

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS COMERCIALIZADOS EM BOTUCATU, SÃO PAULO

Marise Santiago Velame¹
Otávio Augusto Martins²
Juliano Gonçalves Pereira³

RESUMO

A utilização de BAL para obtenção de efeitos tecnológicos e seus metabólitos como bioconservantes são alternativas promissoras frente à utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biotecnológico de BAL isoladas de 43 queijos frescos comercializados em Botucatu – SP. As amostras foram submetidas ao isolamento de BAL, à avaliação da capacidade antagonista e a testes confirmatórios para determinação das melhores condições de multiplicação e produção de bacteriocinas à 25 °C, 30 °C e 37 °C/24 h, estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH (2, 4, 6, 8 e 10 por 2 h) e temperaturas (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). A atividade contra diferentes microrganismos também foi avaliada, além da especificação das espécies com potencial bacteriocinogênico. Os resultados do potencial antagonístico, mostraram que todas as cepas testadas foram inibidas em algum grau pelas BAL. Dos 108 isolados testados, 17 possuíam a capacidade de produzir bacteriocinas. Houve maior atividade bacteriocinogênica em temperaturas de 37 °C e 30 °C e em pH 2 e 6. 88,24% dos isolados, foram capazes de inibir *Listeria monocytogenes* após exposição a diferentes temperaturas.

Palavras-chave: ácido láctico; bacteriocina; bioconservante; capacidade antagonística; segurança de alimentos

CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM FRESH NON-INSPECTED CHEESES MARKETED IN BOTUCATU, SÃO PAULO

ABSTRACT

The use of LAB to obtain technological effects and its metabolites as biopreservatives are promising alternatives to the use of chemical additives in the food industry. In this context, the aim of this study was to evaluate the biotechnological potential of LAB isolated from 43 fresh cheeses sold in Botucatu - SP. The samples were submitted to BAL isolation, evaluation of antagonist capacity and confirmatory tests to determine the best conditions for multiplication and production of bacteriocins at 25 °C, 30 °C and 37 °C/24 h, stability of bacteriocins in different pH (2, 4, 6, 8 and 10 for 2 h) and temperatures (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). The activity against different microorganisms was also evaluated, in addition to specifying the species with bacteriocinogenic potential. The results of the antagonistic potential showed that all strains tested were inhibited to some degree by BAL. Of the 108 isolates tested, 17 had the

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/FMVZ *Correspondência: isevelame@hotmail.com

² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/FMVZ. otavio.a.martins@unesp.br

³ Docente da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/FMVZ. juliano.pereira@unesp.br

ability to produce bacteriocins. There was greater bacteriocinogenic activity at temperatures of 37 °C and 30 °C and at pH 2 and 6. 88.24% of the isolates were able to inhibit *Listeria monocytogenes* after exposure to different temperatures.

Keywords: lactic acid; bacteriocin; bioconservative; antagonistic capacity; food safety

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE QUESOS FRESCOS NO INSPECCIONADOS VENDIDOS EN BOTUCATU, SÃO PAULO

RESUMEN

El uso de BAL para obtener efectos tecnológicos y sus metabolitos como bioconservadores son alternativas prometedoras al uso de aditivos químicos en la industria alimentaria. En ese contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial biotecnológico de BAL aisladas de 43 quesos frescos vendidos en Botucatu - SP. Las muestras se sometieron a aislamiento de BAL, evaluación de capacidad antagonista y pruebas confirmatorias para determinar las mejores condiciones de multiplicación y producción de bacteriocinas a 25 °C, 30 °C y 37 °C/24 h, estabilidad de bacteriocinas a diferentes pH (2, 4, 6, 8 y 10 durante 2 h) y temperaturas (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). También se evaluó la actividad frente a diferentes microorganismos, además de especificar las especies con potencial bacteriocinogénico. Los resultados del potencial antagonístico mostraron que todas las cepas probadas fueron inhibidas en algún grado por BAL. De los 108 aislamientos probados, 17 tenían la capacidad de producir bacteriocinas. Hubo mayor actividad bacteriocinogénica a temperaturas de 37 °C y 30 °C y a pH 2 y 6. 88,24% de los aislados fueron capaces de inhibir *Listeria monocytogenes* tras la exposición a diferentes temperaturas.

