



Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido láticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais

Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures

Maria Luiza Barros CABRAL, Meire dos Santos Falcão de LIMA, Gabriela Alves de ARAÚJO
Eduardo Felipe da COSTA, Ana Lúcia Figueiredo PORTO e Maria Taciana Holanda CAVALCANTI

Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais

Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures

ID JBFS1112016
DOI 10.18067/jbfs.v3i4.111

OPPEN ACCESS

Maria Luiza Barros Cabral¹, 

Meire dos Santos Falcão de Lima², 

Gabriela Alves de Araújo Fernandes¹, 

Eduardo Felipe da Costa¹, 

Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, 

Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{1, *, }

* Autor para correspondência:
mtcvsoares@yahoo.com.br

1. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

2. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Informações adicionais

Recebido em: 29/06/2016

Aceito em: 07/11/2016

Publicado em: 20/12/2016

Editor:

Victor Hugo Gomes Sales
Instituto Federal do Amapá, Macapá, AP,
jbfs@ifap.edu.br

Avaliação às cegas por pares

Processos de revisão

Prot. 1112016R01 (Brasil)

Prot. 1112016R02 (Brasil)



JBFS all rights

Copyright: © 2016

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar os aspectos tecnológicos de bactérias ácido lácticas isoladas a partir de queijo de coalho artesanal para o desenvolvimento de um fermento. Sendo assim, foi realizado isolamento, identificação clássica, capacidade acidificante (pH e produção de ácido láctico), proteolítica e antagonista de bactérias ácido-lácticas. Os resultados obtidos mostraram que a população bacteriana encontrada foi composta em sua maioria por cocos, com presença dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, e *Streptococcus*, além dos *Lactobacillus*, numa proporção aproximada de 1:3,5:13:2:1,5. Foram observadas bactérias classificadas como rápidas e lentas acidificantes, sendo esse equilíbrio importante para a formulação de um novo fermento. Em relação à capacidade proteolítica, no teste qualitativo de produção de proteases, poucas apresentaram halos, entretanto, todas produziram enzimas proteolíticas extracelulares, com pico de produção entre 24 e 48h de cultivo, chegando até 11,71 U/mL de atividade total. Um total de 42,2% das bactérias avaliadas apresentou atividade antagonista frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Pode-se, então, concluir que as bactérias ácido lácticas isoladas a partir dos queijos de coalho artesanais possuem características importantes para a indústria de produtos lácteos na utilização como culturas starters.

Palavras-chave: Capacidade acidificante. Protease extracelular. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Our study aimed to evaluate technological aspects of lactic acid bacteria isolated from artisan coalho cheese, for obtaining a new starter culture. For this purpose, different bacterial genera were isolated, identified and determined as their acidifying capacity (pH and lactic acid), antagonist activity and proteolytic activity. The results showed that the bacterial population consisted mostly of cocci, among which are *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* and *Streptococcus*, in addition to *Lactobacillus* in an approximate ratio of 1:3.5:13:2:1.5, respectively. The microorganisms were classified as fast and slow acidifying, an important balance to the formulation of a new starter culture. Regarding the proteolytic capacity, the qualitative test for protease production showed only few halos, although all extracellular extracts have presented proteolytic enzymes with peaks of production (maximum of 11.71 U/mL) between 24 and 48 hours of cultivation. Around 42.2% of the analyzed bacteria showed antagonistic activity against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Therefore, it is possible to assume that the lactic acid bacteria isolated from artisan Coalho cheese have great potential for the use in dairy industry as starter cultures.

Keywords: Acidifying capacity. Extracellular protease. Antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

O queijo de Coalho é produzido a partir de leite cru ou pasteurizado e possui um elevado valor comercial, devido à simples tecnologia aplicada, durante a sua fabricação, ao alto rendimento e à boa aceitação por parte dos consumidores.¹ Este alimento é fabricado principalmente no Nordeste do Brasil: Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba, tendo importância considerável na economia, apresentando impacto direto na renda dos produtores de leite, especialmente, aqueles que não têm acesso a plantas industriais de processamento de leite.²

A diversidade das bactérias ácido lácticas (BAL) é considerada o fator principal do diferencial sensorial desses produtos artesanais.³ O aroma dos queijos obtidos pela fermentação do leite cru é diretamente associado à raça, ao tipo de nutrição das fêmeas, ao processo de fabricação tradicional e à microbiota autóctone, que é responsável pela fermentação e maturação próprias da região produtora,⁴ fornecendo, assim, características diversificadas em locais diferentes.⁵

As BAL são empregadas na tecnologia de alimentos por causa de sua contribuição no aroma, textura, valor nutricional e segurança microbiológica em alimentos fermentados, além de serem produtoras de enzimas proteolíticas, exopolissacarídeos³ e substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas e antibióticos.⁶

Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL apresentam significativo efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. Esta atividade antagônica pode ser devido à competição por nutrientes, diminuição do potencial redutor, redução do pH, devido à produção de ácido láctico, produção de compostos inibidores, como peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e diacetil.⁷

A produção de derivados lácteos no Brasil utiliza culturas iniciadoras, comercializadas por empresas estrangeiras, no entanto, o mercado brasileiro tem potencial para isolamento de bactérias ácido lácticas de produtos artesanais, como o queijo de Coalho. O uso destas culturas fermentadoras de leite seria bastante útil na condução da formulação de novos produtos com características similares ao produto de origem destas estirpes.⁶ Assim, as BAL isoladas do queijo de coalho podem fortalecer o desenvolvimento de fermentos para a fabricação de derivados lácteos funcionais, pois já há comprovações de antagonismo *in vitro* frente a patógenos alimentares desses microrganismos.⁸

Inovações em alimentos lácteos têm apresentado avanços no mercado, numa taxa mais alta que a de outros produtos.^{9,10} O isolamento e o conhecimento das potencialidades tecnológicas de linhagens de BAL de nichos não investigados podem ser vantajosos por revelar

características de linhagens com particularidades funcionais interessantes.¹¹ Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar aspectos tecnológicos de bactérias ácido lácticas selvagens para a formulação de um fermento, utilizando cepas isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos em três municípios da região Agreste do Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

A) Isolamento das bactérias ácido lácticas do queijo de Coalho

Bactérias isoladas na temperatura de 30°C e 37°C a partir de três Queijos de Coalho artesanais produzidos nos municípios localizados dentro da Região Agreste do Estado de Pernambuco foram utilizadas neste estudo. Estes microrganismos foram caracterizados, previamente, como bactérias ácido lácticas por coloração de Gram e teste de catalase. Aproximadamente 200 amostras fazem parte da coleção de bactérias ácido lácticas pertencentes ao Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Labtecbio-UFRPE), dessas 42 (três com morfologia de bastão e 39 com morfologia de cocos) foram aleatoriamente escolhidas, sendo 12 do queijo do município de Venturosa, 14 do queijo do município de Arcoverde e 10 do queijo do município de Capoeiras e reativadas com passagens sucessivas em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 12% para a diferenciação nos principais gêneros reconhecidos e para a realização de todos os experimentos propostos neste trabalho.

B) Identificação das bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho

A diferenciação de gênero para as BAL com morfologia de cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) foi efetuada com base nos testes de crescimento dos isolados em caldo APT (Himedia, Índia) nas seguintes condições: temperatura de 10 e 45°C, pH de 4,4, e 9,6, teor de NaCl 6,5% e produção de CO₂ a partir da glicose. As BAL em formato de bastão (*Lactobacillus*) foram submetidas aos mesmos testes citados acima, no entanto foram incubadas respectivamente por dois e a cinco dias. Para a confirmação do gênero *Streptococcus*, foi realizado um teste adicional com crescimento a 60°C.

C) Capacidade acidificante das bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho

Para avaliação da capacidade acidificante e alteração de pH, foi utilizada a metodologia descrita por Franciosi et al.³ modificada, pela alteração nos tempos de avaliação do pH e teor de ácido láctico (0, 3 e 24h). As bactérias foram reativadas

como descrito acima, a seguir, foram crescidas por 18 horas em caldo APT, centrifugadas a 10.192x por 10 minutos, lavadas com água peptonada estéril e inoculadas 1% (v/v) em 9 mL de leite integral UHT, incubadas na mesma temperatura de isolamento de 30°C ou 37°C. A taxa de acidificação foi medida em pHmêtro (HANNA HI 2221, Roménia) e calculada de acordo com Ayad et al.¹². As cepas foram classificadas em rápidas, médias ou lentas, dependendo do tempo em que ocorreu a diferença de pH em 0,4U em relação ao valor inicial. A temperatura de incubação foi a mesma utilizada na reativação (30°C ou 37°C). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

D) Atividade proteolítica das bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho

Para a determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa, as bactérias foram semeadas em meio sólido composto por 1% (v/v) de leite desnatado e 1,5% de ágar, como descrito por Jones et al.,¹³ sendo as temperaturas de incubação modificadas, 30°C ou 37°C de acordo com a temperatura de isolamento de cada bactéria, sendo observada em intervalos de 24h durante três dias. A atividade proteolítica foi indicada como uma zona clara ao redor das colônias.

