REVISTA
DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES
v. 77, n. 1, jan-mar 2022

Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v77i1.885

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TRADICIONAIS DO TIPO COLONIAL DO SUL DO BRASIL

Antimicrobial and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima[1], Nádia Carbonera[2], Elizabete Helbig[1]*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antimicrobianas e tecnológicas de bactérias ácido-lácticas de queijos artesanais do tipo Colonial comercializados em feiras de rua de Pelotas, RS. Um total de 63 isolados de BAL gelatinase e DNase negativas, não hemolíticas e sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina foram utilizadas no estudo. A atividade antagônica foi verificada pelo método *spot-on-the-lawn* frente a micro-organismos patogênicos e BAL de referência e pela avaliação da produção de substâncias inibitórias semelhantes à bacteriocinas pela técnica de difusão em poços contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Quatro BAL (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4LBAL1 e Q4BAL5) conseguiram produzir BLIS anti-*Listeria*, proteinases extracelulares e destas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram caracterizadas como culturas de acidificação rápida. Após os testes moleculares, foram identificadas como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis*, respectivamente. Os resultados sugerem as linhagens como potenciais candidatas na biopreservação de produtos lácteos.

Palavras-chave: antagonismo, patogenicidade, bacteriocinogênico.

---

1 Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição, Rua Gomes Carneiro, n. 01, Porto, 96010-610, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: carloshgsl@hotmail.com.
2 Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Pelotas, RS, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 10/09/2021
Aprovado / Approved: 30/12/2021

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the safety, antimicrobial and technological properties of lactic acid bacteria from artisanal Colonial-type cheese marketed at streets fair in Pelotas, RS. A total of 73 isolates were characterized as BAL after Gram's method and catalase test. All strains were gelatinase and DNase negative, regarding hemolytic activity, seven were detected as α and two as β-hemolytic, exerting 63 BAL that demonstrated sensitivity to the chloramphenicol and tetracycline antibiotics. The antagonistic activity was verified by the spot-on-the-lawn method and the evaluation of the production of bacteriocins by the diffusion technique in wells. Four BAL (C1BAL10, C2BAL2, C4BAL1, and C4BAL5) were able to produce BLIS anti-*Listeria*, extracellular proteinases, and of these C2BAL2 and C4BAL1 were characterized as rapid acidifying cultures. After molecular testes were identified as *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis.* The results suggest two strains as potential candidates in the biopreservation of dairy products.

Keywords: antagonism, pathogenicity, bacteriocinogenic.

INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-lácticas (BAL) representam um grupo de cocos e bastonetes Gram-positivos, catalase negativa, não esporulada, aeróbia, microaerofílica ou anaeróbia facultativa que produzem ácido lático como principal produto final durante a fermentação de carboidratos (LAHTINEN, 2012). A utilização desses micro-organismos na preservação de alimentos tem elevada importância devido à demanda por menor utilização de compostos químicos pelos consumidores e ao aumento do número de espécies bacterianas resistentes a antibióticos e conservantes (FOX *et al*., 2017).

As BAL são capazes de produzir diversos metabólitos antimicrobianos como ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio, reuterina, diacetil, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes às bacteriocinas (BLIS), sendo estes compostos antibacterianos benéficos na biopreservação de alimentos (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016). As bacteriocinas, por exemplo, são inerentemente tolerantes ao estresse térmico severo e conhecidas por sua atividade em uma ampla faixa de pH. Esses peptídeos antimicrobianos também são incolores, inodoros e insípidos, o que aumenta ainda mais seu potencial, além de atuarem como conservantes naturais, proporcionando proteção contra contaminação por patógenos (SNYDER *et al*., 2013).