Palabras clave: ácido láctico; bacteriocina; bioconservante; capacidad antagonística; Seguridad alimenticia

INTRODUÇÃO

O queijo fresco é bastante apreciado pelos brasileiros por ser de baixo custo, saboroso e prático de ser produzido. No Brasil, o leite utilizado na sua produção deve ser submetido a pasteurização ou tratamento térmico equivalente previamente, a fim de garantir a inocuidade do produto só sendo permitida a utilização de leite cru quando o queijo passa pelo processo de maturação por pelo menos 60 dias, como é o caso do queijo Minas artesanal, fabricado nas regiões das Serras da Canastra, Serro e Salitre, em Minas Gerais (1-2). No entanto, o comércio informal de leite e derivados ainda é uma realidade em muitas regiões brasileiras (3,4,5).

Na maioria das vezes, os queijos elaborados de forma “caseira”, são a base de leite cru, que apesar do risco existente quanto a patógenos de importância para a saúde pública como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micobacterium spp.* e *Brucella spp.*, também são compostos por uma microbiota autóctone rica em bactérias ácido lácticas (BAL). A maior parte das BAL, são seguras para o consumo humano e desempenham funções importantes para a produção de queijos, pois contribuem para a sua maturação, influenciam na textura, sabor e aroma do produto final, podendo ainda serem usadas na indústria de alimentos como culturas iniciais ou *starters*, probióticos e como biopreservantes (6,7,8,9,10,11).

A bioconservação de alimentos consiste na utilização de microrganismos benéficos ou de seus metabólitos na tecnologia da produção, tendo como resultado o aumento do tempo de

prateleira e a segurança microbiológica (12). Entre os microrganismos que podem ser utilizados como bioconservantes, sobressaem-se as BAL que possuem a capacidade de produzir substâncias inibidoras do crescimento microbiano (7-8). Dentre as substâncias produzidas pelas BAL, destacam-se as bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos) que possuem a capacidade de atuar contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (13-14). Quando combinadas com outras substâncias antimicrobianas ou tratamentos físicos, as bacteriocinas podem ser aplicadas como parte de uma tecnologia de barreira, com impacto positivo na preservação da qualidade e inocuidade do produto (15-16).

Tendo em vista essa notoriedade das BAL e busca por novas alternativas bioconservantes, o objetivo do presente trabalho foi isolar BAL com potencial antimicrobiano, determinar a capacidade antagônica frente a cepas de microrganismos patogênicos de interesse para a saúde pública, avaliar a atividade bacteriocinogênica e determinar as espécies com potencial bacteriocinogênico de queijos frescos comercializados em Botucatu - SP.

MATERIAL E MÉTODOS

O período de coleta das amostras ocorreu entre 6 de Maio de 2019 a 14 de Fevereiro de 2020, somando um total de 43 amostras de queijos frescos comercializados informalmente. Após a aquisição, os queijos foram identificados e acondicionados em caixas isotérmicas à 4 °C até o momento da análise, realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas do Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) - UNESP.

O isolamento de BAL com potencial bacteriocinogênico foi realizado pela técnica descrita por Todorov e Dicks (17) com algumas modificações. Foram pesadas assepticamente 25 g da amostra de queijo fresco em um saco plástico estéril e adicionados 225 mL de solução salina a 0,85% para efetuar a diluição da amostra. Homogeneizou-se no *stomacher* por 2 min, sendo essa diluição considerada a 10^{-1} . A partir da diluição de 10^{-1} , foram realizadas diluições seriadas até a diluição de 10^{-9} em tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,85%.

Em placas previamente preparadas e identificadas, contendo ágar De Man Rogosa e Sharpe (Ágar MRS), foram inoculados 0,1 mL de cada diluição e com auxílio da alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a placa de Petri até a sua total absorção. Após a secagem, foi distribuída uma sobrecamada de ágar MRS fundido em cada placa. Após a solidificação da sobrecamada, as placas foram colocadas em jarras de anaerobiose contendo gerador de atmosfera anaeróbica e incubadas em estufa a 30 °C por 72 h. Placas contendo até 50 colônias foram selecionadas para testes posteriores.

Confirmação de BAL

Foram realizadas a coloração de Gram seguindo as recomendações do fabricante (kit de coloração de Gram) e a prova de catalase. Foram consideradas como características de BAL (e passaram para as próximas etapas), as colônias que apresentavam padrões de cocos ou bacilos Gram-positivos e resultado negativo para a prova de catalase (18).