Para a determinação da atividade proteolítica extracelular quantitativa, as bactérias foram reativadas, depois inoculadas por mais 48h em meio MS-2. De acordo com Porto et al.¹⁴ consiste em 0,1% (p/v) NH₄Cl, 0,06% (p/v) MgSO₄·7H₂O, 0,453% (p/v) K₂HPO₄, e 0,1 mL de solução mineral (1 mg/mL FeSO₄·7H₂O, 1 mg/mL MnCl₂·4H₂O, 1 mg/mL ZnSO₄·H₂O e 1 mg/mL CaCl₂), a concentração final de soja foi de 2%, a modificação deste meio foi a troca da glicose pela adição de 1% de lactose. A seguir, as suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com a escala MacFarland para 10⁷ células/mL, sendo inoculadas em 20 mL do meio MS-2 e a fermentação conduzida em Erlenmeyers (125 mL). A incubação foi realizada na mesma temperatura de isolamento de cada bactéria (30± 2°C ou 37± 2°C), sob agitação a 150 rpm por 48 horas, em agitador orbital. Decorrido o tempo de incubação, a cultura foi centrifugada para obtenção do sobrenadante livre de célula para determinação quantitativa da atividade proteásica extracelular.

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo o método de Alencar et al.,¹⁵ em que uma unidade de atividade enzimática foi definida como a mudança de 0,01 de absorvância a 420 nm por minuto.

E) Atividade antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas do queijo de Coalho

A atividade antagonista foi realizada de acordo com Guedes Neto et al.,⁸ com a utilização de caldo MRS, para o gênero *Lactobacillus* e caldo APT para os demais cultivos de bactérias ácido lácticas e incubação em suas temperaturas ótimas (37°C para Enterococos ou 30°C para Lactococos), durante 24 horas. As cepas de patógenos de referência utilizadas como controle forma: *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665, crescidas em caldo BHI (*brain-heart-infusion*) a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. Após o crescimento das BAL, 5µL de cada cultivo, foram colocadas sobre um disco de papel disposto na superfície de uma placa de Petri, contendo Ágar MRS ou Ágar APT, em duplicata e incubadas sob aerobiose em suas temperaturas ótimas, durante 48 horas. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa, colocando-se nas suas tampas 1mL de clorofórmio, deixando-o agir por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram colocados 3,5mL de Agar semissólido contendo as bactérias controle. As placas contendo as cepas controle foram incubadas a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. A presença de um halo de inibição, independente do diâmetro, é indicativa do antagonismo.⁸

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados correspondem à média dos seus respectivos valores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação bioquímica revelou a diversidade de bactérias ácido lácticas presentes nos queijos artesanais, com predominância de cocos, sendo o gênero com maior número de BAL encontrado neste estudo o gênero *Enterococcus* (61,90%), seguido por *Leuconostoc* (16,60%), *Streptococcus* (9,52), *Lactobacillus* (7,14%) e os *Lactococcus* que representaram 4,72% das BAL isoladas.

Cocos também foram maioria nas pesquisas de Carvalho et al.¹⁶ e Cavalcante et al.¹⁷, A diversidade de espécies é relativa e depende, primeiramente, da natureza do material isolado e dos diferentes critérios usados em cada estudo.

O gênero *Enterococcus* foi predominante dentre as bactérias ácido lácticas isoladas, o que ocorreu também nos estudos com queijo de Coalho produzido na Paraíba¹⁸ e no Ceará.¹⁶ Esse gênero tem sido frequentemente mencionado como integrante da microbiota láctea de queijos no Brasil.¹⁷

Enterococcus spp são conhecidos em queijos pela produção de compostos voláteis (diacetil, acetaldeído e acetoina) e pela produção de enterocinas, que são fragmentos peptídicos capazes de inibir o crescimento de patógenos microbianos.¹⁹ A alta adaptabilidade e resistência desse gênero podem ser a justificativa para o seu desenvolvimento em vários tipos de derivados lácteos²⁰ e por prevalecerem principalmente em queijos artesanais.^{8,21}

Leuconostoc sp. também foram isolados por Freitas,¹⁸ em seu estudo sobre a microbiota láctea de leite cru, queijo de Coalho e soro de leite produzidos na Paraíba. Este gênero na produção de derivados lácteos é utilizado como coadjuvante na produção de aromas.²²

O gênero *Streptococcus* apresentou a terceira maior proporção dentre as BAL dos queijos de Coalho artesanais produzido em Pernambuco. A presença desses microrganismos também foi observada em queijos de Coalho produzidos em outros estados do nordeste brasileiro.^{16,17}

Os *Lactobacillus* se mostraram em pequena proporção (7,14%), isso provavelmente foi em decorrência da forma de isolamento realizada, sem a utilização de anaerobiose. Os nossos resultados foram diferentes do trabalho de Resende et al.¹⁹, quando estudou o queijo de minas artesanal da Serra da Canastra, pois eles observaram que o gênero foi o mais frequentemente isolado.