Este grupo de bactérias possui *habitats* variados, incluindo alimentos lácteos fermentados, a exemplo dos queijos artesanais, principalmente os de leite cru (FOX *et al.*, 2017). Esses produtos são reconhecidos por manter algum grau de processamento realizado nas fazendas de produção, geralmente familiar, através de um procedimento manual de fabricação, que são normalmente comercializados em feiras agroecológicas, e entre eles, o queijo tipo Colonial artesanal produzido no sul do Brasil, a partir de uma cultura natural do soro do leite como coagulante e consumido fresco ou em graus variados de maturação. (CARVALHO *et al.*, 2019).

Por questões sanitárias, no estado do Rio Grande do Sul, os queijos artesanais não podem ser comercializados a partir do leite cru, o que acarreta a perda da característica da microbiota nativa e a necessidade do uso de culturas lácteas industriais, resultando na redução das propriedades organolépticas. Outra possibilidade é a realização de estudos técnicos que comprovem a qualidade microbiológica a partir do grau de maturação, processo que pode ser acelerado com a utilização de culturas típicas isoladas desses produtos (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Para a seleção de novas cepas de BAL para aplicação na indústria de lacticínios, é fundamental que estas bactérias promovam a acidez necessária ao desenvolvimento da coagulação do leite, podendo assim apresentar uma característica

desfavorável à multiplicação de bactérias patogênicas e a capacidade de produzir proteases extracelulares, permitindo novas oportunidades de melhoria de sua qualidade e segurança alimentar, preservando suas características organolépticas (EL-GHAISH *et al*., 2010). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar as propriedades antimicrobianas e tecnológicas de BAL de queijos artesanais do tipo Colonial comercializados em feiras de rua de Pelotas, RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas 63 BAL negativas para DNases, gelatinase e hemólise previamente isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS. Estes isolados são amostras estocadas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição (FN/UFPel) e as análises ocorreram durante o 1º semestre de 2019.

As BAL de referência utilizadas (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338) foram adquiridas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia, UFPel. As cepas patogênicas indicadoras empregadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Salmonella* Enteretidis ATCC 1306) pertenciam ao Laboratório de Ciência Alimentar e Biologia Molecular, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentares, UFPel.

Os micro-organismos foram armazenados em ultracongelador (Coldlab, Piracicaba, Brasil) a -80 °C em caldo MRS (Man Rogosa Shape) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para BAL e BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para os patógenos, suplementado com glicerol (50/50) e para a reativação foram realizados dois recultivos em MRS ou BHI a 37 °C por 24 h.

Atividade antimicrobiana

Teste de antagonismo pelo método spot-on-the-lawn

A metodologia utilizada foi preconizada por Lewus *et al.* (1991). Placas contendo MRS ágar foram semeadas com 2 µL de caldo MRS contendo a reativação das cepas de BAL. As placas foram incubadas em aerobiose a 30 °C por 24 h. Após o recultivo dos micro-organismos indicadores, 100 µL de cada cultura foram adicionados a um erlenmeyer contendo 50 mL de BHI fundido, suplementado com 0,8% de ágar bacteriológico (Labsynth, Diadema, Brasil) e a um segundo erlenmeyer contendo MRS ágar a fim de obter uma concentração de 5 a 6 Log_{10} $UFC.mL^{-1}$ em espectrofotômetro de cada cultivo. Após esse procedimento, as placas inoculadas com as cepas patogênicas e com as BAL foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 18-24 horas. A inibição foi realizada em duplicata e verificada pela formação de um halo característico translúcido ao redor das colônias relacionadas com cada micro-organismo indicador testado.

