formin ABF & Pastorino AC (2010) Polimorfismo de interleucina 10 e  
394 persistência da alergia ao leite de vaca. *Revista brasileira de alergia e imunopatologia*,  
395 33:93-98.

- 396 Leighton TJ & Doi RH (1973) The relationship of serine protease activity to RNA  
397 polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular  
398 Biology, 76:103-122.
- 399 Machado TF, Borges MF, Porto BC, Souza CT & Oliveira FEM (2011) Interferência da  
400 microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus coagulase positiva*. Revista  
401 Ciência Agronômica, 42:337-341, 2011.
- 402 Malek R, El-Attar A, Mohamed M, Anwar S, El-Soda M & Béal C (2012)  
403 Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated  
404 from two Egyptian cheeses, “Ras” and “Domiaty”. International Journal of Food  
405 Microbiology, 153:314-322.
- 406 Mauricio A. (2003) Personalidade laticinista Saco Brasil. Campinas, 4p. (Boletim de  
407 Tecnologia de Laticínio)
- 408 Mills S, Ross RP, Hill C, Fitzgerald GF & Stanton C (2011) Milk intelligence: Mining  
409 milk for bioactive substances associated with human health. International Dairy Journal,  
410 21:377-401.
- 411 Novalin S, Neuhaus W & Kulbe DK (2005) A new innovative process to produce  
412 lactose-reduced skim milk. Journal of Biotechnology, 119:212–218
- 413 Pangallo D, Sakoxa N, Korenova J, Puskarova A, Krakova L, Valik L & Kuchta T  
414 (2014) Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese.  
415 International Journal of Food Microbiology, 70:38-43.
- 416 Passerini D, Laroute V, Coddeville M, Bourgeois PL, Loubière P, Ritzenthaler P,  
417 Coccagn-Bousquet M, Daveran-Mingot ML (2013) New insights into *Lactococcus*

- 418 *lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. International  
419 Journal of Food Microbiology, 160:329–336.
- 420 Pogacic T, Mancini A, Santarelli M, Bottari B, Lazzi C, Neviani E & Gatti M (2013)  
421 Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard  
422 cheese produced from raw milk and undefined natural start. Food Microbiology,  
423 36:207-215.
- 424 Queiroga RCRE, Santos BM, Gomes AMP, Monteiro MJ, Teixeira SM, Souza EL,  
425 Pereira CJD & Pintado MME (2013) Nutritional, textural and sensory properties of  
426 Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and*  
427 *Technology*, 50:538-544.
- 428 Rincon-Delgado MI, Lopez-Hernandez A, Wijaya I & Rankin SA (2012) Diacetyl  
429 levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods.  
430 Journal of Dairy Science, 95:1128-1139.
- 431 Saxer S, Schwenninger MS & Lacroix (2013) Characterization of the microflora of  
432 Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. *LWT – Food Science*  
433 *and Technology*, 53:314-320.
- 434 Settanni L & Moschetti G (2010) Non-starter lactic acid bacteria used to improve  
435 cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27:691-697.
- 436 Settanni L, Gaglio R, Guarcello R, Francesca N, Carpino S, Sannino C, Todaro M  
437 (2013) Selected lactic acid bacteria as a hurdle to the microbial spoilage of cheese:  
438 Application on a traditional raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, v.  
439 32:126-132.

- 440 Silva LF (2010) Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo  
441 mussarela de búfala. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, São  
442 Paulo, 153p.
- 443 Silva K & Bolini HMA (2006). Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto  
444 de soro ácido de leite bovino. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:116-122.
- 445 Silva RA, Bismara PA, Moura RB, Lima-Filho JL, Porot ALF & Cavalcanti MTH  
446 (2012a) Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na  
447 região Agreste do estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*  
448 *Zootecnia*, 64:1732-1738.
- 449 Silva RA, Lima MSF, Viana JBM, Bezerra VS, Pimentel MCB, Porto ALF, Cavalcanti  
450 MTH & Lima-Filho JL (2012b) Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern  
451 Brazil be used as a functional food? *Food Chemistry*, 135:1533–1538.
- 452 Song C, Guang-Lei L, Jin-Li X & Zhen-Ming Chi (2010) Purification and  
453 characterization of extracellular beta-galactosidase from the psychrotolerant yeast  
454 *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antartica. *Process*  
455 *Biochemistry*, 45:954-960.
- 456 Sundararajan S, Kannan CN & Chittibabu S (2011) Alkaline protease from *Bacillus*  
457 *cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing gent. *Journal of Bioscience and*  
458 *Bioengineering*, 111:128-133.
- 459 Tardioli (2013) Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by  $\beta$ -galatósídase from  
460 *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochemical*  
461 *Engineering Journal*, 81:54-64.

462 Tavaría F, Silva-Ferreira AC & Malcata FX (2006) Contribution of wild strains of lactic  
463 acid bacteria to the tropical aroma of na artisanal cheese. *Developments in Food*  
464 *Science*, 43:129-132.

465 Teixeira MFS, Fernandes OCC, Herrera AM & Durán N (1996) Determinação  
466 qualitativa de proteases: métodos de cup-plate modificado. *Revista UFAM Série:*  
467 *Ciências da Saúde*, 4/5: 39-45.

468 Ustoc FI, Tari C & Harsa S (2010) Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -  
469 galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. *Food*  
470 *Chemistry*, 119:1114-1120.

471 Vieira DC, Lionete NL, Mendes AA, Adriano WS, Giodano RC, Giordano RLC,  
472 Zárte G & Chaia AP (2012) Influence of lactose and lactose on growth and  $\beta$ -  
473 galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionini*.  
474 *Anaerobe*, 18:25-30.

475

476

477

478

479

480

481

482

483 **Tabela 1.** Produção de protease extracelular por bactérias ácidos lácticas cultivadas em  
 484 APT caldo por 48h

Nº	Município	Identificação	Produção de protease (U/ml)
20	Arcoverde	<i>Enterococcus</i>	27,12±0,71
56	Arcoverde	<i>Enterococcus</i>	23,83±1,17
69	Arcoverde	<i>Enterococcus</i>	28,83±0,48
3	Capoeiras	<i>Enterococcus</i>	32,58±0,82
6	Capoeiras	<i>Enterococcus</i>	34,17±0,43
8	Capoeiras	<i>Streptococcus</i>	30,41±0,35
28	Venturosa	<i>Enterococcus</i>	28,78±0,16
38	Venturosa	<i>Streptococcus</i>	24,45±0,49
69	Venturosa	<i>Streptococcus</i>	25,9±1,96
86	Venturosa	<i>Enterococcus</i>	25,95±0,67
119	Venturosa	<i>Enterococcus</i>	29,41±0,52
168	Venturosa	Atípica	29,49±0,57

485

486

487

488 **Tabela 2.** Atividade de  $\beta$ -galactosidase extracelular e intracelular produzida por  
 489 bactérias ácido lácticas cultivadas soro de leite por 48h