O gênero *Lactococcus* apresentou-se com o menor percentual, esse gênero é conhecido pela produção de ácidos orgânicos, além do ácido láctico e pela sua atividade proteolítica, que contribui para a produção de queijos, pois colabora com o *flavor* característico do produto.¹⁹ Nossos resultados não corroboraram com os apresentados por Guedes Neto et al.,⁸ que detectou grande incidência do gênero em queijos artesanais, nem com os apresentados por Ayad et al.,¹² cujo gênero foi predominante entre as BAL selvagens isoladas de produtos lácteos tradicionais do Egito.

Os resultados obtidos para caracterizar os isolados selecionados em relação ao seu comportamento no leite são mostrados na Tabela 1.

Os valores máximos de ácido para todos os isolados foram observados a 24h de análise, tendo os *Lactobacillus* alcançado os maiores valores entre 0,49% e 1,08% de ácido láctico em 3h e 24h, respectivamente. Os menores valores de acidez em 24h de análise foram do gênero *Streptococcus*, com 0,55% de ácido láctico, seguido pelo gênero *Lactococcus* com 0,67% de ácido láctico, sendo assim, considerados como lentos produtores de ácido.

Tratando-se do gênero *Streptococcus* apresentou rápida capacidade de acidificação, apenas durante as primeiras 3h de análise, com valor médio de 0,48% de ácido láctico, em 3h de acidificação. Esses resultados foram similares aos obtidos por Badis et al.²³ quanto à capacidade de acidificação observada pelo gênero *Streptococcus*. Estes autores em seu estudo sobre a identificação e propriedades tecnológicas de BAL isoladas de leite de cabra cru, de quatro raças da Algeria, consideraram a maioria das BAL do gênero *Streptococcus* como rápida produtora de ácido, mas diferiram dos nossos resultados quanto aos *Lactococcus*, que segundo os autores, também foram considerados como rápidos

produtores de ácido, chegando a produzir mais de 0,6% de ácido láctico em 18h de análise.

Em relação às bactérias ácido lácticas do gênero *Leuconostoc*, obtiveram valores médios de 0,35% e 0,75% de ácido láctico entre 3h a 24h, semelhante aos resultados relatados por Badis et al.,²³ em que amostras de *Leuconostoc* sp. apresentaram uma lenta produção de ácido láctico. Esse gênero é heterofermentativo e sensível a baixo pH, a condição ácida afeta o metabolismo deste tipo de micro-organismo, o *Leuconostoc lactis* é uma exceção, pois é capaz de acidificar o leite.

A velocidade de acidificação e a intensidade de produção de ácidos são dois aspectos importantes que devem ser considerados para a fermentação de produtos lácteos, isso porque, segundo Penna et al.²⁴, atividade acidificante de cada cepa está relacionada com a sua capacidade específica para quebrar as substâncias no meio e torná-las capazes de assimilação.

Todas as bactérias ácido lácticas isoladas dos queijos produzidos nos três municípios analisados podem ser consideradas como rápidas acidificantes de acordo com Ayad et al.¹², pois foram capazes de reduzir o valor do pH em 0,4U até 3h, em relação ao valor inicial do pH do leite.

Essa característica de reduzir o pH no início da fermentação é importante para a fabricação de queijos, já que é essencial para a coagulação e redução de microrganismos contaminantes¹². Além disso, a acidificação do produto a um pH próximo a 4 permite uma maior conservação do produto fermentado e auxilia na desoragem da coalhada e, mais, contribuem no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados.

Segundo Hansen,²⁵ essas bactérias ácido lácticas podem ser utilizadas para a fabricação de queijo Muçarela, que necessita dessa rápida obtenção do pH ideal para filagem (4,9-5,2), visando a diminuir o máximo a sinérese, durante a fermentação, e garantir a consistência adequada do produto.

Podemos observar ainda na Tabela 1 que em média as bactérias mais lentas na acidificação do leite foram as do gênero *Leuconostoc*. Esses resultados corroboram com os apresentados por Garabal et al.²⁶, em que as da espécie *Leuconostoc* sp. foram classificadas como lentas acidificantes, apesar de os valores finais terem sido maiores que os do presente estudo com pH 5,55 em 24h.

Essas bactérias podem ser utilizadas como parte de culturas secundárias, uma vez que uma atividade acidificante excessiva causa acidificação rápida do coágulo e alteração do teor de umidade do queijo, por isso o ideal é a combinação de cepas lentas e rápidas acidificantes.¹²

Tabela 1. Características de pH, acidez titulável, atividade proteásica e atividade antagonista das bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos na região Agreste de Pernambuco, Brasil.

Table 1. Characteristics of pH, titratable acidity, protease activity and antagonist activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese made on Agreste Region of Pernambuco State-Brazil.

