

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

KELLEN BIUDES DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DO SORO-FERMENTO
DE QUEIJO PORUNGO COM POTENCIAL TECNOLÓGICO**

SOROCABA- SP

2023

KELLEN BIUDES DOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DO SORO-FERMENTO
DE QUEIJO PORUNGO COM POTENCIAL TECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho

SOROCABA- SP

2023

Kellen Biudes dos, Santos

**Bioprospecção de bactérias lácticas isoladas do soro-fermento de queijo Porungo com potencial tecnológico / Santos Kellen Biudes dos -- 2023.
66f.**

**Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Natan de Jesus Pimentel Filho
Banca Examinadora: Natan de Jesus Pimentel Filho,
Maria Cristina Dantas Vanetti, João Batista Ribeiro
Bibliografia**

1. Bactéria do ácido láctico. 2. Biotecnologia. 3. Queijo artesanal de leite cru. I. Kellen Biudes dos, Santos. II. Título.

**Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)**

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

**Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979**

DEDICATÓRIA

Com todo meu amor, dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que estiveram ao meu lado nestes dois anos de mestrado. Agradeço a Deus por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Márcia e Donizeti, ao meu irmão Daniel, e minha tia Cristina por todo apoio, carinho e suporte para a minha formação.

Ao meu orientador Prof. Natan Pimentel por todo o conhecimento valioso compartilhado ao longo do processo. Sua dedicação e orientação foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional.

As minhas amigas Helena, Laura, Maria Letícia, Naira e Maria Isabel que sempre me apoiaram nessa caminhada.

Aos produtores de queijo Porungo de Campina do Monte Alegre e Angatuba que nos receberam em suas propriedades e cederam as amostras.

Ao Prof. Naaman Nogueira pelos ensinamentos e cooperação no projeto.

Ao Prof. Guilherme Martin e Bianca Hosken pela colaboração na pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e suporte.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, que me ajudaram a crescer e evoluir academicamente.

A todos que participaram desta etapa da minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

SANTOS, Kellen Biudes, M. Sc., Universidade Federal de São Carlos, Julho de 2023. **Bioprospecção de bactérias lácticas isoladas do soro-fermento de queijo Porungo com potencial tecnológico.** Orientador: Natan de Jesus Pimentel Filho.

Os produtos lácteos artesanais geralmente possuem microbiota desconhecida devido aos métodos tradicionais e do leite proveniente de animais mantidos pelos produtores. A partir disso, conhecer a estrutura microbiana existente através de análises dos genomas é uma estratégia para descobrir os tipos e abundância dos microrganismos presentes. Objetivando isolar bactérias lácticas com potencial biotecnológico do soro-fermento utilizado na fabricação de queijo Porungo, amostras foram coletadas em sete diferentes unidades produtoras. As amostras de soro foram diluídas e plaqueadas sobre a superfície dos ágaros Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS), M17 e Slanetz Bartley obtendo-se 84 isolados que foram caracterizados fenotipicamente quanto à morfologia, coloração de Gram, presença de catalase e submetidos ao sequenciamento do gene rDNA 16S para identificação. As atividades antimicrobiana, proteolítica e lipolítica foram avaliadas. Aspectos de segurança incluindo atividade hemolítica, DNase e coagulase também foram analisados. O potencial biotecnológico (crescimento, capacidade de acidificação, atividades proteolítica e lipolítica) foi avaliado em oito isolados selecionados e utilizados na elaboração de leite fermentado. Dos 84 isolados encontrados, foi observado que a maioria eram bactérias Gram-positivas na forma de cocos (91,7 %) e cocobacilos (8,3 %), e um isolado catalase-positivo. Os gêneros de maior ocorrência encontrados nas amostras de soro-fermento de queijo, após as análises de sequenciamento do rRNA 16S, foram *Streptococcus* (51,2%), *Lactococcus* (27,4%), seguido por *Leuconostoc* (5,95%) e *Staphylococcus* (5,95%), *Enterococcus* (2,4%), *Enterobacter* (1,2%) e *Pseudomonas* (1,2%). Não foram indentificados 4,76% dos isolados. Foi possível observar maior atividade antimicrobiana nos sobrenadantes neutralizados centrifugados obtidos após 48 h de incubação a 30 °C. O isolado QP60 (*Lactococcus* sp.) foi aquele que apresentou maior constância nos resultados e poder inibitório nos testes realizados. Atividade proteolítica foi observada em 96,4% dos isolados, enquanto apenas 13,1% apresentaram atividade lipolítica. Testes de DNase e coagulase foram negativos em todos os isolados, a hemólise foi ausente em 59,5% dos isolados enquanto 5,95% deles apresentaram hemólise total e 34,5% hemólise parcial. Os isolados selecionados para análise do potencial biotecnológico apresentaram atividade de lipólise e, os melhores resultados de proteólise foram obtidos com o isolado QP83 (*Lactococcus* sp.), QP40 (*Lactococcus* sp.), QP32 (*Streptococcus* sp.) e QP79 (*Lactococcus* sp.). O potencial