Avaliação da atividade antagônica de BAL pelo método “spot on the lawn”

Os isolados foram submetidos à avaliação do potencial de inibição de patógenos e deteriorantes, segundo Lewus e Montville (19), com algumas modificações. Em placas de Petri contendo ágar MRS, foram pipetados 10 µL do caldo MRS contendo as BAL isoladas, sendo o volume transferido para quatro pontos equidistantes. Após absorção, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após este período, foi realizada a sobrecamada com 10 mL de ágar BHI semi-sólido a 1% contendo 6 log UFC de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Typhimurium

ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 8739, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. Cada espécie inoculada foi testada separadamente em placas contendo ágar MRS. Após a solidificação, as placas foram novamente incubadas na estufa a 35 °C por mais 24 h. Foi realizada a leitura das placas com a medição dos halos de inibição formados, com a utilização de uma régua. As BAL que produziram halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro foram consideradas como potencialmente produtoras de bacteriocinas, sendo então submetidas aos testes de avaliação da capacidade de produção de bacteriocinas como descrito por Todorov e Dicks (20) e Pegoraro et al. (11).

Avaliação da atividade bacteriocinogênica de BAL - efeito antagônico do sobrenadante livre de células (SLC) de BAL

Os isolados foram cultivados em caldo MRS e incubados a 30 °C por 24 h. Após a incubação, o caldo foi centrifugado a 14.000 x g por 15 minutos, obtendo-se assim o SLC. Após a obtenção, o SLC teve seu pH ajustado para 6,5 com NaOH 1M, para prevenir o efeito inibitório em decorrência da produção de ácido láctico. Em seguida, os tubos contendo os SLC, foram tratados a 80 °C em um bloco aquecedor por 10 min, para inativar a ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Após este procedimento foi realizada a técnica “*spot on the lawn*” transferindo-se 10 µL de cada sobrenadante para placas contendo ágar BHI e após absorção, foi realizada a sobrecamada com ágar BHI contendo 6 log UFC de *L. monocytogenes* ATCC 422 e 7644 (microrganismos indicadores de produção de bacteriocina). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e após este período foi realizada a leitura do tamanho dos halos de inibição, sendo considerados positivos os SLC que produziram halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro frente aos microrganismos indicadores.

Confirmação da natureza proteica do SLC de BAL

Os sobrenadantes dos isolados confirmados na etapa anterior foram tratados com 0,1 mg/mL de proteinase K e incubados a 30 °C por 2 h. Em seguida, foram submetidos à temperatura de 98 °C por 2 min, para inativação da enzima. Após este procedimento, foi realizada a técnica “*spot on the lawn*” como descrito anteriormente. A perda da atividade antimicrobiana foi registrada como resultado positivo para produção de bacteriocina, confirmando a natureza proteica. Os isolados confirmados nesta etapa, foram submetidos a novos testes para a avaliação da temperatura ótima de produção de bacteriocinas e efeito do pH e da temperatura na sua produção.

Temperatura ótima de produção de bacteriocinas e diluição crítica

Os isolados selecionados foram incubados a 25 °C, 30 °C e 37 °C por 24 h em caldo MRS. Após este período, o SLC foi preparado como descrito anteriormente. Em seguida, foram submetidos ao método de diluição crítica em 10 mM Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) em pH 6.5 (11-21). A atividade da bacteriocina contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* 422 foi testada usando o teste local de ágar (20) e expressa em unidades arbitrárias (UA/mL), sendo calculada como segue: $ab \times 100$; onde “a” corresponde ao fator de diluição e “b” a última diluição que produziu halo de inibição de no mínimo 2 mm. Nos testes seguintes, foram utilizados os SLC a partir de isolados incubados na temperatura ótima de produção de bacteriocinas.

Efeito do pH sobre a produção de bacteriocinas por BAL

Foram produzidos SLC com ajuste de pH em diferentes valores (2, 4, 6, 8 e 10) utilizando HCl 1N ou NaOH 1N. Após 1 h de incubação a 30 °C, os sobrenadantes foram neutralizados a pH 6, tratados a 80 °C por 10 min, e a atividade bacteriocinogênica determinada pelo método de diluição crítica como indicado anteriormente frente aos microrganismos indicadores (*L. monocytogenes* ATCC 422 e 7644). As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C e avaliaram-se as diluições que produziram halos de inibição. O resultado foi expresso em UA/mL.