Detecção da produção de bacteriocina pela técnica de difusão em poços

A bacteriocina produzida pelas BAL foi detectada pela aplicação da técnica de difusão em poços, conforme Lewus *et al.* (1991). Os isolados de BAL foram cultivados em 100 mL de caldo MRS a 37 °C por 24 h. O caldo foi centrifugado a 10.844 x g por 15 min a 4 °C (Quimis, Diadema, Brasil) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade correspondente a 0,22 µm (GVWP Durapore, Millipore, Massachusetts, EUA). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 utilizando solução de NaOH 1N (Labsynth, Diadema, Brasil) para eliminar a possibilidade de inibição causada pela presença do ácido lático. Após o recultivo de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, 100 µL foram adicionados a um erlenmeyer contendo BHI caldo (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico (Labsynth, Diadema, Brasil), a fim de obter uma concentração de 5 a 6 Log_{10} $UFC.mL^{-1}$ destes micro-organismos. Após a incubação, 20 mL de cada cultivo, correspondente a cada cepa patogênica, foram transfe-

ridos para placas de Petri e, então, no meio solidificado, foram realizados poços com 5 mm de diâmetro. Nestes poços foram adicionados 40 µL dos sobrenadantes neutralizados de BAL em placas com BHI fundido, correspondentes aos cultivos de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As placas foram mantidas a 20 °C por 4 h para permitir a difusão do inóculo no ágar. Em seguida, foram incubadas em aerobiose a 37 °C durante 18-24 h. O antagonismo foi detectado pela formação de uma zona de inibição identificada por um halo característico. A ausência de crescimento da cepa indicadora ao redor da cultura de BAL indicou sua inibição frente à presença da bacteriocina produzida por este micro-organismo testado. Como controle positivo, os poços foram impregnados com 5 µL da solução de nisina na concentração de 1 g de Nisyn (Prozyn, Butantã, São Paulo, Brasil) para 5 mL de água destilada.

Propriedades tecnológicas

Capacidade de acidificação

Para avaliação da capacidade acidificante e alteração do pH, utilizou-se o método descrito por Franciosi *et al.* (2009), com alterações no tempo de avaliação do pH e teor de ácido lático (6 e 12 h), em medidor de pH (PH140, Simpla) por imersão do eletrodo, previamente calibrado. A produção de acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N (HORWITZ *et al.*, 2016), sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido lático.

Para uma cultura láctica ser considerada produtora de ácido rápido, ela deve reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h de incubação na temperatura adequada. Conforme a velocidade de acidificação, as cepas capazes de reduzir o pH do leite em 1,2 U foram classificadas como acidificantes rápidas e selecionadas como iniciadoras, enquanto as acidificantes lentas foram selecionadas como culturas adjuvantes (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa, as bactérias foram semeadas em meio sólido composto por 1% (v/v) de leite em pó desnatado e 1,5% de ágar bacteriológico a 37 °C, conforme descrito por Jones *et al.* (2007), observada em intervalos de 24 h durante três dias. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *Lactococcus lactis* proveniente da Chr. Hansen (Valinhos, São Paulo, Brasil). A atividade proteolítica foi indicada como uma zona clara ao redor das colônias.

Identificação molecular

A identificação molecular foi realizada por meio da obtenção do sequenciamento do rDNA 16S. As cepas que apresentaram melhor desempenho no decorrer do trabalho, passaram por sequenciamento genético. O DNA total foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e as reações em cadeia da polimerase foram realizadas empregando os *primers* 27f (5`- GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa *et al.* (2006).

Análise estatística

As análises foram realizadas em duplicata e uma média aritmética foi gerada a partir dos resultados. Na análise da detecção bacteriana e das propriedades tecnológicas, a média foi seguida do desvio padrão. Os dados coletados foram tabulados no *software* Microsoft Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana

Antagonismo pelo método spot-on-the-lawn

Os resultados da atividade antagonista das 63 BAL pelo método *spot-on-the-lawn* frente as bactérias patogênicas encontram-se na Tabela 1 e para as indicadoras na Tabela 2. A maioria das BAL conseguiram inibir o crescimento de *S. aureus* (93,7%), *L. monocytogenes* (93,7%), *S.* Typhimurium (92,1%), *S.* Enteretidis (92,1%) e E. *coli* (88,8%). Foi observado que os maiores halos de inibição formados foram nos queijos Q5 (46,5 mm) e Q4 (44,7 mm), utilizando a *L. monocytogenes* como microorganismo indicador. Observa-se ainda, pela análise da Tabela 2, que cerca de 20,3% dos isolados de