de produção de ácidos, avaliado pela determinação do pH do leite fermentado, foi maior no isolado QP40 que reduziu o pH de 6,8 para 4,6 em 10 h. Em todas as amostras houve o aumento da acidez titulável. O isolado QP40 apresentou, no tempo 15 dias, o maior valor de acidez e crescimento de 7,4 log UFC/mL. Esta pesquisa apresenta relevância, pois apresenta resultados inéditos sobre a microbiota existentes no soro-fermento de queijo Porungo. O potencial biotecnológico dos isolados de *Streptococcus* e *Lactococcus* quanto às atividades antimicrobianas, proteólise e lipólise apresentaram resultados favoráveis, indicando que alguns isolados são promissores para uso tecnológico e aplicações em pesquisas mais aprofundadas.

Palavras- chave: Bactéria do ácido láctico; Biotecnologia; Queijo artesanal de leite cru.

ABSTRACT

SANTOS, Kellen Biudes, M. Sc. Universidade Federal de São Carlos, July 2023. **Bioprospection of lactic acid bacteria isolated from Porungo cheese fermented whey with technological potential.** Advisor: Natan de Jesus Pimentel Filho.

Artisanal dairy products often harbor an unknown microbiota due to traditional methods and the use of milk from animals kept by producers. In light of this, elucidating the existing microbial structure through genome analysis serves as a strategy to uncover the types and abundance of present microorganisms. With the aim of isolating lactic acid bacteria with biotechnological potential from fermented whey used in the production of Porungo cheese, samples were collected from seven different production units. Whey samples were diluted and plated onto the surfaces of agar media including Man, Rogosa & Sharpe (MRS) agar, M17 agar, and Slanetz Bartley agar. This yielded 84 isolates, which were phenotypically characterized for morphology, Gram staining, catalase presence, and subjected to 16S rDNA gene sequencing for identification. Antimicrobial, proteolytic, and lipolytic activities were evaluated. Safety aspects, including hemolytic activity, DNase, and coagulase, were also examined. The biotechnological potential (growth, acidification capability, proteolytic and lipolytic activities) was assessed in eight selected isolates and utilized in the production of fermented milk. Of the 84 isolates obtained, the majority were Gram-positive bacteria in the form of cocci (91.7%) and cocobacilli (8.3%), with one catalase-positive isolate. The most prevalent genera found in the cheese fermented whey samples, as determined by 16S rRNA sequencing, were *Streptococcus* (51.2%), *Lactococcus* (27.4%), followed by *Leuconostoc* (5.95%), *Staphylococcus* (5.95%), *Enterococcus* (2.4%), *Enterobacter* (1.2%), and *Pseudomonas* (1.2%). 4.76% of the isolates were unidentified. Enhanced antimicrobial activity was observed in neutralized and centrifuged supernatants after 48 hours of incubation at 30 °C. Isolate QP60 (*Lactococcus* sp.) consistently exhibited robust results and inhibitory potential in the tests performed. Proteolytic activity was observed in 96.4% of the isolates, while only 13.1% demonstrated lipolytic activity. DNase and coagulase tests were negative in all isolates; hemolysis was absent in 59.5% of isolates, while 5.95% exhibited complete hemolysis and 34.5% showed partial hemolysis. Selected isolates assessed for biotechnological potential displayed lipolytic activity, and the most favorable proteolytic results were observed with isolates QP83 (*Lactococcus* sp.), QP40 (*Lactococcus* sp.), QP32 (*Streptococcus* sp.), and QP79 (*Lactococcus* sp.). Acid production potential, as evaluated by fermented milk pH determination, was highest in isolate QP40, reducing the pH from 6.8 to 4.6 in 10 hours. All samples exhibited an increase in titratable acidity. By day 15,