Efeito da temperatura sobre a produção de bacteriocinas por BAL

Os SLC foram incubados a 7 °C, 42 °C, 60 °C e 80 °C por 2 h, e a 121 °C/15 min. Após este período, o pH foi ajustado para 6, tratados a 80 °C por 10 min, e a atividade bacteriocinogênica determinada pelo método de diluição crítica. O resultado foi expresso em UA/mL.

Avaliação do espectro de inibição do SLC de BAL

Cada SLC foi obtido e tratado como descrito anteriormente e testado contra os seguintes alvos: *Bacillus cereus* NVH 0173/05 e 1600075-95, *Escherichia coli* ATCC 25922 e 8739, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Listeria monocytogenes* ATCC 506, 422 e 7644, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella* Thiphymurium ATCC 14028, *Salmonella* Heidelberg, *Serratia* 16GB, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Placas com cerca de 6 log UFC/mL de cada microrganismo foram preparadas e o “spot on the lawn” do SLC foi realizado. As placas foram incubadas nas melhores condições de crescimento de cada microrganismo alvo. Zonas de inibição maiores que 2 mm foram consideradas como positivas.

A identificação das espécies de BAL classificadas como produtoras de bacteriocinas, foi realizada pelo laboratório especializado, Qualileite da FMVZ/USP utilizando a técnica de *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade de microrganismos presentes nos queijos, pode ser procedente de vários fatores, dentre eles da própria matéria prima (leite), das etapas de produção, armazenamento, processamento e das condições higiênico sanitárias a que são submetidos. As BAL, desempenham funções importantes que contribuem tanto com o processo de maturação do queijo, como também, proporcionam uma ação bioprotetora através da competição por nutrientes com microrganismos indesejáveis (9-22).

Das 43 amostras de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP, foram isoladas 303 cepas suspeitas de BAL. Destas, 294 foram confirmadas pelas técnicas de Gram e catalase. Das 294 BAL, foram selecionadas 108 para o teste de antagonismo. Todos os 108 isolados apresentaram algum efeito antagonico frente aos microrganismos testados, produzindo halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro. O fato de haver atividade antagonista da BAL contra patógenos é muito relevante e tendo em vista que nem todas as cepas são produtoras de bacteriocina, e que seu efeito inibitório pode estar ocorrendo em decorrência da produção de diferentes substâncias, o SLC foi analisado para comprovar a natureza proteica uma vez que as bacteriocinas são peptídeos de baixo peso molecular e permanecem no

sobrenadante após a centrifugação. Deste modo, dos 108 isolados, 17 foram classificados como produtores de bacteriocinas (Tabela 1).

A temperatura de armazenamento do queijo durante e após a sua produção, é um importante fator que pode interferir na qualidade do produto, podendo influenciar diretamente tanto no crescimento das BAL, como no metabolismo e produção de bacteriocinas (11). Foi observado que nas temperaturas de 37 °C (exceto em 2 isolados - 22F e 37H) e 30 °C (exceto em 4 isolados – 22G, 26E, 37H e 43A) a atividade bacteriocinogênica foi maior quando comparada a 25 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura ótima de produção de substâncias inibidoras (em unidades arbitrárias/mL) por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades Arbitrárias/mL		
	25 °C	30 °C	37 °C
20B	800	1600	1600
20C	800	800	1600
22A	400	1600	3200
22E	800	800	3200
22F	800	800	<100
22G	1600	800	3200
26C	800	1600	1600
26D	800	800	1600
26E	1600	800	3200
35F	800	800	1600
36A	800	800	1600
36C	400	800	1600
37H	6400	800	3200
43A	6400	800	6400
43C	800	800	1600
43D	800	1600	3200
43E	800	1600	6400

Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Bromberg et al. (23), que avaliaram características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *L. monocytogenes* na carne bovina, tendo verificado que a produção foi maior a 37 °C comparativamente às demais temperaturas testadas (25 °C, 4 °C e -20 °C). Em seu estudo, Todorov (24) também registrou produção ótima da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* AMA-K apenas quando incubada a 30 °C ou 37 °C. Pegoraro et al. (11) e Todorov e Dicks (25) obtiveram melhores resultados em 25 °C e 30 °C.