BAL (12/59) apresentaram antagonismo frente ao menos uma BAL de referência, sendo *L. acidophilus* e *L. brevis* as que apresentaram maior inibição de 20,3% (12/13) e 17% (10/13), respectivamente. Foram descartadas quatro BAL (Q2BAL5, Q3BAL8, Q8BAL76, Q9BAL3) por não apresentarem antagonismo frente as bactérias patogênicas. Um total de 59 cepas apresentaram atividade inibidora em relação a pelo menos 2 das cepas patogênicas.

Tabela 1 – Atividade antagonista pelo método *spot-on-the-lawn* das BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, frente aos micro-organismos patogênicos*

Queijos	N°	SA		LM		EC		ST		SE	
		N	Aa*	N	Aa	N	Aa	N	Aa	N	Aa
Q1	7	7	26,1	7	31,9	7	27,0	7	36,0	7	24,1
Q2	9	8	26,8	8	30,3	6	24,5	7	30,1	7	21,6
Q3	4	3	29,3	3	41,3	3	31,3	3	26,1	3	33,0
Q4	5	5	26,4	5	44,7	5	31,7	5	39,7	5	25,1
Q5	3	3	22,3	3	46,5	3	26,3	3	21,8	3	22,8
Q6	7	7	22,6	7	29,1	7	23,9	7	28,4	7	25,3
Q7	5	5	24,3	5	27,0	5	23,8	5	28,1	5	21,4
Q8	9	8	24,6	8	26,8	8	23,3	8	27,1	8	24,5
Q9	4	3	39,0	3	20,5	2	30,0	3	32,3	3	28,3
Q10	10	10	24,2	10	22,3	10	18,8	10	30,8	10	23,4
Total	**63**	**59**	**-**	**59**	**-**	**56**	**-**	**58**	**-**	**58**	**-**

**Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [SA]; *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 [LM]; *Escherichia coli* ATCC 43895 [EC]; *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 [ST]; *Salmonella* Enteretidis ATCC 1306 [SE]; Cepas analisadas [N']; Cepas que apresentaram atividade antimicrobiana [N]; médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos em duplicata [Aa*].

A atividade antimicrobiana das BAL em relação à inibição de micro-organismos patogênicos, a exemplo da *L. monocytogenes*, é bastante variável, levando-se em consideração a espécie, condições de incubação e substrato envolvido (ÇADIRC; ÇITAK, 2010). O amplo espectro de atuação de BAL frente a diversos patógenos alimentares também foram encontrados por Silva *et al*. (2019) e Sant`anna *et al*. (2017) em isolados de queijos Minas artesanal de Minas Gerais, Brasil.

Wang *et al.,* (2014) analisaram o mecanismo de ação do ácido lático frente aos patógenos *S. Enteritidis*, *E. coli* e *L. monocytogenes* por meio das técnicas de mensuração do tamanho, SDS-PAGE e Microscopia eletrônica de transmissão. Segundo os resultados, o teor de 0,5% de ácido lático foi determinante para inibir o crescimento das cepas. As células bacterianas tratadas com o ácido perderam a integridade da estrutura da camada da membrana celular, por meio da formação de poros locais, com isso favorecendo o vazamento de proteínas intracelulares e assim, perdendo totalmente sua viabilidade. Após o tratamento com o ácido, todas as cepas tiveram o tamanho da membrana reduzido, especialmente para *Salmonella*.