isolate QP40 presented the highest acidity value and a growth of 7.4 log CFU/mL. This research holds significance as it presents novel findings on the microbiota within Porungo cheese fermented ferment. The biotechnological potential of *Streptococcus* and *Lactococcus* isolates, concerning antimicrobial, proteolytic, and lipolytic activities, displayed favorable outcomes, indicating that certain isolates hold promise for technological use and warrant further in-depth research endeavors.

Keywords: Lactic acid bacteria; Biotechnology; Raw milk artisanal cheese.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de contaminantes nas amostras de soro fermento determinadas em diferentes meios de cultivo expressas em Log ₁₀	32
Tabela 2 - Características fenotípicas dos isolados obtidos de soro-fermento utilizado na produção do queijo Porungo.....	33
Tabela 3 - Identificação dos isolados do soro do queijo Porungo	36
Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados dos isolados a partir de soro-fermento do queijo Porungo.	41
Tabela 5 - Atividade enzimática proteolítica e atividade lipolítica dos isolados	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos gêneros de bactérias isoladas do soro-fermento de queijo Porungo	36
Figura 2 - Árvore filogenética mostrando a posição relativa dos isolados obtidos a partir de soro-fermento de queijo Porungo baseado nas sequências de rRNA 16S	38
Figura 2 - <i>Continuação</i>	39
Figura 3 - Atividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de soro-fermento de queijo Porungo.....	44
Figura 4 - Atividades de proteólise e lipólise dos isolados de BAL obtidos a partir de soro-fermento de queijo Porungo.	48
Figura 5 - Atividade de hemólise dos isolados de BAL obtidos de soro-fermento de queijo Porungo.....	50
Figura 6 - Potencial fermentativo de isolados de BAL em leite integral	52
Figura 7 - Teor de nitrogênio não proteico em leites fermentados com BAL isoladas de soro-fermento de queijo Porungo	54
Figura 8 - Concentração de ácidos graxos livres em leites fermentados com BAL isoladas de soro de queijo Porungo	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	QUEIJO PORUNGO	15
2.2	BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO	16
2.3	ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR BAL	18
2.3.1	Peptídeos antimicrobianos	19
2.3.2	Ácido lático	20
2.4	ENZIMAS	21
2.5	PROBIÓTICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	ISOLAMENTO DE BAL	25
3.1.1	Coleta de amostras	25
3.1.2	Contagem e isolamento de BAL no soro-fermento	25
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL	26
3.2.1	Coloração diferencial de Gram e teste de catalase	26
3.3	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL	26
3.4	POTENCIAL ANTIMICROBIANO DAS BAL	27
3.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE BAL	28
3.5.1	Atividade proteolítica	28
3.5.2	Atividade lipolítica	28
3.6	ASPECTOS DE SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE BAL	29
3.6.1	Produção de DNase	29
3.6.2	Teste de coagulase	29
3.6.3	Teste de hemólise	29
3.7	POTENCIAL APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL NA ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO	29
3.7.1	Capacidade de acidificação do leite e crescimento bacteriano	30
3.7.2	Proteólise	30