Nº	Município	B-galactosidase Ácida (U/ml)		B-galactosidase Neutra (U/ml)	
		Extracelular	Intracelular	Extracelular	Intracelular
30	Arcoverde	0,6±0,07	0,1±0,08	7,6±0,14	2,3±0,29
40	Arcoverde	0,4±0,04	0,2±0,09	7,7±0,3	3,8±0,18
44	Arcoverde	0,5±0,06	0,5±0,15	7±0,09	3,8±0,26
61	Venturosa	0,6±0,18	0,1±0,02	7,8±0,11	2,9±0,39
69	Venturosa	0,5±0,21	0,3±0,09	8,2±0,5	3,1±0,22
86	Venturosa	0,3±0,05	0,1±0,04	7,4±0,38	3±0,14
129	Venturosa	0,7±0,03	0,3±0,12	7,5±0,2	3,9±0,15
133	Venturosa	0,1±0,04	0,1±0,03	7,4±0,36	2,4±0,31
141	Venturosa	0,9±0,1	0,2±0,06	7,4±0,3	1,9±0,11
178	Venturosa	0,5±0,08	0,3±0,07	8,1±0,27	3,1±0,34
182	Venturosa	0,4±0,15	0,2±0,03	8,5±0,13	2,7±0,23

490

491

492

## 6. CAPÍTULO III

### ARTIGO II – LEVEDURAS A SER SUBMETIDO À REVISTA CERES - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA





17 Observou-se a produção de protease e  $\beta$ -galactosidase, as maiores atividades foram  
18 alcançadas por *Galactomyces geotrichum* (L1) que obteve  $120,58 \pm 1,2$  U/mL e *Candida*  
19 *versatilis* (L4) que produziu  $33,85 \pm 0,3$  U/mL, respectivamente. Para produção de  
20 diacetil, *Pichia minuta* (L8) demonstrou o resultado mais significativo com produção de  
21 intensidade moderada do aroma. Pode-se concluir que as leveduras isoladas de queijo de  
22 Coalho artesanal possuem um excelente potencial para a aplicação biotecnológica no  
23 ramo alimentício e não são capazes de comprometer a saúde do consumidor.

24 **Palavras-chave:** queijo de Coalho, leveduras, potencial biotecnológico, diacetil,  
25 protease,  $\beta$ -galactosidase.

26

## 27 **ABSTRACT**

28 The “Coalho cheese” is a typical product of Northeastern Brazil. Their  
29 microbiota is well diversified and well studied. Yeasts make up the secondary  
30 microbiota of the “Coalho cheese”, and provide organoleptic characteristics to the  
31 product, and they may still have technological potential for application in the food  
32 industry. The objective of this study was to isolate, identify and assess the technological  
33 potential of yeasts obtained from artisanal “Coalho cheese” from state of Pernambuco  
34 (City Arcoverde, Capoeiras and Venturosa), Brazil. In total, 15 yeasts were isolated.  
35 The genus *Candida* predominated with a representation of 46,66%. To the technological  
36 potential were evaluated proteolytic activities,  $\beta$ -galactosidase and production of aroma  
37 diacetyl. *Galactomyces geotrichum* (L1) was the best producer of protease,  $120,58 \pm 1,2$   
38 U/mL. A sample of *Candida versatilis* (L4) was the best to the activity of  $\beta$ -  
39 galactosidase,  $33,85 \pm 0,3$  U/mL. *Pichia minuta* (L8) was obtained an average result to

40 the production of aroma diacetyl. The results showed that yeasts isolated from artisanal  
41 Coalho cheese have satisfactory technological potential to the application in foods.

42 **Key words:** Coalho cheese, yeasts, biotechnological potential, diacetyl, protease,  $\beta$ -  
43 galactosidase.

44

## 45 **INTRODUÇÃO**

46 Em geral, as bactérias ácido lácticas representam o principal grupo de micro-  
47 organismos associados a produtos lácteos, principalmente queijos (Fleet 1990; Loureiro  
48 & Querol, 1999; Vasdinyei & Deák, 2003). Entretanto, hoje em dia, também é bem  
49 conhecida a presença e influência das leveduras em queijos artesanais, pois elas  
50 desempenham grande importância no processo de maturação. Ainda contribuem para o  
51 desenvolvimento de características organolépticas, promovem particularidades ao  
52 produto, interagem com os demais micro-organismos, compondo a chamada microbiota  
53 secundária (Pereira-Dias et al., 2000; Lima et al., 2009; Gólic et al., 2013).

54 O queijo de "Coalho" artesanal é um produto que representa a verdadeira  
55 tradição e cultura típica da região Nordeste do Brasil, muito popular e amplamente  
56 consumido pela população local e de todo território brasileiro (Silva et al., 2012a).  
57 Produzido principalmente nos Estados do Nordeste: Pernambuco, Ceará, Rio Grande do  
58 Norte e Paraíba, sendo de muito valor para o desenvolvimento da economia local, além  
59 de uma boa fonte para o isolamento de micro-organismos com potencial industrial,  
60 inclusive leveduras (Almeida et al., 2010; Silva et al., 2012b).

61 O isolamento e identificação de novas fontes microbianas, não-tóxicas, é de  
62 grande interesse, e pode assegurar o fornecimento de biomoléculas a diversos processos  
63 industriais e promover o desenvolvimento de novos produtos no mercado (Machado et  
64 al., 2011).

65 Tradicionalmente, as leveduras são identificadas por critérios morfológicos e  
66 fisiológicos (Kreger-Van, 1984; Barnett, Payne & Yarrow, 2000), o que permite  
67 conhecer e compreender a microbiota de cada tipo de queijo. Os gêneros mais  
68 frequentemente isolados a partir de produtos lácteos são: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*,  
69 *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Trichosporon* e *Yarrowia* (Ramírez-Zavala et  
70 al., 2004; Lopandic et al., 2006).

71 O soro de leite (lactosoro) é o líquido residual da manufatura de queijos e obtido  
72 a partir da coagulação do leite. Possui um elevado rendimento, pois para se produzir  
73 1Kg de queijo, como o queijo de Coalho, necessita-se de 10L de leite bovino em média,  
74 o que resulta em torno de 9L de soro (Richards, 2002).

75 O lactosoro é visto sob dois aspectos bem distintos: agente de poluição, se  
76 descartado inadequadamente, devido sua alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)  
77 (Silva & Bolini, 2006), ou como produto nobre, devido suas propriedades nutricionais e  
78 funcionais (Canilha et al., 2006). E como atualmente a legislação ambiental está mais  
79 rígida, as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitamento desse  
80 subproduto, logo ele torna-se um substrato interessante para utilização em processos  
81 fermentativos industriais (Florêncio et al., 2013).

82 As leveduras são utilizadas para diversas aplicações industriais, ente elas,  
83 podemos citar a produção de enzimas de valor comercial, tais como, proteases e  $\beta$ -

84 galactosidase, além de aditivos alimentares (Oliveira et al., 2011; Sundararajanet et al.,  
85 2011).

86 As proteases de origem microbiana são as mais importantes enzimas hidrolíticas,  
87 pois elas não só desempenham um papel relevante nos processos metabólicos celulares,  
88 como também apresentam aplicações nos mais variados setores industriais, inclusive no  
89 processamento de alimentos para minimizar alergia ao leite de vaca (Jacob et al., 2010).  
90 Entretanto, essas enzimas estão em uso contínuo, e por isso, acabam não suprimindo a  
91 demanda do mercado, logo se faz necessária à busca por novos micro-organismos  
92 produtores de proteases (Sundararajanet et al., 2011).