Para a seleção de BAL, isoladas com a finalidade de compor culturas que poderiam melhorar a qualidade sanitária do queijo Colonial artesanal, o ideal seria que elas não interferissem na atividade de outras BAL desejáveis. Embora tenha ocorrido antagonismo entre algumas BAL testadas, portanto, interferência na sua atividade, poderiam ser utilizadas com a finalidade de melhorar a qualidade sanitária do produto (GASPAR; CRESPO, 2016). De acordo com dados da literatura, culturas selvagens isoladas de ecossistemas complexos de alimentos tradicionalmente fermentados exibem uma diversidade de atividades metabólicas que divergem fortemente de cepas comparáveis usadas como *starters* industriais. Isso inclui diferenças na taxa de

crescimento e comportamento estratégico competitivo de crescimento em culturas mistas, adaptação a um substrato ou matéria-prima em particular, propriedades antimicrobianas e atributos de sabor, aroma e qualidade. As cepas selvagens precisam suportar a competição de outros micro-organismos para sobreviver em seu ambiente natural hostil, de modo que frequentemente produzam antimicrobianos (LEROY; DE VUYST, 2004).

Detecção da produção de bacteriocinas pela técnica de difusão em poços

A avaliação da produção de bacteriocinas pela técnica de difusão em poços é mostrada na Tabela 3. Foram utilizadas 59 isolados que apresentaram inibição frente a *L. monocytogenes* e *S. aureus* pelo método *spot-on-the-lawn*, destas apenas quatro (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* com halos variados entre 13,0 e 17,5 mm. Enquanto, o efeito inibitório não foi verificado contra *S. aureus*. Mais estudos serão necessários para determinar a natureza proteica da substância antimicrobiana, como sensibilidade enzimática, estabilidade em diferentes valores de pH e temperaturas (HERMANNS *et al*., 2013).

Tabela 2 – Atividade antagonista pelo método *spot-on-the-lawn* das BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, frente aos micro-organismos indicadores

Queijos	Nº	LA		LP		LB		LF	
		N	Aa*	N	Aa	N	Aa	N	Aa
Q1	7	3	15,6	3	15,2	3	14,5	3	14,5
Q2	8	0	0	0	0	1	19	0	0
Q3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Q4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Q5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Q6	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Q7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Q8	8	2	20,5	2	20,5	2	19,5	2	19
Q9	3	2	16,2	2	17,2	1	23.0	1	16,5
Q10	10	5	14,9	2	12,6	3	17,5	3	16,0
Total	**59**	**12**	**-**	**9**	**-**	**10**	**-**	**9**	**-**

**Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [LA]; *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 [LP]; *Lactobacillus brevis* ATCC 367 [LB]; *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 [LF]; Cepas analisadas [Nº]; Cepas que apresentaram atividade antimicrobiana [N]; médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos em duplicata [Aa*].

Tabela 3 – Atividade antagonista* pela técnica da difusão em poços das BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, frente aos micro-organismos indicadores

Micro-organismos indicadores	Cepas			
	Q1BAL10	Q2BAL2	Q4BAL1	Q4BAL5
S. aureus (25923)	-	-	-	-
L. monocytogenes (ATCC 7644)	16,5 ± 0,71	17,5 ± 0,71	13,5 ± 0,71	13,0 ± 1,41

*médias dos halos de inibição em milímetros obtidos em duplicata e seguidos de desvio padrão.

As bacteriocinas produzidas pelas BAL têm um espectro antibacteriano naturalmente limitado a bactérias taxonomicamente próximas à cepa produtora, que inclui organismos em deterioração e patógenos de origem alimentar, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*, mas também outras BAL (HÉCHARD; SAHL, 2002). Mezaini *et al*. (2009) avaliaram a atividade antagonista do sobrenadante de 20 cepas de BAL isoladas de queijos tradicionais argelinos, destas, apenas seis apresentaram espectro de ação contra Gram-positivos, exceto *S. aureus*. Diversos modos de ação das bacteriocinas têm sido descritos, como modulação enzimática, inibição do crescimento de esporos e síntese de peptidoglicano, capaz de favorecer a formação de poros na membrana citoplasmática, após interação com o lipídeo II, precursor essencial da membrana celular e consequente efluxo de metabólitos intracelulares, resultando em despolarização da membrana e morte celular (PEREZ *et al.,* 2018).