3.7.3 Lipólise	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BAL OBTIDAS A PARTIR DE SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO (QP)	32
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DO SORO-FERMENTO DO QUEIJO PORUNGO	39
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE BAL	44
4.4 ASPECTOS DE SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE BAL	49
4.5 POTENCIAL APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL SELECIONADOS NA ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO	50
4.5.1 Potencial fermentativo de isolados de BAL	50
4.5.2 Avaliação de proteólise	54
4.5.3 Avaliação da lipólise	56
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os queijos artesanais de diversas regiões do mundo possuem diferentes propriedades com relação aos aspectos sensoriais, fazendo com que o produto lácteo apresente característica marcante e única. Na região sudoeste do Estado de São Paulo é tradicional a produção e comercialização do queijo Porungo, um queijo de massa filada elaborado a partir de leite cru por pequenos produtores (SILVA et al., 2020).

Os produtos lácteos artesanais geralmente possuem uma microbiota desconhecida devido aos métodos tradicionais, equipamentos e utensílios próprios de pequena escala e leite proveniente de animais mantidos pelos produtores (SILVA et al., 2020). A partir disso, conhecer a diversidade microbiana existente através de análises dos genomas, é uma estratégia para descobrir os tipos e abundância dos microrganismos presentes (ZHENG et al., 2018). A microbiota envolvida na produção e a variedade das práticas de fabricação nas diferentes áreas geográficas torna o mapeamento microbiológico desses produtos relevante (KAMIMURA et al., 2018).

Na maioria dos estudos já realizados, as bactérias do ácido láctico (BAL) foram consideradas dominantes em amostras de queijo. Em produtos lácteos, BAL são responsáveis pela acidificação e coagulação, contribuindo para os aspectos sensoriais e nutricionais (GOSHI et al., 2019; ZHENG et al., 2018).

As BAL são geralmente consideradas bactérias benéficas, pois desempenham um papel importante na fermentação dos alimentos, sendo hoje avaliadas como o grupo mais importante de microrganismos industriais. Estão presentes em muitos produtos lácteos, incluindo manteiga, leite fermentado, queijos, iogurtes e nata. A sua aplicação depende essencialmente de suas características únicas como o metabolismo da lactose e a produção de ácido láctico, que através da fermentação transformam a matéria-prima e inibem a deterioração e o crescimento de patógenos. Além disso, são responsáveis pela produção de compostos aromáticos desejáveis, voláteis e não voláteis (HATTI-KAUL et al., 2018; ILLIKOUD et al., 2021; SARHIR et al., 2023).

Essas bactérias são principalmente anaeróbias, não esporuladas e necessitam de condições nutricionais ricas para crescimento. A propriedade acidificante é uma característica importante das BAL uma vez que a redução do pH modifica as características sensoriais, além de proporcionar segurança ao produto final (SILVA et al., 2020). Cepas capazes de produzir ácido rapidamente são eficientes na produção de ácido láctico, que acidificam o leite,

aumentando assim a atividade de enzimas como proteases e degradando rapidamente as proteínas em pequenos peptídeos (SHEN et al., 2022).

Matérias-primas ricas em gorduras e proteínas como o leite, são hidrolisadas, respectivamente, por enzimas lipases e proteases produzidas por BAL, contribuindo para os atributos sensoriais. BAL não realizam a biofixação de nitrogênio, sendo seu crescimento em leite depende de seu sistema proteolítico para degradar proteínas e peptídeos e, então, atender às necessidades de aminoácidos (GAO et al., 2022; JUILLARD et al., 1995).

Em geral, as BAL são capazes de produzir uma diversidade de enzimas, como proteases, β -galactosidase, lipases e assim aumentar a digestibilidade dos produtos devido a hidrólise realizada, auxiliando na absorção dos nutrientes e diminuindo a irritabilidade em indivíduos com intolerância e alergias (STEELE; BROADBENT; KOK 2013; URIOT et al., 2017).