O pH também pode exercer uma influência importante na atividade da bacteriocina, variando de acordo com a espécie produtora e o microrganismo alvo. No presente trabalho, foram observados que os pH que apresentaram maior atividade contra *L. monocytogenes* ATCC

422 e 7644 na temperatura considerada ideal para a produção da bacteriocina foram 2 e 6. No entanto, o pH 4 em 11 isolados, manteve a produção de bacteriocina constante ou aumentou um pouco a sua atividade, quando comparada com os pH 2 e 6 aqui considerados como melhores efeitos (Tabela 2). Segundo Paixão (35), os isolados de BAL que apresentam taxa de sobrevivência em pH 2 são considerados como tendo boa resistência a ácidos. Isso é importante pois para sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal humano e exercer a sua atividade probiótica as BAL, devem ser capazes de suportar o ambiente hostil do suco gástrico e dos sais biliares.

O isolado 22F registrou uma perda de atividade contra os microrganismos alvos durante o experimento. A perda de atividade também foi contabilizada em 14,7% (5 dos 34 isolados) por Pegoraro et al. (11). Noonpakdee et al. (26) verificaram que apesar da bacteriocina WNC 20 ser ativa em amplos valores de pH (entre 2 e 10), a sua atividade foi reduzida significativamente em pH básico. Neste estudo, também observamos uma queda em 58,82% (10 isolados) dos casos no pH 8 e 41,18% (7 isolados) no pH 10. Bromberg et al. (23) analisaram os efeitos da atividade da bacteriocina CTC 484 em diferentes pH em amostras de carne bovina e registraram nível máximo de atividade correspondendo a 1.600 UA/mL em valores de pH entre 2 e 4. Notaram que houve perda de 50% de sua atividade entre os valores de pH 6 a 9 e de 75% no pH 10. Em pH 12 houve uma completa inativação da atividade da bacteriocina.

Tabela 2. Efeito do pH na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
20B	3200	800	1600	400	400
20C	3200	1600	1600	400	800
22A	1600	1600	1600	800	1600
22E	3200	1600	1600	1600	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	1600	1600	800	400	1600
26C	1600	1600	1600	800	800
26D	800	800	1600	800	800
26E	800	1600	1600	1600	1600
35F	800	800	1600	800	1600
36A	1600	1600	800	800	1600
36C	800	1600	800	1600	1600
37H	800	1600	800	800	800
43A	3200	800	1600	1600	800
43C	1600	1600	1600	800	1600
43D	1600	1600	800	1600	1600
43E	1600	400	1600	1600	800

Além de inibirem o crescimento de microrganismos indesejáveis, as bacteriocinas podem ser utilizadas associadas ao tratamento térmico, uma vez que muitas permanecem estáveis quando submetidas ao aquecimento (27). Quando analisados os efeitos da temperatura sobre a atividade bacteriocinogênica do SLC, observamos que na maior parte dos casos, salvo algumas exceções, houve um decréscimo em relação a atividade bacteriocinogênica na medida em que foram submetidas a temperaturas mais altas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da temperatura na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	7 °C	42 °C	60 °C	80 °C	121 °C
20B	3200	1600	1600	800	400
20C	1600	1600	1600	1600	1600
22A	3200	3200	1600	800	800
22E	6400	3200	3200	800	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	<100	<100	<100	<100	<100
26C	1600	3200	3200	1600	1600
26D	1600	1600	1600	1600	800
26E	3200	6400	6400	3200	6400
35F	3200	3200	3200	1600	800
36A	1600	1600	1600	800	1600
36C	1600	1600	1600	800	400
37H	1600	3200	3200	800	1600
43A	3200	3200	3200	1600	1600
43C	3200	1600	1600	800	800
43D	3200	6400	6400	800	1600
43E	3200	1600	1600	800	800

No caso dos SLC dos isolados 22F e 22G verificamos que não houve efeito considerável da atividade independente da temperatura a que foi submetido (7 °C, 42 °C, 60 °C, 80 °C ou 121 °C) (Tabela 3). Isso pode ser em decorrência da perda progressiva do poder de ação das bacteriocinas sobre as cepas alvo. No entanto, apesar do decréscimo observado, os SLC produzidos a partir de 15 cepas de BAL (88,24%) foram capazes de inibir *L. monocytogenes* após exposição a 7 °C, 42 °C, 60 °C, 80 °C e 121 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Pegoraro et al. (11) onde as bacteriocinas se mostraram ativas em 88,2% dos casos quando expostas a temperaturas entre 7 °C e 80 °C e 11,8% mantendo seus efeitos mesmo após serem submetidas a temperaturas de esterilização. A atividade inibitória da cepa WNC 20 de *Lactococcus lactis* produtora de nisina estudada por Noonpakdee et al. (26), também não foi destruída pela exposição a temperatura elevada (121 °C) em pH 3, só sendo destruída com o aumento do pH.