93 A hidrólise enzimática da lactose utilizando a enzima  $\beta$ -galactosidase é um  
94 processo importante na indústria de laticínios, porque reduz os defeitos nos produtos  
95 lácteos em decorrência da cristalização desse carboidrato, além de, tornar o leite um  
96 alimento mais digestivo e menos alergênico, e conseqüentemente possibilitar o consumo  
97 deste, até mesmo por indivíduos intolerantes à lactose (Song et al., 2010; Hurju et al.,  
98 2012).

99 Além da produção de enzimas, as leveduras também são capazes de produzir  
100 diversos compostos aromáticos, por exemplo, o diacetil. A presença dessa substância é  
101 muito valorizada na indústria de laticínios, afinal esta confere tons amanteigados aos  
102 produtos, os quais são bastante apreciados (Rincon-Delgadillo et al., 2012).

103 Pelo exposto acima, o objetivo deste estudo foi isolar, identificar e avaliar o  
104 potencial biotecnológico de leveduras obtidas a partir de queijo de Coalho artesanal  
105 visando aplicação na indústria alimentícia.

106

## 107 MATERIAL E MÉTODOS

108

109

### *Coleta das amostras*

110 As amostras de queijo de Coalho foram coletadas em unidades produtoras de  
111 três municípios do Estado de Pernambuco (Município de Arcoverde, Capoeiras e  
112 Venturosa), Brasil, no ano de 2011. Em seguida acondicionada em sacos plásticos  
113 estéreis e caixa isotérmica contendo gelo, sendo transportadas para o Laboratório de  
114 Tecnologia de Bioativos (Labtecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco  
115 (UFRPE), onde foram processadas.

116

117

### *Isolamento e Manutenção das leveduras*

118 As amostras de queijo de Coalho foram maceradas e homogeneizadas em  
119 solução de citrato de sódio 2%, diluídas em água peptonada estéril até as concentrações  
120 de  $10^6$  e  $10^7$  g/mL, inoculadas em ágar Sabourand com antibiótico (tetraciclina  
121  $30\mu\text{g/mL}$ ) a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  por 48h, repicadas duas vezes para garantir a purificação das  
122 colônias. As leveduras foram mantidas em ágar Sabourand adicionado de extrato de  
123 levedura a  $28\pm 1^\circ\text{C}$ , sendo preservadas em óleo mineral, e em estoque congelado com  
124 glicerol a  $-20^\circ\text{C}$ .

125

126

### *Identificação das leveduras*

127 A identificação foi realizada segundo Barnett et al. (2000) através de testes  
128 bioquímicos e fenotípicos, foram eles: caracterização morfológica (macroscópica e  
129 microscópica), tipo de reprodução, hidrólise da ureia, assimilação e fermentação de

130 carboidratos (D-Glucose, D-Xilose, D-Arabinose, L-Rhaminose, maltose, sacarose,  
131 lactose, celobiose, rafinose e amido), produção de ácido acético, crescimento em  
132 diferentes temperaturas (25, 30, 35 e  $40\pm 1^\circ\text{C}$ ) e assimilação de sais (sulfato de amônio e  
133 nitrato de potássio).

134

### 135 *Verificação do potencial de patogenicidade*

136 Para a detecção de fosfolipase utilizou-se a metodologia descrita por Price et al.  
137 (1982) modificado, substituindo a lecitina de ovo por gema de ovo natural. As leveduras  
138 foram semeadas no centro de uma placa, e mantidas a temperatura ambiente,  $28\pm 1^\circ\text{C}$ ,  
139 por 10 dias para a verificação de formação de zona densa branca de precipitação em  
140 torno da colônia em caso positivo.

141 A verificação de urease foi realizada segundo Christensen (1946), onde as  
142 leveduras foram estriadas no meio específico a  $28\pm 1^\circ\text{C}$  por 6 dias. A hidrólise da ureia é  
143 verificada através de mudança na cor do meio, alterando de amarelo (controle negativo)  
144 para rosseo/avermelhado (positivo).

145 Utilizou-se a metodologia de Souza et al. (2008) para verificar a produção de  
146 amilase, onde as leveduras foram semeadas em meio contendo 1% de amido de milho  
147 (Maisena, Brasil) como fonte de carbono, por 5 dias a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ , reveladas com o auxílio  
148 de solução de iodo a 0,1N. Em caso positivo visualiza-se um halo translucido.

149 As leveduras ainda foram inoculadas em meio ágar Sabourand com antibiótico  
150 (tetraciclina  $30\mu\text{g/mL}$ ) a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (temperatura corporal humana normal) e  $28\pm 1^\circ\text{C}$   
151 (temperatura ambiente). O crescimento foi acompanhado por 4 dias. Além disso, foi

152 verificada a presença de clamidósporos, através do meio indutor bile de boi (Himidia -  
153 Índia), onde as leveduras foram crescidas a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 5 dias, em seguida foram  
154 preparadas lâminas coradas com azul de Amman e submetidas a microscopia óptica.

155

#### 156 *Avaliação das propriedades biotecnológicas*

157 Para a produção do composto volátil diacetil, as leveduras foram inoculadas em  
158 leite UHT comercial, incubadas a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por até 7 dias. Em seguida foram submetidas  
159 à metodologia colorimétrica descrita por Furtado (1940). A alteração da cor do meio de  
160 cultura para vermelho indica resultado positivo para produção de diacetil, com a  
161 intensidade da coloração mensurada de 0 a 3, onde “0” indica ausente, “1” fraco, “2”  
162 moderado e “3” forte.

163

#### 164 *Produção e determinação de protease extracelular*

165 As leveduras isoladas foram submetidas a uma seleção para identificar a melhor  
166 produtora de protease. O meio utilizado para este estudo foi o meio de soja, descrito por  
167 Porto et al. (1996) modificado pela retirada da glicose, adição de 1% leite desnatado e  
168 0,5% lactose.

169 O pré-inoculo (5 mL) foi realizado no mesmo meio de produção mencionado  
170 acima, em cultura estática a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, com padronização do inoculo em  $10^7$   
171 células/mL. Em seguida cada pré-inoculo foi adicionado em 25 mL de meio de soja  
172 modificado como descrito acima e incubados a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sob agitação (150 rpm), sendo  
173 retiradas alíquotas nos tempos: 0, 24, 48, 72, 96 e 120h, com posterior centrifugação a

174 10.192 *xg* por 5 minutos a 4 °C, para obtenção do sobrenadante livre de célula (extrato  
175 enzimático), que foi utilizado para a determinação da atividade proteásica. Em seguida,  
176 a melhor levedura foi cultivada em soro de leite, um subproduto da indústria queijeira,  
177 com padronização de inóculo  $10^7$  células/mL, 150 rpm, a  $30\pm 1$  °C por 48 horas, sendo  
178 retiradas alíquotas nos tempos 0 h, 24 h e 48 h, com posterior centrifugação nas  
179 condições citadas acima para obtenção do sobrenadante livre de célula (extrato  
180 enzimático), o qual foi utilizado para a determinação da atividade proteásica.

181 A atividade proteásica foi determinada de acordo com Leighon & Doi (1973).  
182 Neste ensaio, uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que  
183 produz um aumento de 0,1 na densidade óptica em 1 hora a 440 nm. Todos os  
184 experimentos foram realizados em duplicata.

185

#### 186 *Produção e determinação de $\beta$ -galactosidade*

187 As leveduras foram reativadas três vezes em Sabourand caldo, em seguida 10%  
188 de cada cultura foi inoculada em soro de leite de bovino obtido a partir da fabricação do  
189 queijo de Coalho artesanal. A incubação foi estática a  $30\pm 1$  °C por 48 horas.