Amostras	T (°C)	pH			Acidez Titulável (% de ácido láctico)			Atividade proteásica (U/mL)			Atividade antagonista		
		0 h	3 h	24 h	0 h	3 h	24 h	0h	24h	48h	1*	2*	3*
<i>Enterococcus</i> (61,90%)													
29V	37	6,39	5,18	4,33	0,19	0,35	1,69	0,12	1,37	0,18	+	+	+
67V	37	6,42	5,31	4,62	0,18	0,31	1,61	0,14	1,18	0,16	-	-	+
40V	37	6,66	4,98	3,87	0,17	0,4	0,71	0,16	1,25	7,84	+	+	+
42V	37	6,66	5,88	4,12	0,16	0,29	0,63	0,06	1,18	0,33	+	-	+
43V	37	6,66	6,01	4,35	0,16	0,2	0,52	0,06	1,77	3,05	+	-	+
82V	30	6,66	6,34	4,6	0,16	0,24	0,55	0,04	1,19	0,27	+	+	+
35V	37	6,25	4,76	4,57	0,2	0,46	0,72	0,11	1,11	0,23	+	+	+
20A	30	6,68	5,6	4,49	0,16	0,37	0,47	0,08	1,17	0,22	+	-	-
32A	30	6,66	5,06	4,48	0,16	0,78	0,5	0,63	0,07	0,24	+	+	+
66A	30	6,43	5,46	4,6	0,16	0,33	0,48	0,43	0,03	0,26	+	+	+
62A	30	6,53	5,5	4,55	0,17	0,28	0,48	0,86	0,09	0,75	+	+	+
68A	30	6,55	5,96	4,95	0,17	0,27	0,46	0,50	0,23	0,23	-	-	+
27A	37	6,77	6,64	5,28	0,16	0,2	0,51	0,12	1,14	0,28	-	-	-
61A	30	6,42	4,81	4,29	0,17	0,4	0,72	0,41	0,03	0,22	-	-	+
67A	30	6,49	4,8	4,24	0,17	0,42	0,71	0,42	0,10	0,22	-	+	+
56A	30	6,4	4,64	4,25	0,2	0,5	0,77	0,27	0,10	0,27	+	-	+
2C	37	6,39	5,57	4,97	0,2	0,34	0,46	0,08	1,12	0,12	+	+	+
5C	37	6,31	5,61	4,79	0,19	0,3	0,52	0,13	1,18	0,23	+	-	-
6C	37	6,43	5,75	4,68	0,19	0,29	0,52	0,15	1,24	0,28	-	-	-
7C	37	6,42	5,97	4,06	0,18	0,29	0,82	0,15	1,11	0,12	+	-	+
8C	37	6,29	5,5	4,91	0,22	0,36	0,46	0,15	1,16	0,18	+	+	+
10C	37	6,41	5,9	3,77	0,19	0,3	1,03	0,15	1,07	0,11	+	+	-
11C	30	6,36	5,7	4,71	0,19	0,33	0,55	0,18	1,17	0,17	+	+	+
14C	30	6,22	5,22	4,51	0,23	0,4	0,59	0,63	0,07	0,24	-	-	-
15C	30	6,42	6,13	3,84	0,22	0,23	0,57	0,53	0,10	0,27	-	-	+
Média		6,48± 0,15	5,53± 0,52	4,47± 0,37	0,18± 0,02	0,35± 0,12	0,68± 0,32	0,26± 0,22	0,81± 0,56	0,66± 1,60			
<i>Leuconostoc</i> (16,60%)													
68V	37	6,41	5,3	4,64	0,17	0,3	1,65	0,13	1,10	0,20	+	-	-
19V	30	6,48	5,55	5,01	0,16	0,28	0,55	0,36	0,05	0,31	+	-	-
47V	37	6,39	5,3	5,02	0,18	0,37	0,55	0,15	1,31	0,24	-	-	-
23A	37	6,74	6,24	5,04	0,17	0,27	0,56	0,13	1,20	0,16	+	+	+
49A	30	6,43	5,4	4,45	0,19	0,45	0,86	0,64	0,10	0,26	+	+	+
9C	37	6,15	5,33	4,76	0,22	0,36	0,52	0,12	1,13	0,19	+	-	-
12C	30	5,9	5,24	4,59	0,23	0,4	0,57	0,64	0,05	0,24	+	+	+
Média		6,36± 0,27	5,48± 0,35	4,79± 0,24	0,19± 0,03	0,35± 0,07	0,75± 0,41	0,31± 0,24	0,71± 0,60	0,23± 0,04			