Como atividades antimicrobianas, essas bactérias possuem a capacidade de sintetizar compostos antagônicos, como as bacteriocinas, que são peptídeos que atuam contra microrganismos deterioradores e patogênicos, tendo como atributo a ação como conservante natural em alimentos. Devido à tendência de aumento nas preferências do consumidor por conservantes seguros e naturais, a aplicação de bacteriocinas se torna uma alternativa para combater patógenos veiculados por alimentos. Portanto, encontrar ou desenvolver uma nova geração de agentes antimicrobianos se torna cada vez mais importante (BANGAR et al., 2022; VERMA et al., 2022).

Comparada à capacidade fermentativa, as BAL possuem pouca atividade proteolítica e lipolítica, sendo importantes mais estudos sobre essas propriedades. Isolados de BAL com estas atividades poderiam ser utilizadas no desdobramento de proteínas e lipídeos presentes no leite, além do metabolismo da lactose, a fim de gerar um produto com alta digestibilidade. Assim, este trabalho objetivou obter e caracterizar isolados de bactérias lácticas obtidos a partir de sorofermento de queijo Porungo quanto ao potencial antimicrobiano, proteolítico e lipolítico para aplicações tecnológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJO PORUNGO

O queijo é um dos alimentos fermentados mais consumidos em todo o mundo e a procura por queijos artesanais tem aumentado nos últimos anos. Os queijos artesanais possuem relevante importância histórica, socioeconômica e cultural para as comunidades tradicionais

brasileiras, se destacando pela tradição do processo de fabricação, que é transmitida de geração em geração, mantendo suas características únicas quando comparadas aos produtos industrializados. A grande variedade de microrganismos presentes no ambiente, juntamente com técnicas particulares de produção de queijos, são os fatores responsáveis por conferir às variedades artesanais de queijos as características distintas, típicas das regiões em que são fabricados (MARGALHO et al., 2020; MARTINS et al., 2018).

A produção de queijos artesanais é uma atividade cultural importante em muitas regiões do mundo, e os microrganismos presentes nestes queijos são responsáveis por grande parte de suas características sensoriais e funcionais. Estudos têm mostrado que a biodiversidade microbiana nos queijos artesanais é extremamente variada, apresentando um notável potencial biotecnológico e funcional a ser explorado. Essa biodiversidade engloba leveduras, fungos e, principalmente, BAL (MARGALHO et al., 2020).

A presença de uma microbiota endógena específica em cada região de produção, confere aos queijos características sensoriais próprias de aroma, sabor e textura. Os microrganismos presentes nos queijos artesanais são semelhantes à microbiota do leite cru, que é influenciada pelos microrganismos presentes na pele do animal, no solo, no ar, na alimentação e em outros componentes do ambiente de produção do leite, incluindo condições de fabricação e armazenamento, além da influência da localização geográfica e condições climáticas (ALLAM et al., 2017; GONTIJO et al., 2020).

O queijo Porungo é um queijo artesanal de massa filada produzido por agricultores familiares de alguns municípios localizados na região Sudoeste Paulista. O nome “Porungo” está relacionado à forma do queijo, que se assemelha com a porunga, fruto da trepadeira *Lagenaria siceraria*. Para a produção do queijo Porungo utiliza-se o leite cru a 35 °C, coalho e o soro-fermento advindo do soro drenado da produção do dia anterior, conhecida como “repique” ou soro-fermento, que contém as culturas microbianas importantes para a obtenção do queijo. Este soro-fermento permanece à temperatura ambiente de um dia para o outro, permitindo o desenvolvimento de BAL (SILVA et al., 2020).

2.2 BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO

BAL estão presentes naturalmente no ambiente e podem ser isoladas de produtos alimentícios de origem animal e vegetal, e também do trato gastrointestinal humano, e são classificadas como Geralmente Reconhecidas como Seguras do inglês *Generally Recognized*

As *Safe* - GRAS (MARGALHO et al., 2020). Essas bactérias podem ser encontradas no leite de vaca, camelos, cabra, ovelha e também no leite humano (RAMA et al., 2019).