190 Após esse período as culturas foram centrifugadas a 10.192 *xg* por 5 minutos a 4  
191 °C, e o sobrenadante extracelular foi congelado e armazenado para análises futuras.

192 A massa celular precipitada durante a centrifugação foi tratada para obtenção do  
193 material intracelular através da lise celular por ultrassom (Ultrasonic Clean – Unique  
194 1600A), por 1 h a 4 °C, com posterior centrifugação realizada nas condições anteriores  
195 mencionadas. O sobrenadante obtido a partir da massa celular foi congelado para a  
196 avaliação da  $\beta$ -galactosidase intracelular.

197 A determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase foi realizada segundo os  
198 procedimentos descritos no Food Chemical Codex (National Academy of Sciences,  
199 2005). O substrato cromogênico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG - Sigma) foi  
200 dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,05 M. A quantidade de substrato e enzimas  
201 utilizados foi 2 mL e 0,5 mL, respectivamente. No tempo zero, 0,5 mL da solução  
202 enzimática foi adicionada à solução de ONPG e incubada por 15 min. O ensaio foi  
203 parado com adição de 0,5 mL de carbonato de sódio a 10% e a absorbância determinada  
204 a 420 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1mM do  
205 o-nitrofenol do ONPG por minuto sob as condições deste ensaio. Todos os  
206 experimentos foram realizados em duplicata.

207

## 208 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

209 No total foram isoladas 15 leveduras, sendo 2 provenientes do queijo de Coalho  
210 artesanal do município de Venturosa (13,33%), 13 a partir do queijo produzido em  
211 Arcoverde (86,67%) e nenhum de Capoeiras. Essas leveduras compõem o acervo de  
212 micro-organismos isolados de queijo de Coalho artesanal do Laboratório de Tecnologia  
213 de Bioativos (LABTCBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

214 Os resultados obtidos para o isolamento, identificação e produção de diacetil  
215 encontram-se dispostos abaixo na Tabela 1. Onde se pode constatar o baixo número  
216 isolado de leveduras, entretanto este fato pode ser atribuído à competição por substratos  
217 (Viana et al., 2010) ou devido à alta incidência de bactérias ácido lácticas, uma vez que  
218 estas predominam em queijos frescos e o desenvolvimento das leveduras torna-se mais  
219 favorável ao longo do processo de maturação dos queijos (Corbo et al., 2001; Vasdinyei  
220 & Deák, 2003; Gólic et al., 2013).

221 O gênero mais encontrado foi *Candida* (46,66%), seguido por *Dekkera* e *Pichia*,  
222 ambos com 13,33% cada. Ainda foram identificados os gêneros *Debaryomyces*,  
223 *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Galactomyces*, 6,66% cada. Os resultados obtidos  
224 corroboram com Pereira-Dias (2000) e mais recentemente com Viana et al. (2010),  
225 ambos encontraram o gênero *Candida* como o mais frequentemente isolado em  
226 produtos de origem láctea.

227 Segundo Feitosa et al. (2003), o queijo de Coalho é uma ótima fonte para o  
228 isolamento de uma diversificada microbiota leveduriforme com potencial de  
229 aplicabilidade industrial.

230 A produção do composto volátil aromático diacetil foi maior na *Pichia minuta*  
231 (L8), que demonstrou uma capacidade classificada como moderada. Assim este isolado  
232 pode ser utilizado para a indústria de produtos lácteos pela possibilidade de formulação  
233 de aditivos alimentares (Hang & Woodams, 1993; Rincon-Delgadillo et al., 2012).

234 As análises realizadas para detecção de fatores de patogenicidade em leveduras  
235 estão dispostas na Tabela 2. Pois, para utilização de fontes microbianas na produção de  
236 compostos com propriedades biotecnológicas na indústria de alimentos exige-se que

237 esses micro-organismos não apresentem potencial patogênico aos consumidores do  
238 produto, isto é, não produzam micotoxinas ou outras substâncias tóxicas (Neves et al.,  
239 2006).

240 Os resultados permitem inferir que nenhuma das leveduras oferece risco a saúde  
241 humana, pois os dados disponíveis foram suficientes para classificá-las como não  
242 patogênicas, uma vez que é um necessário um conjunto de fatores para determinar tal  
243 potencial, por exemplo, capacidade de adesão, produção de fosfolipase, urease, amilase,  
244 crescimento a 37°C, presença de estrutura de resistência (clamidósporo) e adaptação  
245 morfológica às condições do hospedeiro (Mendes-Giannini et al., 1997; Midgley et  
246 al., 1998). Assim as leveduras isoladas podem ser exploradas para finalidades  
247 industriais e alimentícias.

248 Na produção de protease utilizando meio de soja, *Galactomyces geotrichum* (L1)  
249 apresentou a melhor atividade proteolítica,  $120,58 \pm 0,76$  U/mL em 24 h, e atingiu seu  
250 ponto máximo de produção com 120 h, tendo obtido  $169,33 \pm 0,9$  U/mL; a *Candida*  
251 *versatilis* (L6) obteve  $117,75 \pm 0,56$  U/mL em 120 h. Entretanto as demais leveduras não  
252 obtiveram resultados expressivos para garantir sua aplicação industrial com esta  
253 finalidade.

254 Os resultados para atividade proteolítica corroboram com os obtidos por Viana  
255 et al. (2010) que obteve uma produção de 573 U/mL após 48 h em meio de soja por  
256 *Candida buinensis* obtida a partir de leite cru proveniente da mesma região de onde as  
257 amostras de queijo de Coalho artesanal deste estudo foram coletadas. Assim as  
258 leveduras mostram-se uma alternativa para produção de proteases.

259 A melhor produtora de protease em meio de soja, *Galactomyces geotrichum*  
260 (L1), foi submetida a crescimento em soro de leite bovino. Os resultados obtidos neste  
261 experimento estão dispostos na Tabela 3. É possível constatar que a levedura foi capaz  
262 de crescer em soro do leite, houve a produção de protease, entretanto em menor valor  
263 quando comparado ao meio de soja.

264 As atividades de  $\beta$ -galactosidase obtidas a partir de leveduras isoladas de queijo  
265 de Coalho artesanal encontram-se dispostas na Tabela 4. Os resultados mais expressivos  
266 foram verificados no padrão extracelular e neutro. O melhor resultado para produção de  
267  $\beta$ -galactosidase foi obtido por *Candida versatilis* (L4)  $33,85 \pm 0,3$  U/mL; seguido por  
268 *Candida glabrata* (L2)  $27,25 \pm 0,6$  U/mL e *Candida glabrata* (L5) com  $25,43 \pm 0,4$  U/mL.  
269 O gênero *Candida* demonstrou ter grande aplicabilidade para esta finalidade.

270 Song et al. (2010) obteve 10,4 U/mL de atividade extracelular de  $\beta$ -  
271 galactosidase após 120 h por *Guehomyces pullulans* 17-1 isolada do sedimento oceânico  
272 da Antártida cultivada em meio YPD adicionado de glicose 2%, este resultado está  
273 abaixo dos resultados obtidos neste estudo. Assim como, os obtidos por Zhang et al.  
274 (2006), onde a produção de  $\beta$ -galactosidase extracelular por *Kluyveromyces lactis*  
275 Y34440 foi capaz de produzir apenas 1,9 U/mL em 48h.