Em um estudo conduzido por Macaluso *et al.* (2016) com 223 BAL isoladas de queijos tradicionais sicilianos com atividade anti-*Listeria* pelo método *spot-on-the-lawn*, 37 cepas foram positivas contra a cepa patogênica pela técnica de difusão em disco.

Propriedades tecnológicas

Capacidade acidificante

As propriedades tecnológicas, como capacidade proteolítica e acidificante, são fatores importantes na seleção de novas cepas de BAL para aplicação como cultura iniciadora ou adjunta na produção de queijos. Para avaliação da capacidade acidificante, as BAL foram cultivadas em leite desnatado UHT e avaliados às 6h e 12h. Conforme os resultados expressos na Tabela 4, as cepas variaram o pH de 5,62 (5,20-6,19) em 6h a 5,44 (4,96-6,09) em 12h. Os isolados C2BAL2 e C4BAL1 conseguiram reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 a 37 °C em até 6h, caracterizando-as como culturas de acidificação rápida com potencial tecnológico para aplicação como *starter* ou *costarter* em laticínios. Os valores variaram de 0,91% (0,65-1,06) em 6h a 1,02% (0,68-1,3) em 12h, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios seguidos de desvio padrão de pH e acidez em ácido lático (%) das BAL produtoras de bacteriocinas isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, após 6h e 12h de incubação

Cepas	pH	pH	Acidez	pH	Acidez
	0h	6 h	6h	12h	12h
Q1BAL10	6,50	5,80 ± 0,11	0,94 ± 0,03	5,57 ± 0,03	0,99 ± 0,03
Q2BAL2	6,50	5,20 ± 0,01	1,00 ± 0,05	4,96 ± 0,20	1,13 ± 0,05
Q4BAL1	6,50	5,30 ± 0,12	1,06 ± 0,03	5,01 ± 0,01	1,30 ± 0,02
Q4BAL5	6,50	6,19 ± 0,01	0,65 ± 0,01	6,09 ± 0,01	0,68 ± 0,03
Média		**5,62 ± 0,47**	**0,91 ± 0,18**	**5,44 ± 0,55**	**1,02 ± 0,26**

A rápida capacidade de acidificação das BAL e a intensidade da produção de ácido são fatores importantes no desenvolvimento de produtos lácteos. A lactose é geralmente metabolizada pela via glicolítica nos estágios iniciais do amadurecimento do queijo, resultando em uma diminuição do pH (MARTINOVIC *et al.*, 2018). Segundo a literatura, a atividade acidificante de cada cepa está relacionada à sua capacidade específica de decompor substâncias no meio ambiente e torná-las assimiláveis para seu metabolismo (SAVIJOKI *et al*., 2006). Portanto, as BAL chamadas acidificantes rápidas apresentam potencial tecnológico como culturas iniciadoras. No entanto, BAL com atividade

lenta pode ser usado como culturas secundárias para equilibrar o teor de umidade em produtos lácteos (PEREIRA *et al.*, 2019).

Quando a produção de ácido lático é suficiente, a caseína coagula em seu ponto isoelétrico (pH 4,6), essencial na fabricação de queijos, caracterizando a firmeza da coalhada e controlando contaminantes indesejáveis, dada sua maior tolerância em faixas de pH próximas da neutralidade ou levemente alcalinas (PASQUALE *et al.*, 2019). Assim, o controle da acidificação nas fases iniciais da fabricação de queijo também é um fator limitante na prevenção do crescimento de *L. monocytogene*s (ØS TERGAARD *et al*., 2014).