As BAL possuem como características serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, imóveis, anaeróbias, e também são aerotolerantes, fastidiosas com relação a alguns aminoácidos e possuem considerável tolerância a ácidos, o que lhes confere vantagem competitiva sobre outras bactérias (OLIVEIRA et al., 2018).

Essas bactérias são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de desenvolver-se em temperaturas de 5 a 45 °C e podem crescer em valores de pH baixos como 3,8. Produzem elevado número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (ARAUJO, 2017).

BAL pertencem a ordem *Lactobacillales*, entre os principais gêneros estão: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (DABA; ELKHATEEB, 2020). A classificação de BAL em diferentes gêneros é baseado na morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido, tolerância ao teor de sal e ácidos (MOTTA; GOMES, 2015).

É importante mencionar que os nomes das espécies de *Lactobacillus* foram atualizados segundo a reorganização proposta por Zheng et al. (2020), a partir da qual o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado em 23 novos gêneros considerando-se aspectos genotípicos, fenotípicos e ecológicos, sendo eles: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* e *Secundilactobacillus*.

O metabolismo das BAL pode ser classificado de acordo com seus padrões de fermentação, em três grupos: homofermentadores, heterofermentadores e heterofermentadores facultativos. Homofermentativos metabolizam hexoses pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) tendo o ácido láctico como produto principal. Heterofermentativos metabolizam hexoses e pentoses através da via 6-fosfogluconato-fosfocetolase (6-PG) e produzem ácido láctico, bem como dióxido de carbono, etanol ou ácido acético. As heterofermentadoras facultativas podem

usar ambas as vias sendo capazes de fermentar hexoses por meio da via EMP e pentoses pela via 6-PG (CAMESASCA et al., 2021).

As BAL homofermentativas são utilizadas como culturas iniciadoras com função de promover rápida acidificação de produtos alimentícios. Já as heterofermentativas, atuam como agentes de culturas não iniciais, destinadas principalmente ao aumento da qualidade sensorial devido às suas atividades glicolítica, lipolítica e proteolítica, bem como pela produção de diacetil que também oferece sabor e aromas aos alimentos (RAMA et al., 2019).

As culturas de BAL de interesse comercial são isoladas, purificadas, e submetidas a métodos de concentração ou secagem, como por exemplo, pelos métodos de liofilização e secagem por pulverização, a fim de serem utilizadas na indústria em geral, seja farmacêutica, têxtil ou de alimentos. A cultura obtida através desses métodos deve ser capaz de continuar viável para os processamentos seguintes, além do período de armazenamento (RAMA et al., 2019).

A produção do ácido láctico pelas BAL confere características sensoriais ao alimento, mas também atua como agente antimicrobiano, pois acidifica o meio e, assim, inibe o crescimento de patógenos como *Salmonella* spp. e *Clostridium botulinum*. Com a redução do pH intracelular devido à acidificação, a força próton motora entra em colapso, levando à inibição do transporte de nutrientes, comprometendo o metabolismo de patógenos (ASHAULO, 2020). Além da produção de ácido outras substâncias produzidas por BAL atuam como antimicrobianos como é o caso dos peptídeos antimicrobianos.

2.3 ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR BAL

Tanto os alimentos *in natura* quanto os processados estão sujeitos à ação de microrganismos durante a cadeia de produção e distribuição, podendo causar sérios problemas de segurança alimentar. Portanto, o controle eficaz do crescimento de patógenos e deterioradores é a principal medida usada para evitar esse problema. Conservantes químicos são frequentemente usados para inibir o crescimento de microrganismos, porém nos últimos anos, estes tem sido gradualmente substituídos por bioconservantes, que podem apresentar maior segurança além de serem eficazes nas etapas de processamento de alimentos (DABA; ELKHATEEB, 2020; WANG et al., 2022).