276 As leveduras utilizadas neste trabalho se mostraram promissoras para aplicação  
277 industrial, com potencial para produzir substâncias de interesse comercial. Aliado a  
278 utilização do lactossoro, o qual se mostrou uma alternativa viável para meio de cultivo,  
279 o que representa para as indústrias diminuição de custos de produção e uma forma  
280 racional de aproveitamento deste resíduo, inclusive na formulação de novos produtos,

281 haja vista seu grande valor nutritivo e aceitação do público consumidor, como relata  
282 Guedes et al. (2013) e Siqueira et al. (2013).

283

## 284 **CONCLUSÕES**

285 As leveduras isoladas a partir do queijo de Coalho apresentaram aspectos  
286 biotecnológicos relevantes para sua aplicação a nível industrial, pois foram capazes de  
287 produzir diacetil, proteases,  $\beta$ -galactosidases e não comprometer a saúde do  
288 consumidor, logo elas demonstraram potencial para aplicação na indústria de alimentos,  
289 principalmente na formulação de produtos lácteos com características geográficas  
290 regionais, diferenciando-os dos demais produtos já disponíveis no mercado. Além disso,  
291 As atividades proteolítica e  $\beta$ -galactosidase podem ser utilizadas na produção de  
292 produtos lácteos hipoalergênicos e com maior digestibilidade.

293

## 294 **AGRADECIMENTOS**

295

296 A equipe agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de  
297 Pernambuco (FACEPE) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e  
298 Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Também agradece ao suporte técnico do  
299 Laboratório de Tecnologia de Bioativos (Labtecbio) e ao Laboratório de Biotecnologia  
300 no Centro de Apoio à Pesquisa (Cenapesq), ambos nas instalações da Universidade  
301 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

302

303 **Tabela 1.** Isolamento, identificação e produção de diacetil em leveduras obtidas a partir  
 304 de queijo de Coalho artesanal do Estado de Pernambuco.

Nº	Município	Identificação	Diacetil
L1	Venturosa	<i>Galactomyces geotrichum</i>	1
L2	Arcoverde	<i>Candida glabrata</i>	1
L3	Venturosa	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
L4	Arcoverde	<i>Candida versatilis</i>	0
L5	Arcoverde	<i>Candida glabrata</i>	0
L6	Arcoverde	<i>Candida versatilis</i>	1
L7	Arcoverde	<i>Pichia anômala</i>	0
L8	Arcoverde	<i>Pichia minuta</i>	2
L9	Arcoverde	<i>Candida versatilis</i>	1
L10	Arcoverde	<i>Debaryomyces hansenni</i>	1
L11	Arcoverde	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0
L12	Arcoverde	<i>Dekkera bruxellensis</i>	0
L13	Arcoverde	<i>Candida versatilis</i>	1
L14	Arcoverde	<i>Candida versatilis</i>	1
L15	Arcoverde	<i>Dekkera bruxellensis</i>	0

305 **Tabela 2.** Avaliação do potencial patogênico de leveduras obtidas de queijo de Coalho  
 306 do Estado de Pernambuco.

Nº	37°C	Urease	Fosfolipase	Amilase	Clamidósporo
L1	-	-	-	-	-
L2	+	-	-	-	-
L3	-	+	-	-	-
L4	+	-	-	-	-
L5	+	-	-	-	-
L6	+	-	-	-	-
L7	+	-	-	-	+
L8	-	+	-	-	+
L9	+	-	-	-	-
L10	+	-	-	-	+
L11	+	-	-	-	+
L12	+	-	-	-	-
L13	+	-	-	-	-
L14	+	-	-	-	-
L15	+	-	-	-	-

307 **Tabela 3.** Produção de protease e  $\beta$ -galactosidase por *Galactomyces geotrichum*  
 308 isolada de queijo de Coalho artesanal do Estado de Pernambuco por 48 h em soro de  
 309 leite.

<b>Atividades/Tempo</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
Protease (U/mL)	2,2 $\pm$ 0,26	8,1 $\pm$ 0,55	9,1 $\pm$ 0,43
$\beta$ -galactosidase Neutra Extra (U/mL)	2,5 $\pm$ 0,14	11,9 $\pm$ 0,09	14,4 $\pm$ 0,42
$\beta$ -galactosidase Ácida Extra (U/mL)	1,6 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,14	2,8 $\pm$ 0,07

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320 **Tabela 4.** Produção de  $\beta$ -galactosidase (U/mL) por leveduras obtidas de queijo de  
 321 Coalho artesanal de Pernambuco cultivadas em soro de leite bovino por 48h.

Nº	Neutra Extra	Neutra Intra	Ácida Extra	Ácida Intra
L1	11,59±0,2	10,64±0,09	1,98±0,04	1,93±0,22
L2	27,25±0,4	15,16±0,1	1,74±0,09	1,41±0,1
L3	5,27±0,23	2,11±0,14	0,76±0,05	1,31±0,04
L4	33,85±0,26	7,26±0,21	1,61±0,14	1,36±0,07
L5	25,43±0,45	17,53±0,3	2,09±0,11	1,78±0,12
L6	19,46±0,34	20,84±0,25	1,98±0,28	1,67±0,19
L7	17,28±0,33	18,9±0,65	1,47±0,07	1,65±0,08
L8	5,77±0,38	2,45±0,31	1,95±0,08	1,14±0,06
L9	12,57±0,25	7,36±0,43	2,4±0,12	1,77±0,06
L10	13,95±0,42	7,39±0,46	3,54±0,16	1,63±0,15
L11	14,47±0,53	4,61±0,24	1,48±0,17	1,53±0,27
L12	6,13±0,41	4,73±0,37	0,72±0,16	1,46±0,25
L13	8,04±0,37	8,17±0,4	1,68±0,34	1,8±0,09
L14	12,94±0,26	7,23±0,24	2,42±0,32	1,67±0,08
L15	13,15±0,46	5,99±0,6	2,16±0,3	1,97±0,03

322 **REFERÊNCIAS**

323 Almeida SL, Paiva Júnior FG & Guerra JRF (2010). A estratégia de internacionalização  
324 de negócios na perspectiva da tradução cultural: O caso da indicação geográfica no  
325 agronegócio. *Revista Ibero-Americana de Estratégia*, 9:74-97.

326 Barnett JA, Payne RW & Yarrow D (2000) *Yeast – Characteristics and Identification*,  
327 4<sup>o</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 811p.

328 Canilha C, Silva DDV, Carvalho W & Mancilha IM (2006) Aditivos alimentares  
329 produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica*,  
330 20:30-41.

331 Christensen WB (1946) Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and  
332 *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types. *Journal*  
333 *of Bacteriology*, 52:461–466.

334 Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M & Sinigaglia (2001) Occurrence and  
335 characterization of yeast isolated from milk and dairy products of Apulia region.  
336 *International Journal of Food Microbiology*, 69:147–152.

337 Feitosa T, Borges MF & Nassu RT (2003) Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e  
338 microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do  
339 Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia dos alimentos*, 23:162-165.