Atividade proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica extracelular de isolados de BAL produtoras de bacteriocina é apresentada na Tabela 5. O teste foi eficaz para os quatro isolados (CIBAL10, C2BAL2, C4BAL1 e C4BAL5), capazes de produzir a enzima por meio da formação de um halo característico. Os halos formados pela hidrólise da caseína variaram entre 11,5 e 52 mm. A cepa C4BAL1 representou o desempenho mais satisfatório da atividade proteolítica extracelular.

Tabela 5 – Atividade proteolítica extracelular* das BAL produtoras de bacteriocinas isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Parâmetro	Cepas			
	Q1BAL10	**Q2BQL2**	**Q4BAL1**	**Q4BAL5**
Atividade proteolítica	32,5 ± 0,71	11,5 ± 0,71	52,0 ± 1,41	37,5 ± 0,71

*médias dos halos de hidrólise em milímetros obtidos em duplicata e seguidos de desvio padrão.

Resultados semelhantes empregando a mesma metodologia também foram obtidos por Cabral *et al*. (2016), ao analisar BAL isolado de requeijão de Pernambuco, Brasil. A capacidade de produção de enzimas extracelulares representa uma característica significativa do BAL (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Segundo a literatura, as proteases extracelulares são cruciais na hidrólise da caseína em oligopeptídeos, fornecendo aminoácidos essenciais para o seu crescimento, além de permitir a sua liberação e de outros peptídeos menores, alguns considerados bioativos com funções imunomoduladoras, anticarcinogênicas, anti-hipertensivas, antioxidantes, antimicrobiano e/ou a capacidade de favorecer a acidificação rápida do meio durante o processo de fermentação (VENEGAS-ORTEGA *et al*., 2019).

A degradação da caseína também desempenha um papel vital no desenvolvimento de produtos fermentados, pois estão associadas à liberação dessas moléculas diretamente responsáveis pelo aroma desejável, precursoras de compostos voláteis como ácidos, álcoois, aldeídos, amônia, éster de enxofre, entre outros. Além de modificar a textura e reduzir a atividade de água de alguns produtos, como os queijos maturados (GARCÍA-CANO *et al*., 2019).

Identificação molecular

Através da identificação molecular dos isolados C2BAL2 e C4BAL1 por meio da obtenção e sequenciamento de rDNA 16S, foram identificados como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis,* respectivamente.

Esse resultado corrobora com o estudo de Kamimura *et al.* (2019), onde realizaram um mapeamento em larga escala da diversidade microbiana de 11 diferentes categorias de queijos artesanais, produzidos em cinco regiões geográficas do Brasil. Destes, o queijo Colonial produzido de modo artesanal no sul do país apresentou maior população para *Lactococcus*, *Enterococcus durans* os isolados obtidos de queijo Colonial e leite cru, o que pode justificar a adoção de parâmetros de segurança neste estudo como critério de eliminação.

CONCLUSÃO

O estudo detectou o queijo Colonial artesanal como fonte de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, supostamente caracterizadas como bacteriocinas e com potencial de cultivo como *starters*. No total de 59 cepas que apresentaram efeito inibitório em pelo menos dois dos micro-organismos patogênicos utilizados, apenas quatro (C1BAL10, C2BAL2, C4BAL1 e C4BAL5) conseguiram produzir atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* pela técnica de difusão em poços. Assim, as cepas C2BAL2 e C4BAL1 apresentaram melhor desempenho como potenciais culturas iniciadoras com atividade anti-*Listeria.* Após a identificação molecular, foram reconhecidas como *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis,* respectivamente. Outros estudos para avaliação do metabólito antimicrobiano e sua aplicabilidade em uma matriz láctea serão necessários para que esses micro-organismos possam ser usados na biopreservação de alimentos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financiador 001.