As BAL são capazes de produzir metabólitos antimicrobianos que melhoram as propriedades de preservação biológica, como os peptídeos antimicrobianos também chamados de bacteriocinas como nisina, reuterociclina, pediocina, lacticina e sacacina, ácidos orgânicos

como láctico, acético, fórmico e propiônico, enzimas, etanol, diacetil, peróxido de hidrogênio e dióxido de carbono. Todos os compostos citados veem sendo estudados e empregados como bioconservantes em diversos alimentos (ARRIOJA-BRETON et al., 2020).

A atividade antimicrobiana das BAL pode ser descrita por três mecanismos, sendo eles a produção metabólica de ácidos orgânicos que proporcionam um ambiente ácido, a competição por nutrientes e a formação de compostos antimicrobianos, como a produção de peptídeos antimicrobianos (PENG et al., 2020).

2.3.1 Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são descritos como moléculas de baixo peso molecular, produzidos por diversos tipos de células animais, vegetais e microbianas fazendo parte do sistema imune, possuindo atividade biológica contra bactérias, vírus e fungos (SILVEIRA; ROQUE-BORDA; VICENTE, 2021). Os peptídeos antimicrobianos de BAL são considerados bioconservantes promissores e naturais, utilizados em substituição ou redução ao uso de conservantes sintéticos, ao controle de antibióticos e diminuição de tratamentos térmicos, que na maioria das vezes modificam as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (PENG et al., 2020).

Os PAMs apresentam atividades contra patógenos nocivos em alimentos, atuando na preservação biológica e como conservante natural devido aos seus efeitos bactericidas ou bacteriostáticos. Os PAMs não induzem a resistência, sendo uma alternativa promissora aos antibióticos como substâncias antibacterianas. Os principais mecanismos de ação dos PAMs estão relacionados à danos na membrana e parede celular microbianas, inibição da respiração celular, influenciando a expressão e regulação da transcrição gênica e alterando a síntese de ácidos nucleicos e as funções celulares (WANG et al., 2022).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias e, em sua maioria, são consideradas conservantes seguros em alimentos, devido à capacidade de serem facilmente digeridas no corpo humano por serem sensíveis à ação das enzimas proteases. Podem ser classificadas como bactericidas (com ou sem lise celular) ou bacteriostáticas (que inibem o crescimento celular) (KIRTONIA et al., 2021).

Bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente por diferentes gêneros de bactérias e secretadas no ambiente (MANZOOR; TAYYEB, 2019). As bacteriocinas produzidas por BAL são geralmente caracterizadas como tolerantes a estresse térmico, ativas em ampla faixa de pH, incolores, inodoras, de baixa toxicidade e facilmente degradadas por enzimas proteolíticas.

Algumas bacteriocinas apresentam alta especificidade contra cepas bacterianas selecionadas devido a receptores específicos na membrana celular. Assim, são capazes de exercer atividade antimicrobiana contra várias bactérias, patogênicas e não patogênicas, tornando-se ferramentas biotecnológicas potenciais em diferentes segmentos industriais (DABA; ELKHATEEB, 2020; O'CONNOR et al., 2020).

Em geral, o modo de ação das bacteriocinas ocorre pela interação com a membrana celular bacteriana, onde tem-se a permeabilização celular pelos peptídeos levando à formação de poros nas bactérias alvo. A colicina foi a primeira bacteriocina identificada, produzida por uma cepa de *Escherichia coli* e, desde então, diversas outras foram identificadas em diferentes microrganismos (KUMARIYA et al., 2019). A pediocina produzida por *Pediococcus* sp. é bastante utilizada, pois possui potencial para estender a vida útil de uma variedade de produtos prontos para consumo levando também à inibição do patógeno *Listeria monocytogenes* (KASSAA et al., 2020).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo considerada segura pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) (KASSAA et al., 2020). O mecanismo de ação envolve sua ligação ao lipídeo II, precursor da parede celular, levando à formação de poros na membrana celular bacteriana, fazendo com que os compostos de baixo peso molecular extravasem, enfraquecendo a força próton motora, causando a morte celular (ASHAULO, 2020).