Quanto ao teste de espectro de ação inibitório do SLC, ocorreu inibição frente às cepas de *L. monocytogenes* ATCC 506 (15 isolados – Exceto: 22F e 22G), *L. monocytogenes* ATCC 422 (11 isolados – Exceto: 22A, 36A, 36C, 37H, 43A e 43E) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (15 isolados – Exceto: 22F e 22G). Os SLC de BAL foram capazes de inibir ambas as cepas

de *L. monocytogenes* testadas. Já para as demais cepas testadas, os SLC não demonstraram resultados satisfatórios (sem formação de halo).

Resultados diferentes foram encontrados por Pegoraro et al. (11-28) que também analisaram amostras de queijos artesanais (do tipo colonial) e obtiveram resultados satisfatórios contra cepas Gram-positivas e negativas em 5 dos 34 isolados analisados. Apesar de ter um efeito maior sobre as bactérias Gram-positivas, principalmente sobre *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, as bacteriocinas também conseguem atuar sobre bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (23, 28, 29,30).

O grupo das BAL do gênero *Enterococcus* possui uma importância considerável no processo de maturação dos queijos e produtos cárneos fermentados, uma vez que através das suas ações glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas proporcionam características desejáveis a estes produtos. Além disso, algumas cepas são produtoras de enterocinas, responsáveis por inibir bactérias deteriorantes e patogênicas. Através da técnica MALDI-TOF, foram detectadas as seguintes espécies pertencentes a este grupo: *Enterococcus faecalis* (isolados 36A e 36C), *Enterococcus faecium* (isolados 20B, 20C, 22A, 22E, 22F, 26C, 26D, 26E, 35F, 37H, 43A, 43C, 43D e 43E) e *Enterococcus durans* (isolado 22G). As espécies encontradas no presente estudo, também foram detectadas em outras pesquisas de Bulut et al. (31), Ouadghiri et al. (32), Lima et al. (33) e Castro (34). Apesar das BAL proporcionarem características sensoriais desejáveis e únicas aos produtos, um aumento em grande proporção de *E. faecalis* não é desejável, pois pode indicar práticas inadequadas de higiene durante o processamento do produto (34).

Segundo Paixão (35) e Azhar, Akbar e Sadiq (36) os *Enterococcus spp.* isolados de fontes alimentares não estão associados a infecções clínicas, no entanto, o consumo de alimentos portadores de bactérias resistentes a antibióticos é uma possível causa da transferência dessa característica para a microbiota presente no hospedeiro. Dentre as variadas espécies pertencentes a este grupo, o *Enterococcus faecium* tem sido utilizado como probiótico ou cultura iniciadora em produtos alimentícios, e tem demonstrado efeitos benéficos quando utilizados no tratamento da síndrome do intestino irritável, diarreia associada a antibióticos, regulação imunológica e controle do nível de colesterol sérico em humanos. A União Europeia já autorizou o uso de várias cepas de *Enterococcus faecium* para uso como aditivos em alimentos e o Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP) também aprovou o uso da cepa *E. faecium* K77D em vários produtos lácteos fermentados como cultura inicial.

O conhecimento da microbiota láctica presente nos queijos, assim como do seu papel no desenvolvimento das características tecnológicas do produto são essenciais para que haja a melhoria e auxílio no desenvolvimento de novos fermentos lácteos, promovendo assim uma maior diversidade de queijos artesanais (8).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados, foram detectadas espécies produtoras de bacteriocinas que se mantiveram estáveis mesmo após serem submetidas a diferentes temperaturas e pH. As bacteriocinas produzidas foram capazes de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS

1. Perry KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Qim Nova [Internet]. 2004 [citado 10 Jul 2020];27(2):293-300. Disponível em:

- <https://www.scielo.br/j/qn/a/nrmhRjf7kXfPXszfrXmRh9m/> doi: 10.1590/S0100-40422004000200020.
2. Paula JCJ, Carvalho AF, Furtado MM. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Rev Inst Laticínios Candido Tostes [Internet]. 2009 [citado 11 Jul 2020];64(367-8):19-25. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/76/82>
 3. Chalita MAN. O Consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto. Rev Econ Sociol Rural [Internet]. 2012 [citado 6 Jul 2020];50(3):545-62. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/resr/a/9nKg8jK3hTybHVJkps7schs/?format=pdf&lang=pt>
 4. Almeida SL, Paiva FG Jr, Guerra JRF. Representação da produção e consumo do queijo coalho artesanal. RIGS [Internet]. 2013 [citado 1 Ago 2020];2(2):37-58. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/rigs/article/view/9870> doi: 10.9771/23172428rigs.v2i2.9870.
 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk and dairy products in human nutrition [Internet]. Rome: FAO; 2013 [citado 3 Jul 2020]. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>
 6. Barancelli GV, Silva-Cruz JV, Porto E, Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. Arq Inst Biol [Internet]. 2011 [citado 1 Jan 2021];78(1):155-68. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/bnRYSSXNWzxQ7fvWdvz3qqn/?lang=pt> doi: 10.1590/1808-1657v78p1552011.
 7. Beloti V. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Editora Planta; 2015.
 8. Bruno LM, Machado TF. Caracterização tecnológica de bactérias lácticas visando à sua aplicação na produção de fermentos lácticos [Internet]. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2017 [citado 16 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1069267/1/DOC17002.pdf>
 9. Giazzi A. Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru [dissertação] [Internet]. Londrina (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2017 [citado 21 Mar 2021]. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/3049/1/LD_PPGTAL_M_Giazz%20Amanda_2017.pdf
 10. Martins MGG. Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência [trabalho de conclusão de curso] [Internet]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2018 [citado 11 Jan 2021]. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB-BD9TZR/1/corre__o_monog_cd.pdf
 11. Pegoraro K, Sereno MJ, Cavicchioli VQ, Viana C, Nero LA, Bersot LS. Bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria isolated from artisanal colonial type-cheese. Arch Vet Sci [Internet]. 2020 [citado 16 Fev 2021];25(1):35-44. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/340566579_BACTERIOCINOGENIC_POTEN

TIAL_OF_LACTIC_ACID_BACTERIA_ISOLATED_FROM_ARTISANAL_COLONIAL_TYPE_-_CHEESE

12. Marques JL, Funck GD, Dannenberg GS, Cruxen CES, El Halal SLM, Dias ARG, et al. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. Food Microbiol [Internet]. 2017 [citado 20 Mar 2020];63:159-63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040164/> doi: 10.1016/j.fm.2016.11.008.
13. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol [Internet]. 2001 [citado 23 Abr 2020];71(1):1-20. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005608?via%3Dihub> doi: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8.
14. Ogaki MB, Furlaneto MC, Maia LF. Revisão: aspectos gerais das bacteriocinas. Braz J Food Technol [Internet]. 2015 [citado 5 Maio 2020];18(4):267-76. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/RWbydrVtbsPYBCcvphpKrvS/?lang=pt#> doi: 10.1590/1981-6723.2215.
15. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol [Internet]. 2007 [citado 5 Set 2020];13(4):194-9. Disponível em: <https://karger.com/mmb/article-pdf/13/4/194/3097557/000104752.pdf> doi: 10.1159/000104752.
16. Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. Food Control [Internet]. 2013 [citado 9 Ago 2020];32(1):134-42. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006275?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025.
17. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2005 [citado 4 Abr 2021];36(2-3):318-26. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102290400287X?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.
18. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5a ed. São Paulo: Blucher; 2017.
19. Lewus CB, Montville TJ. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J Microbiol Methods [Internet]. 1991 [citado 6 Maio 2020];13(2):145-50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129190014H?via%3Dihub> doi: 10.1016/0167-7012(91)90014-H.
20. Todorov SD, Dicks LMT. Screening of lactic-acid bacteria from south african barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. 2004 [citado 22 Ago 2020];49(4):406-10. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15530005/> doi: 10.1007/BF02931601.