REFERÊNCIAS

CABRAL, M. L. B. *et al.* Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 4, 2016. DOI: 10.18067/jbfs.v3i4.111

ÇADIRCI, B. H.; ÇITAK, S. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 237-241, 2010. DOI: 10.3923/pjn.2005.237.241

CARVALHO, M. M. *et al*. Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: a case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 9711-9720, 2019. DOI: 10.3168/jds.2019-16373

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 11. ed., Document M02-A11. Wayne: CLSI, 2012.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. *et al*. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology,** v. 63, p. 178-190, 2017. DOI: 10.1016/j.fm.2016.11.014

EL-GHAISH, S. *et al.* Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 4, p. 635-643, 2010.

FOX, P. F. *et al*. **Fundamentals of cheese science.** Boston: Springer, 2017, 799 p.

FRANCIOSI, E. *et al.* Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009. DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.07.008

GARCÍA-CANO, I. *et al*. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 103, n. 13, p. 5243-5257, 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-09844-6

GASPAR, F. B.; CRESPO, M. T. B. Lactic acid bacteria as functional starter in food fermentations. *In*: MONTET, D.; RAY, R. C. **Fermented Foods**. Part I: Biochemistry and Biotechnology. Boca Raton, USA: CRC Press, 2016. p. 166-184

HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie,** v. 84, n. 5-6, p. 545-557, 2002. DOI: 10.1016/S0300-9084(02)01417-7

HERMANNS, G. *et al*. Isolamento e identificação de bactérias láticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 191-196, 2013. DOI: 10.7213/academica.11.002.AO10

HORWITZ, W.; LATIMER Jr., G. W. (ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. 3. rev. Gaithersburg: AOAC International, 2010.

JONES, B. V.; SUN. F.; MARCHESI, J. R. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 418-420, 2007. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x

KAMIMURA, B. A. *et al*. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 40-49, 2019. DOI: 10.1016/j.fm.2018.12.014

LAHTINEN, S. *et al.* **Lactic Acid Bacteria:** microbiological and functional aspects. 4. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2012. 798 p.

LEROY, F.; DE VUYST, L. 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. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991. DOI: 10.1128/aem.57.6.1683-1688.1991

LISBOA, M. P. *et al.* Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic Forest. **International Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 111-118, 2006.

MACALUSO, G. *et al*. In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 1, 2016. DOI: 10.4081/ijfs.2016.5503

MARTINOVIC, A. *et al*. Application of indigenous strains of lactic acid bacteria for semi-industrial production of autochthonous Montenegrin Njeguši cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 3, p. 683-692, 2018. DOI: 10.1111/1471-0307.12480

MEZAINI, A. *et al*. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2009, n. 678495, 2009. DOI: 10.1155/2009/678495

ØSTERGAARD, N. B.; EKLÖWB, A.; DALGAARD, P. Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter-and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 15-25, 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.012

PASQUALE, I. *et al*. Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. **Food Research International**, v. 116, p. 1344-1356, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.10.024

PEREIRA, G. V. M. *et al*. A review of selection criteria for starter culture development in the food fermentation industry. **Food Reviews International**, v. 36, n. 2, p. 135-167, 2020. DOI: 10.1080/87559129.20-19.1630636

PEREZ, R. H; ZENDO, T.; SONOMOTO. K. Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2085, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018. 02085

SANT'ANNA, F. M. *et al*. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, p. 592-601, 2017. DOI: 10.1111/1471-0307.12422

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 394-406, 2006. DOI: 10.1007/s00253-006-0427-1

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.023

SILVA, J. G. *et al*. In vitro assessment of the probiotic potential of lactobacilli isolated from Minas artisanal cheese produced in the Araxá region, Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 647-657, 2019. DOI: 10.1590/1678-4162-10188

SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 28-44, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6293

VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, v. 69, p. 61-64, 2016. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.04.032

VENEGAS-ORTEGA, M. G. *et al.* Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: a sustainable approach for healthier foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 4, p. 1039-1051, 2019. DOI: 10.1111/1541-4337.12455

WANG, C. *et al*. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 47, p. 231-236, 2015. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.06.034