340 Fleet GH (1990). Yeasts in dairy products. *International Journal of Applied*  
341 *Bacteriology*, 68:199-211.

- 342 Florêncio IM, Florentino ER, Silva FLH, Martins RS, Cavalcanti MT & Gomes JP  
343 (2013) Produção de etanol a partir de lactossoro industrial. Revista Brasileira de  
344 Engenharia Agrícola e Ambiental, 17:1088-1092.
- 345 Furtado MM. (1990) A arte e a ciência do queijo. Editora Globo, São Paulo, 296p.
- 346 Golic N, Cadez N, Terzic-Vidojevic A, Suranka H, Beganovic J, Lozo J, Kos B,  
347 Suskovic J, Raspor P & Topisirovic L (2013) Evaluation of lactic acid bacteria and  
348 yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain  
349 regions of Serbia and lowland regions of Croatia. International Journal of Food  
350 Microbiology, 166:294–300.
- 351 Guedes AFLM, Machado ECL, Fonseca MC, Andrade SAS & Stamford TLM (2013)  
352 Aproveitamento de soro lácteo na formulação de bebidas com frutas e hortaliças.  
353 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 65:1321-1238.
- 354 Hang YD & Woodams EE (1993) Production of diacetyl reductase *Geotrichum*  
355 *candidum* from sauerkraut brine. Bioresource Technology, 43:181-183.
- 356 Hurju M, Kallionem H & Tossavainen O (2012) Lactose hydrolysis and other  
357 conversions in dairy products: Technological aspects. International Dairy Journal,  
358 22:104-109.
- 359 Jacob CM, Oliveira LC, Goldberg AC, Okay TS, Gushken AKF, Watanabe L, Castro  
360 APM, Formin ABF & Pastorino AC (2010) Polimorfismo de interleucina 10 e  
361 persistência da alergia ao leite de vaca. Revista brasileira de alergia e imunopatologia,  
362 33:93-98.
- 363 Kreger-van-Rij NJW (1984) The Yeast: a Taxonomic Study. Elsevier Science  
364 Publishers, Amsterdam, 1028p.

- 365 Leighton TJ & Doi RH (1973) The relationship of serine protease activity to RNA  
366 polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular  
367 Biology, 76:103-122.
- 368 Lima CDLC, Lima LA, Cerqueira MMOP, Ferreira EG & Rosa CA (2009) Bactérias do  
369 ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na  
370 região da Serra do Salitre, Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e  
371 Zootecnia, 61:266-272.
- 372 Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F & Prillinger H (2006)  
373 Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular  
374 techniques. Food Microbiology, 23:341-350.
- 375 Loureiro V & Querol A (1999) The prevalence and control of spoilage  
376 yeasts in foods and beverages. Trends in Food Science and Technology, 10:356-365.
- 377 Machado TF, Borges MF, Porto BC, Sousa CT & Oliveira FEM (2011) Interferência da  
378 microbiota autóctone do queijo coalho sobre *Staphylococcus coagulase positiva*. Revista  
379 Ciência Agronômica, 42:337-341.
- 380 National Academy of Sciences (2005) Food Chemicals Codex – Committee on Food  
381 Chemicals Codex, Food and Nutrition, 5<sup>o</sup> ed. Washington, DC, USA.
- 382 Mendes-Guianni MJS, Ricci TA, Hanna SA, Salina MA (1997) Fatores envolvidos na  
383 patogênese fúngica. Revista Ciências Farmacêuticas, 18:207-229.
- 384 Midgley G, Hay JR & Clayton YM (1998) Diagnóstico em cores micologia médica.  
385 Editora Manole, São Paulo- SP. 155p.

- 386 Neves KCS, Porto ALF & Teixeira MFS (2006) Seleção de leveduras da Região  
387 Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazonica*, 36:299-309.
- 388 Oliveira C, Guimarães PMR & Domingues L (2011) Recombinant microbial systems for  
389 improved beta-galactosidase production and biotechnological applications.  
390 *Biotechnology Advances*, 29:600-609.
- 391 Pereira-Dias S, Potes ME, Marinh A, Malfeito-Ferreira & Loureiro V (2000)  
392 Characterization of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese.  
393 *International Journal of Food Microbiology*, 60:55–63.
- 394 Porto ALF, Campos-Takaki GM & Lima-Filho JL (1996) Effects of culture conditions  
395 on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soybean flour  
396 medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 60:115–122.
- 397 Price MF, Wilkinson ID & Gentry LO (1982) Plate method for detection of  
398 phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabourandia*, 20:7-14, 1982.
- 399 Punitha V, Kannan S, Saravanabhavan S, Thanikaivelan P, Rao JR & Nair BU (2009)  
400 Chemical degradation of melanin in enzyme based dehairing and fibre opening of buff  
401 calfskins. *Clean Technologies Environmental Policy*, 11:299–306.
- 402 Ramírez-Zavala B, Mercado-Flores Y, Hernández-Rodríguez C & Villa-Tanaca L  
403 (2004) Purification and characterization of a lysine aminopeptidase from *Kluveromyces*  
404 *marxinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 235:369-375.
- 405 Rice MF, Wilkinson ID & Gentry IO (1982) Plate method for detection of fhosfholipase  
406 activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20:15-20.
- 407 Richards NSP (2002) Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente.  
408 *Revista Food Ingredientes*, 17:20-24.

- 409 Rincon-Delgadillo MI, Lopez-Hernandes A, Wijaya I & Rankin SA (2012) Diacetyl  
410 levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods.  
411 Journal of Dairy Science, 95:1125-1139.
- 412 Silva K & Bolini HMA (2006). Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto  
413 de soro ácido de leite bovino. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26:116-122.
- 414 Silva RA, Bismara PA, Moura RB, Lima-Filho JL, Porot ALF & Cavalcanti MTH  
415 (2012a) Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na  
416 região Agreste do estado de Pernambuco. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e  
417 Zootecnia, 64:1732-1738.
- 418 Silva RA, Lima MSF, Viana JBM, Bezerra VS, Pimentel MCB, Porto ALF, Cavalcanti  
419 MTH & Lima-Filho JL (2012b) Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern  
420 Brazil be used as a functional food? Food Chemistry, 135:1533–1538.
- 421 Siqueira AMO, Machado ECL & Stamford TLM. (2013) Bebidas lácteas com soro de  
422 queijo e frutas. Ciência Rural, 43:693-1700.
- 423 Song C, Guang-Lei L, Jin-Li X & Zhen-Ming Chi (2010) Purification and  
424 characterization of extracellular beta-galactosidase from the psychrotolerant yeast  
425 *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. Process  
426 Biochemistry, 45:954-960.
- 427 Souza HQ, Oliveira LA & Andrade JS (2008) Seleção de Basidiomycetes da Amazônia  
428 para produção de enzimas de interesse biotecnológico. Ciência e Tecnologia de  
429 Alimentos, 28:116-124.

- 430 Sundararajan S, Kannan CN & Chittibabu S (2011) Alkaline protease from *Bacillus*  
431 *cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and*  
432 *Bioengineering*, 111:128-133.
- 433 Vasdinvei R & Deák T (2003) Characterization of yeast isolates originating from  
434 Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques.  
435 *International Journal of Food Microbiology*, 86:123-130.
- 436 Viana DA, Lima CA, Neves RP, Mota CM, Moreira KM, Lima-Filho JL, Cavalcanti  
437 MTH, Converti A & Porto ALF (2010) Production and Stability of Protease from  
438 *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162:830–842.
- 439 Zhang ML, Liu WQ, Xiong H, Chen WH, Xiao F & Jian SQ (2006) Studies on the  
440 optimization for lactase production by *Kluyveromyces fragilis*. *Food Science*, 27:428-431.