Continua / To be continued

Amostras	T (°C)	pH			Acidez Titulável (% de ácido lático)			Atividade proteásica (U/mL)			Atividade antagonista		
		0 h	3 h	24 h	0 h	3 h	24 h	0h	24h	48h	1*	2*	3*
<i>Streptococcus</i> (9,52%)													
110V	30	6,47	5,42	4,42	0,17	0,35	0,71	0,52	0,49	0,23	+	+	+
24A	30	6,68	5,54	4,81	0,16	0,52	0,48	0,08	1,08	0,18	+	+	+
29A	30	6,54	4,98	4,41	0,15	0,67	0,49	0,53	0,08	0,20	+	-	+
51A	30	6,42	5,32	4,43	0,4	0,44	0,49	0,63	0,20	0,24	+	-	-
13C	30	6,22	5,27	4,46	0,23	0,4	0,59	0,46	0,09	0,18	-	+	+
Média		6,47± 0,17	5,31± 0,21	4,51± 0,17	0,22± 0,10	0,48± 0,13	0,55 ± 0,10	0,44± 0,20	0,39± 0,42	0,21± 0,02			
<i>Lactobacillus</i> (7,14%)													
56V	37	6,35	5,06	4,34	0,18	0,32	1,7	0,13	1,10	0,20	-	-	+
41V	37	6,55	5,06	3,89	0,18	0,42	0,68	0,27	1,38	11,72	+	-	-
96V	30	6,61	5,89	3,94	0,2	0,72	0,85	0,46	0,13	0,21	-	+	+
Média		6,45± 0,14	5,34± 0,48	4,06± 0,25	0,19± 0,01	0,49± 0,21	1,08± 0,55	0,29± 0,16	0,87± 0,65	4,04± 6,64			
<i>Lactococcus</i> (4,72%)													
57A	30	6,42	5,1	4,41	0,17	0,37	0,53	0,40	0,03	0,31	+	+	+
69A	30	6,42	4,82	4,28	0,2	0,48	0,81	0,56	0,23	0,18	-	+	+
Média		6,42± 0,00	4,96± 0,20	4,35± 0,09	0,19± 0,02	0,43± 0,08	0,67± 0,20	0,48± 0,11	0,13± 0,13	0,24± 0,09			

*1= *Escherichia coli*, 2= *Klebsiella pneumoniae* e 3= *Staphylococcus aureus*; + = presença de antagonismo, - = ausência de antagonismo.

*1= *Escherichia coli*, 2= *Klebsiella pneumoniae* e 3= *Staphylococcus aureus*; + = presence of antagonism, - = absence of antagonismo.

As bactérias selvagens estudadas neste trabalho apresentam potencial tecnológico promissor para produção de derivados do leite em indústrias, como as de culturas starters.

Duas bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* exibiram atividade proteolítica, ou seja, presença de halo; entretanto as demais cresceram, significando que apresentam enzimas proteolíticas, mas não apresentaram halo. Esses resultados foram similares aos de Silva,²⁷ que trabalhou com microbiota láctica isolada de queijo Muçarela de búfala e observou que uma cultura mesófila de *Lactobacillus* também teve atividade proteolítica.

Os resultados obtidos para a produção de proteases extracelulares se encontram na Tabela 1. Dentre as 42 BAL estudadas, duas cepas apresentaram altos valores de atividade enzimática 7,84U/mL, correspondendo a uma cepa de *Enterococcus* de 11,71 U/mL, correspondendo a uma cepa *Lactobacillus*. Estas se destacaram entre as demais por obter os maiores picos de produção em 48h. E, assim, a atividade proteolítica com o maior valor de produção foi relacionada ao gênero *Lactobacillus*.

Os resultados referentes à atividade antagonista estão apresentados na Tabela 1, entre estes podem ser observados que entre as 42 BAL testadas, 90% exibiram atividade antagonista frente a pelo menos uma cepa indicadora, apenas quatro cepas (10%) dos gêneros *Enterococcus* e *Leuconostoc* não conseguiram apresentar antagonismo em relação a nenhum dos micro-organismos testados (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*); Entre as bactérias que exibiram atividade antagonista, 42,2% inibiram as três bactérias indicadoras testadas; 28,9% inibiram pelo menos uma bactéria indicadora, e as demais (28,9%) apresentaram atividade inibitória contra duas das bactérias indicadoras.

As cepas de *Enterococcus* sp. apresentaram maior antagonismo frente as três bactérias de referência, seguidas dos *Leuconostoc* sp, *Streptococcus* sp. e *Lactococcus* sp. Entretanto, os maiores halos de inibição (16, 20 e 17 mm) foram produzidos por três *Streptococcus* contra a *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (dados não mostrados).

Esses resultados diferiram dos encontrados por Alexandre et al.,²⁸ que trabalharam com atividade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo-

de-minas artesanal do Serro (MG), frente a micro-organismos indicadores e observaram que a *Escherichia coli* não foi inibida por nenhum sobrenadante das bactérias ácido lácticas testadas pelos autores.

Bromberg et al.²⁹ analisaram a capacidade inibitória de uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e esta, por sua vez, inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* CTC 033, mas não foi capaz de inibir o crescimento de *Escherichia colinas* em mesmas condições de cultivo, mostrando, assim, que essa bacteriocina não foi efetiva contra bactérias Gram-negativas. Estes resultados concordam com os nossos, 42,2% das BAL que apresentaram atividades antagonistas não conseguiram inibir ao mesmo tempo cepas Gram positivas e Gram negativas, e isto pode ser devido à natureza da bacteriocina produzida.