21. Harting AM, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. In: Norris JR, Ribbons DW. Methods in microbiology. Cambridge: Academic Press; 1972. Chap. VII, p. 315-422. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70618-4.
22. Bruno LM, Carvalho JDG. Microbiota láctica de queijos artesanais [Internet]. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2009 [citado 15 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/748514/1/Doc124.pdf>
23. Bromberg R, Moreno I, Delboni RR, Cintra H. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. Cienc Tecnol Aliment [Internet]. 2006 [citado 8 Jan 2021];26(1):135-44. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/PtZ54qyVQLv7pnfvgy9ptTR/citation/?format=pdf&lang=pt>
24. Todorov SD. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. Braz J Microbiol [Internet]. 2008 [citado 9 Jan 2021];39(1):178-87. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/DZR4s5JXp9FvfQLFfbBXnDv/?lang=en> doi: 10.1590/S1517-83822008000100035.
25. Todorov SD, Dicks LMT. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiol Res [Internet]. 2006 [citado 9 Jan 2021];161(2):102-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000698?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.micres.2005.06.006.
26. Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panvim S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. Int J Food Microbiol [Internet]. 2003 [citado 4 Abr 2021];81(2):137-45. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502002192?via%3Dihub> doi: 10.1016/S0168-1605(02)00219-2.
27. Carvalho JDG. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas [tese] [Internet]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007 [citado 19 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/426721/1/CarvalhoJulianeDoeringGasparinD.pdf>
28. Pegoraro K, Sereno MJ, Belle TH, Barcellos VC, Bersot LS. Espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coloniais. In: Anais do 25o Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: A Árvore Que Sustenta a Vida [Internet]; 2016; Gramado (RS). Gramado: FAURGS; 2016 [citado 3 Fev 2021]. p. 1-6. Disponível em: <https://docplayer.com.br/84123657-Espectro-de-acao-das-bacteriocinas-produzidas-por-bacterias-acido-laticas-isoladas-de-queijos-coloniais.html>
29. Tulini FL, Gomes BC, Martinis ECP. Purificação parcial e caracterização de uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* 130 isolada de queijo muçarela. Cienc

- Tecnol Aliment [Internet]. 2011 [citado 8 Jan 2021];31(1):155-9. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/L3k5ZpcsVfHcDHDtwLjzFKx/?lang=en> doi: 10.1590/S0101-20612011000100022.
30. Contessa CR, Souza NB, Gonçalo GB, Almeida LS, Manera AP, Moraes CC. Estudo de resistência a cloreto de sódio de bacteriocina de *Lactobacillus sakei*. Rev CSBEA [Internet]. 2018 [citado 8 Jan 2021];4(1):82-8. Disponível em: <https://www.periodicos.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/13547/9494>
31. Bulut C, Gunes H, Okuklu B, Harsa S, Kilic S, Coban HS, et al. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. J Dairy Res [Internet]. 2005 [citado 6 Maio 2020];72:19-24. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/homofermentative-lactic-acid-bacteria-of-a-traditional-cheese-comlek-peyniri-from-cappadocia-region/FCBBDBA593460FDFA3123A98BEACC7C3#> doi: 10.1017/S0022029904000536.
32. Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M, Swings J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2005 [citado 2 Mar 2021];251(2):267-71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168579/> doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.012.
33. Lima CDLC, Lima LA, Cerqueira MMOP, Ferreira EG, Rosa CA. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec [Internet]. 2009 [citado 20 Mar 2021];61(1):266-72. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/5GMTXs8mKQxwzBJF5Pffx6y/?lang=pt#> doi: 10.1590/S0102-09352009000100037.
34. Castro RD. Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes - MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano [dissertação] [Internet]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2015 [citado 21 Mar 2021]. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-9VUJ9C/1/disserta_o_final_renata_dias_de_castro_corrigida.pdf
35. Paixão ISF. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal [dissertação] [Internet]. Petrolina (PE): Universidade Federal do Vale do São Francisco; 2016 [citado 21 Abr 2023]. Disponível em: <http://www.univasf.edu.br/~tcc/000007/000007b8.pdf>
36. Azhar F-U-A, Mehnaz S, Akbar A, Sadiq MB. Probiotic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from raw goat milk. Braz Arch Biol Technol [Internet]. 2022 [citado 21 Abr 2023];65:e22210091. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/krKh3DFp5r5vdz74DwGZ9bJ/?lang=en#> doi: 10.1590/1678-4324-2022210091.

Recebido em: 06/02/2023

Aceito em: 12/12/2023