## 7. CONCLUSÃO

O queijo de Coalho demonstrou ser uma fonte para o isolamento de diversos gêneros de leveduras, as quais compõem a microbiota secundária conferindo sabor diferenciado ao produto. Além disso, a baixa concentração de leveduras detectadas nos queijos artesanais produzidos na região Agreste de Pernambuco indica alta eficiência nos procedimentos de higiene durante a fabricação destes. Assim, os queijos foram classificados como próprios para o consumo humano.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser interessantes para a indústria de laticínios, principalmente para a formulação de produtos com características geográficas regionais, diferenciando-os estes produtos daqueles já disponíveis no mercado, afinal as leveduras apresentaram aspectos biotecnológicos relevantes para a utilização a nível industrial, por serem capazes de produzir diacetil, proteases,  $\beta$ -galactosidases e não comprometer a saúde do consumidor.

## **8. NORMAS DA REVISTA CERES**

### **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

- Escopo e política
- Forma e preparação de manuscritos
- Envio de manuscritos

### **ESCOPO E POLÍTICA**

O periódico Revista Ceres é editado pela Universidade Federal de Viçosa (CNPJ: 25.944.455.0001/96) e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas originais de pesquisa nas áreas de produção e biotecnologia vegetal, medicina veterinária, zootecnia, ciência e tecnologia de alimentos, economia e extensão rural, engenharia agrícola e engenharia florestal. Destina-se a pesquisadores, professores, alunos de graduação e pós-graduação e demais profissionais das áreas de Ciências Agrárias e Biológicas e tem como missão publicar artigos científicos de interesse da comunidade científica ligada a Ciências Agrárias e Biológicas.

O processo de tramitação é feito totalmente on line no site [www.ceres.ufv.br](http://www.ceres.ufv.br). Os trabalhos encaminhados para publicação serão aprovados, após a análise crítica de dois revisores (especialistas da área), de um editor associado e da comissão editorial. A lista de especialistas que colaboraram em cada volume é apresentada no último número publicado do ano. Antes da publicação, cada artigo é submetido a revisores de português e inglês. O autor pode acompanhar o processo no site da revista.

Os artigos aceitos para publicação tornam-se propriedade da Revista Ceres. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista. Os trabalhos devem ser submetidos exclusivamente on line acessando-se o site [www.ceres.ufv.br](http://www.ceres.ufv.br).

Para proceder à submissão o autor correspondente deve solicitar seu cadastramento via e-mail enviado para [ceresonline@ufv.br](mailto:ceresonline@ufv.br), informando seu nome completo, CPF, título do artigo e área de atuação. Os demais autores devem enviar mensagem eletrônica para o mesmo endereço, indicando sua concordância com a submissão do artigo. Uma vez cadastrado, o trabalho deverá ser remetido, seguindo-se as instruções que constam no ícone "envio de artigo" da página inicial. Vale ressaltar que os artigos fora das normas serão imediatamente devolvidos aos autores.

Artigos da área animal só serão aceitos se aprovados por um Comitê de Ética. O Comitê de Ética do Departamento de Veterinária da UFV avaliará os trabalhos recebidos que não tenham sido submetidos anteriormente a outro comitê de Ética.

Os artigos publicados são disponibilizados e têm acesso livre e irrestrito.

## **TIPOS DE TRABALHOS**

A Revista Ceres publica Artigos, Comunicações, Revisões (a convite) e Cartas ao Editor.

**Artigo:** Deve relatar um trabalho original completo, em que a reprodutibilidade dos resultados está claramente estabelecida. O texto deve ter no máximo 25 páginas, incluindo-se as referências, figuras e tabelas.

**Comunicação:** Deve relatar resultados conclusivos e não dados preliminares. É um formato alternativo para descrever, de forma mais concisa, resultados parciais de um trabalho mais amplo, ou de relatar resultados conclusivos baseados em um menor volume de dados. O texto completo deve ter no máximo 10 páginas, incluindo-se as referências, figuras e tabelas.

**Revisão:** Deve reportar, em profundidade, o estado da arte de determinado tema, após convite da Comissão Editorial, sem limite de páginas.

**Carta ao editor:** Deve retratar, de forma informal, algum tema técnico-científico de interesse da comunidade de ciências agrárias ou biológicas. Sua publicação fica a critério da Comissão Editorial.

## FORMA E PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

### ESTILO E FORMATO

Os trabalhos devem ser redigidos em português, inglês ou espanhol, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Para ortografia em espanhol recomenda-se o Dicionario de La Lengua Española, da Real Academia Española. Os trabalhos submetidos em inglês e espanhol deverão conter resumo em português. O texto deve ser digitado em Microsoft Word for Windows (versão 98, 2000, 2003 ou XP), justificado, em espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. O formato da página deverá ser A4, com margens de 3 cm. Sugere-se a consulta de artigos publicados recentemente para maiores esclarecimentos sobre as seções contidas em um artigo ou comunicação, descritas a seguir, na ordem de apresentação.

### SEÇÕES DE ARTIGO OU COMUNICAÇÃO

**Título:** Deverá ter no máximo 15 palavras, centralizadas e em negrito. Apenas a primeira palavra com a letra inicial em maiúscula e as demais em minúscula, exceto em casos pertinentes (p. ex., nomes científicos; *Phaseolus vulgaris*). Se necessário, introduzir nota de rodapé ao seu final, usando algarismo arábico sobrescrito.

**Nomes dos autores:** Os nomes dos autores devem ser listados em sequência e centralizados abaixo do título, por extenso e com letras maiúsculas/minúsculas. Cada autor é acompanhado de um algarismo arábico. Os algarismos também são listados, em notas de rodapé, com formação, titulação máxima, departamento, instituição, endereço comercial (rua, número, bairro,

CEP, cidade, estado, país) e e-mail dos autores. Deve estar indicado o autor para correspondência.

**Rodapé:** Deve fornecer informações sobre o trabalho (se foi extraído de tese ou dissertação, etc., e fonte financiadora) e sobre cada um dos autores: formação, titulação máxima, departamento, instituição, endereço comercial (rua, número, bairro, CEP, cidade, estado, país) e e-mail.

**Abstract, Resumen ou Resumo:** As palavras ABSTRACT, RESUMEN ou RESUMO devem ser escritas com letras maiúsculas, em negrito e alinhadas à esquerda. Deve ser escrito na língua escolhida para a redação do artigo, em letra maiúscula, alinhado à esquerda. O texto do abstract, resumen ou resumo deve ser iniciado com uma ou duas linhas introdutórias, tendo no máximo 250 palavras em um só parágrafo.

**Key words, Palabras clave ou Palavras-chave:** Em número mínimo de três e máximo de seis, citadas em parágrafo subsequente ao Resumo, preferencialmente sem repetir palavras contidas no título do trabalho.

**Abstract ou Resumo:** Se o artigo estiver redigido em português ou espanhol, nesta seção o resumo deverá ser apresentado em inglês. Caso esteja redigido em inglês, nesta seção o resumo deverá ser apresentado em português. Deve ser escrito em letra maiúscula, alinhado à esquerda. Na linha subsequente ao título dessa seção deve-se inserir o título em inglês ou português, conforme o caso, negrito e centralizado. O abstract e/ou o resumo devem corresponder ao resumo e/ou abstract.

**Key words ou Palavras-chave:** Citadas em parágrafo subsequente ao Abstract ou Resumo. Devem corresponder às palavras-chave ou key words.