No trabalho de Alexandre et al.²⁸, aproximadamente 15% das bactérias ácido lácticas isoladas conseguiram inibir cepas de *Staphylococcus aureus*, esses valores foram inferiores aos nossos resultados, nos quais aproximadamente 71,4% das BAL apresentaram antagonismo contra essa espécie.

Dentre as cepas de *Lactobacillus* isoladas, apenas uma conseguiu inibir *Escherichia coli*. Esses resultados diferiram dos apresentados por Chioda et al.,²⁹ quando analisaram a capacidade de *Lactobacillus acidophilus* em inibir o crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” e verificaram que todas as cepas de *Lactobacillus* mostraram-se capazes de inibir a bactéria alvo.

Vários trabalhos descrevem atividade antagonista de bactérias ácido lácticas frente a outras bactérias Gram-positivas,^{8,28,29} entretanto contra as bactérias Gram-negativas, o antagonismo não é frequente, mas já houve relatos desse tipo de inibição.^{30,31}

As atividades antagonistas, juntamente à capacidade de acidificação e produção de proteases, representam fatores importantes na tecnologia de alimentos. É justamente por produzirem e tolerarem uma grande concentração de ácido láctico que elas conseguem inibir outros micro-organismos nos alimentos, incluindo os patogênicos.

Tendo em vista a importância socioeconômica e de saúde pública da fabricação de novos fermentos biológicos constituídos por novas cepas bactérias ácido lácticas, as quais estão sendo bastante estudadas para uma melhor utilização nesses e em outros alimentos. Além disso, a utilização delas como bioconservadores mostra-se como alternativa na conservação de produtos alimentícios.⁶

CONCLUSÕES

As 42 bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho artesanais produzidos nos municípios avaliados foram promissoras em relação a aspectos tecnológicos importantes

para a indústria de laticínios, por serem capazes de sobreviver à acidificação láctea, de produzir proteases e substâncias como bacteriocinas, já que foi observada a inibição do crescimento de patógenos em 90% das BAL neste trabalho. Sendo esse fato relevante para a segurança microbiológica do alimento a ser produzido com estes micro-organismos. Pode-se, então, concluir que estas cepas possuem características importantes para a indústria de produtos lácteos na utilização como culturas *starters*.

CONTRIBUIÇÃO AUTORES

Os autores Maria Luiza Barros Cabral, Meire dos Santos Falcão de Lima, Gabriela Alves de Araújo Fernandes e Eduardo Felipe da Costa participaram na condução do experimento.

As autoras Ana Lúcia Figueiredo Porto e Maria Taciana Holanda Cavalcanti do planejamento, orientação e da revisão final do artigo.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

FINANCIAMENTO

Os autores reportam que houve suporte e auxílio financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa pelo CNPQ processo (557665/2009-4).

COMO CITAR O ARTIGO

ABNT

CABRAL, Maria Luiza Barros et al. Queijos artesanais fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. **Journal of bioenergy and food science**, v.3, n.4, p.207-215, 2016. DOI:10.18067/jbfs.v3i4.112.

APA

Cabral, M., Lima, M., Fernandes, G., Costa, E., Porto, A., & Cavalcanti, M. (2016). Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais *Journal of Bioenergy and Food Science*, 3(4), p.207-215. DOI:10.18067/jbfs.v3i4.112

REFERÊNCIAS

- (1).QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, n.2, p.538-544, 2013. DOI:10.1016/j.lwt.2012.08.011
- (2).SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA

- FILHO, J. L. Can artisanal "Coalho" cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 35, n.1, p.1533-1538, 2012. DOI:[10.1016/j.foodchem.2012.06.058](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.058)
- (3).FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. 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](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.008)
- (4).DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANTSIU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.25, n.2, p.392-399, 2008. DOI:[10.1016/j.fm.2007.09.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.006)
- (5).SILVA, R.A.; BISMARA, P.A.; MOURA, R.B.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.1732-1738, 2012. DOI:[10.1590/S0102-09352012000600044](https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000600044)
- (6).VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C.; RESENDE, M. F. S.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.460-467, 2010. DOI:[10.1590/S0102-09352010000200028](https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000200028)
- (7). POPPI, L. B.; MANCILHA, I. M.; FERREIRA, A. J. P.; LEAL, D. D. M. Nota prévia: Avaliação do efeito antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Listeria monocytogenes* in vitro. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n.2, p.113-119, 2008.
- (8). GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; Nunes, A.C.; Nicoli, J.R.; Santos, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.245-250, 2005. DOI:[10.1590/S0102-09352005000800017](https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000800017)
- (9). LIMA, M. S.; RÉVILLION, J. P.P.; PÁDULA, A. D. Estratégias competitivas e de desenvolvimento de produtos lácteos funcionais: estudos de caso em empresas agroindustriais da região Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p.1547-1551, 2009. DOI:[10.1590/S0103-84782009005000134](https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000134)
- (10). SOARES, D. S.; FAI, A. E. C.; OLIVEIRA, A. M.; PIRES, E. M. F.; STAMFORD, T. L. M. The use of cheese whey for probiotic yogurt production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.996-1002, 2011. DOI:[10.1590/S0102-09352011000400027](https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000400027)
- (11). MEIRA, S. M. M.; HELFER, V.E.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, n.12, p.75-80, 2010. DOI:[10.4260/BJFT20101304112](https://doi.org/10.4260/BJFT20101304112)
- (12). AYAD, E. H. E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, n.6, p.715-725, 2004. DOI:[10.1016/j.fm.2004.02.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.009)
- (13).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. **Applied Microbiology**, v.45, n.4, p.418-420, 2007. DOI:[10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02202.x)
- (14).PORTO, A. L. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M.; FILHO, J. L. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.60, n.2, p.115-122, 1996. DOI:[10.1007/BF02788066](https://doi.org/10.1007/BF02788066)
- (15). ALENCAR, R. B; BIONDI, M.M.; PAIVA, P.M.G.; VIEIRA, V.L.A.; JUNIOR, L.B.C. Alkaline Proteases from the Digestive Tract of Four Tropical Fishes. **Brazilian Journal Food Technology**, v.6, n.2, p.279-284, 2003.
- (16).CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Avaliação da Capacidade de Produção de Ácido por Bactérias Ácido Isoladas de Leite e de Queijos de Coalho Artesanais produzidos no Ceará. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.61, n.351, p. 306-309, 2006.
- (17).CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L.L.F.; PINTO, C.L.O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.27, n.1, p.205-214, 2007. DOI:[10.1590/S0101-20612007000100036](https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100036)
- (18).FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.1, p.35-42, 2013.
- (19).RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.; NUNES, A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011. DOI:[10.1590/S0102-09352011000600039](https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600039)
- (20). MARTÍN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, n.1, p.24-32, 2009. DOI:[10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010)
- (21). SANTOS, K.M.O.; VIEIRA, A.D.S.; ROCHA, C.R. C.; NASCIMENTO, J. C.F.; LOPES, A.C.S.; BRUNO, L.M.; CARVALHO, J.D.G.; FRANCO, B.D.G.M.; TODOROV, S.D. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v.1, n.4 p.1-9, 2014. DOI:[10.1007/s13213-013-0789-4](https://doi.org/10.1007/s13213-013-0789-4)
- (22).DE PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from

Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v.7, n.2, p.1-13, 2014. DOI:[10.1007/s13213-014-0933-9](https://doi.org/10.1007/s13213-014-0933-9)

(23). BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; HENNIC, D.E.; TORNADIJOD, M.E.; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v.21, n.3, p.343-349, 2003. DOI:[10.1016/S0740-0020\(03\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00072-8)

(24). PENNA, A. L. B.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; DIAMANTINO, V. R.; SILVA, L. F. Overview of the functional lactic acid bacteria in the fermented milk products. **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods**, v. 1, p. 100-154, 2015.

(25).HANSEN, C. O papel das culturas lácticas na fabricação de muçarela. **Food Ingredients Brasil**, n 23, p. 26-27, 2012.

(26).GARABAL, J. I.; ALONSO, P.R.; CENTEN, J. A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). **LWT-Food Science and Technology**, v.41, n.8, p.1452-1458, 2007. DOI:[10.1016/j.lwt.2007.09.004](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.004)

(27).SILVA, L. F.; CASELLA, T.; GOMES, E. S.; NOGUEIRA, M. C. L.; DEA- LINDNER, J.; PENNA, A. L. B. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella Cheese. **Journal of Food Science**, v.80, n.2, p.411-417, 2015. DOI:[10.1111/1750-3841.12771](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12771)

(28).ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. 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, p.424-428, 2002. DOI:[10.1590/S0102-09352002000400014](https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000400014)

(29).BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.135-144, 2006. DOI:[10.1590/S0101-20612006000100023](https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000100023)

(30).CHIODA T.P; SCHOCKEN-ITURRINO R. P.; GARCIA G. R.; PIGATTO C. P.; C. A. M. RIBEIRO; RAGAZZANI A. V. F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, 2007. DOI:[10.1590/S0103-84782007000200048](https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000200048)

(31).JATOBÁ, A.; VIEIRA F. N.; NETO C. B.; SILVA B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO G. T.; DOTTA, G.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilapia-do-nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.9, p.1201-1207, 2008. DOI:[10.1590/S0100-204X2008000900015](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000900015)