**Introdução:** O título dessa seção, "INTRODUÇÃO", deve ser escrito em letra maiúscula, em negrito e alinhado à esquerda. A introdução deve ater-se ao problema do trabalho em pauta, situando o leitor quanto à sua importância e objetivos, estando estes últimos claramente expressos ao final da introdução.

**Material e Métodos:** O título dessa seção, "MATERIAL E MÉTODOS", deve ser escrito em letra maiúscula, em negrito e alinhado à esquerda. A seção "Material e Métodos" deve ser redigida com detalhes suficientes para que o trabalho possa ser repetido.

**Resultados e Discussão:** O título da seção, "RESULTADOS E DISCUSSÃO", deve ser escrito em letra maiúscula, em negrito e alinhado à esquerda. O texto deve ser claro e conciso, apoiado na literatura pertinente. Resultados e Discussão são seções que podem vir juntas ou separadas.

**OBS.:** As seções Material e Métodos, Resultados e Discussão poderão conter subseções, indicadas por subtítulos escritos em itálico e negrito, iniciados por letra maiúscula e centralizados.

**Conclusões:** O título da seção "CONCLUSÕES" deve ser escrito em letra maiúscula, em negrito e alinhado à esquerda. As conclusões devem ser concisas e derivadas dos dados apresentados e discutidos.

**Agradecimentos:** Após a conclusão e, antes das Referências, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições.

**Referências:** O título da seção "REFERÊNCIAS" deve ser escrito em letra maiúscula, em negrito e alinhado à esquerda. As referências devem ser listadas por ordem alfabética. Seguem-se os exemplos:

**a) Artigos de periódicos:**

Anselme KL (2000) Review: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21:667-681.

Davies JE & Baldan N (1997) Scan electron microscopy of the bone-bioactive implant interface. *Journal of Biomedical Material Research*, 36:429-440.

Conz MB, Granjeiro JM & Soares GA (2005) Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications on bone graft. *Journal of Applied Oral Sciences*, 13:136-140.

**b) Livros:**

Orefice RL, Pereira MM & Mansur HS (2006) Biomateriais: Fundamentos e aplicações. 3ª ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica. 538p.

**c) Capítulos de livros:**

Costa EF, Brito RAL & Silva EM (1994) Cálculos e manejo da quimigação nos sistemas pressurizados. In: Costa EF, Vieira RF & Viana PA (Eds.) Quimigação: Aplicação de produtos químicos e biológicos via irrigação. Brasília, EMBRAPA. p.183-200.

**d) Trabalhos em anais de congresso:**

Junqueira Netto A, Sedyama T, Sedyama CS & Rezende PM (1982) Análise de adaptabilidade e estabilidade de dezesseis cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em seis municípios do sul de Minas Gerais. In: 1ª Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, Goiânia. Anais, EMBRAPA/CNPAF. p.47-48.

**e) Teses e dissertações:**

Wutke EB (1998) Desempenho do feijoeiro em rotação com milho e adubos verdes. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 146p.

**f) CD-ROM:**

França MHC & Omar JHDH (2004) Estimativa da função de produção do arroz no estado do Rio Grande do Sul: 1969 a 1999. In: 2º Encontro de Economia Gaúcha, Porto Alegre. Anais, FEE. CD-ROM.

**g) Internet:**

Darolt MR & Skora Neto F (2002) Sistema de plantio direto em agricultura orgânica. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/daroltsist.htm>>. Acessado em: 23 de abril de 2009.

**h) Boletim técnico:**

Bastos DC, Scarpere Filho JA, Fatinansi JC, Pio R & Spósito MB (2004) A cultura da lichia. Piracicaba, DIBD/ESALQ. 23p. (Boletim técnico, 26).

No texto, citar as referências nos formatos: (Autor, Ano), (Autor & Autor, Ano), (Autor et al., Ano) ou (Silva, 1999; Arariki & Borges, 2003; Santos et al., 2007), sempre em ordem cronológica ascendente. A referência deve ser citada ao final de um período que expresse uma idéia completa. Quando os nomes dos autores forem parte integrante do texto, menciona-se a data da publicação citada entre parênteses, logo após o nome do autor, conforme exemplos: Fontes (1999), Borges & Loreno (2007), Batista et al. (2005).

**Citação de citação:** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Entretanto, nem sempre é possível. Nesse caso, pode-se reproduzir informação já citada por outros autores. Pode-se adotar o seguinte procedimento: no texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor do documento consultado com o ano de publicação; na listagem das referências deve-se incluir a referência completa da fonte consultada.

**Comunicação pessoal:** Não faz parte da lista de referências, sendo colocada apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "comunicação pessoal", a data da comunicação, nome, estado e país da Instituição ao qual o autor é vinculado.

## **NORMAS PARA AS ILUSTRAÇÕES E TABELAS**

As figuras e tabelas, todas alocadas em páginas individuais ao final do texto, devem ser numeradas com algarismos arábicos, ficando a legenda posicionada abaixo nas figuras e acima nas tabelas. Figuras e tabelas não devem repetir os mesmos dados. Figuras submetidas em formato eletrônico devem apresentar resolução mínima de 300 dpi, em formato TIFF ou JPG. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) de onde foi extraída. A referência bibliográfica completa relativa à fonte da ilustração deve figurar na seção Referências. As despesas de impressão de ilustrações coloridas correrão por conta dos autores.

**Tabela:** O termo refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Deve ser construída apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tabela.

**Figura:** O termo refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. Os desenhos, gráficos, etc. devem ser bem nítidos. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Figura.

## **CUSTOS**

A publicação do trabalho implicará o pagamento de uma taxa de R\$250,00 (além do custo de R\$ 150,00 por página com ilustração colorida). O pagamento deverá ser efetuado quando o autor correspondente receber a prova tipográfica e será feito exclusivamente na forma de Boleto Eletrônico, a ser gerado na seção "Gerar boleto de pagamento". De posse do boleto impresso, basta quitá-lo em uma agência bancária ou caixa automática e enviar cópia para [ceresonline@ufv.br](mailto:ceresonline@ufv.br). Solicita-se informar, via e-mail, a data e o número do boleto, quando forem feitos depósitos em que os autores não são identificados (recursos de convênios, departamentos, coordenações, etc.).

## **ENVIO DE MANUSCRITOS**

Os trabalhos devem ser submetidos exclusivamente on line acessando-se o site [www.ceres.ufv.br](http://www.ceres.ufv.br). Para proceder à submissão o autor correspondente deve solicitar seu cadastramento via e-mail enviado para [ceresonline@ufv.br](mailto:ceresonline@ufv.br). Uma vez cadastrado, o trabalho deverá ser remetido, seguindo-se as instruções que constam no ícone "envio de artigo" da página inicial. O recebimento será acusado e o autor receberá o número de protocolo de seu artigo. Quando os pareceres ad-hoc estiverem disponíveis, as correções solicitadas deverão ser feitas clicando-se no ícone "tramitação on line". Na caixa de diálogo que se abre, os pareceres e sugestões podem ser vistos clicando-se sobre o número de protocolo do artigo, situado à

esquerda. As alterações e revisões deverão ser feitas em formato word 97-2003, anexadas no campo correspondente e enviadas à revista. Após o envio abre-se uma caixa de diálogo para qualquer observação que os autores julgarem necessária. Pode-se usar o recurso "recortar" "colar" nesse campo.