As bacteriocinas fazem parte do grupo de aditivos naturais que atendem às demandas de consumidores conscientes por conservantes de alimentos de origem natural, em substituição aos conservantes químicos prejudiciais usados atualmente. As bacteriocinas podem ser utilizadas em diferentes tipos de alimentos e de diversas formas, podendo ser adicionadas diretamente na forma purificada ou semipurificada, e pela inoculação da cepa produtora do peptídeo no alimento (DABA; ELKHATEEB, 2020; KAYA et al., 2019).

2.3.2 Ácido láctico

A biopreservação é um meio natural de conservação que envolve o uso de microrganismos ou seus produtos naturais. As BAL têm grande potencial para uso em biopreservação, pois produzem substâncias antimicrobianas sendo o ácido láctico o mais abundante e destinado a diversos usos (KUMARIYA et al., 2019).

O ácido láctico é um ácido orgânico reconhecido como seguro (*status* GRAS) sendo utilizado para diferentes fins, como alimentícios e farmacêuticos (ABEDI; HASHEMI, 2020).

Pode ser produzido por síntese química ou fermentação microbiana, porém a produção por síntese química possui alto custo e o uso de vários compostos altamente tóxicos, como metanol e ácido cianídrico, além da produção de metabólicos que podem causar problemas aos humanos. Assim, a fermentação microbiana é mais vantajosa devido a utilização de carboidratos renováveis para a produção de ácido láctico (CAMESASCA et al., 2021).

Diversos substratos são utilizados para a obtenção de ácido láctico como glicose, sacarose, lactose, maltose, manose, xilose e galactose, gerando um produto puro e com menores custos de purificação. Porém, para que o uso seja mais amplo em diferentes áreas biotecnológicas usa-se matéria-prima renovável incluindo resíduos industriais como, por exemplo, hidrolisado de palha de milho da indústria de bioetanol, vinhaça, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca, palha de trigo, de arroz, de soja, farelo de cevada, resíduos alimentares, resíduos sólidos urbanos, casca de banana, como matéria-prima para a fermentação de ácido láctico por serem mais baratas em comparação aos substratos refinados que são mais caros (CAMESASCA et al., 2021; CHEN et al., 2020).

O ácido láctico possui uma ampla variedade de usos no processamento industrial de cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e químicos atuando como matéria-prima para uma ampla variedade de compostos comerciais de valor agregado. Na indústria de alimentos é utilizado como acidulante, conservante, agente aromatizante, emulsificante e regulador de pH, na fabricação de alimentos lácteos, bebidas, produtos de panificação, alimentos em conserva e suplementos probióticos (NWAMBA et al., 2021).

2.4 ENZIMAS

O leite cru pode conter mais de 60 enzimas, e muitas delas são resistentes a processos térmicos como a pasteurização. Entre as enzimas nativas encontradas pode-se citar a lipoproteína lipase, proteases, fosfatase ácida e alcalina, xantina oxidoreductase e sulfidril oxidase, lactoperoxidase e γ -glutamyl-transpeptidase (KOCABAS et al., 2022).

Aproximadamente 200 tipos de enzimas microbianas estão disponíveis comercialmente, dentre as quais as hidrolases são utilizadas para a degradação de diversas substâncias naturais, participando de processos de biotransformações, devido à sua ampla especificidade de substrato, acessibilidade comercial, ausência de dependência de cofatores e capacidade de trabalhar em altas concentrações de substrato, tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos (KOCABAS; LYNE; USTUNOL, 2022).

As principais enzimas utilizadas em produtos lácteos são proteases, coalhos e quimosina, lipases e lactases. Durante a fermentação láctica, proteases, lipases e β -galactosidases liberam compostos voláteis responsáveis pelos perfis sensoriais distintos de produtos lácteos, influenciam na digestibilidade e valor nutricional. Além disso, as cepas de BAL estão envolvidas na redução dos níveis de lactose, galactose e proteínas alergênicas, prevenindo intolerância à lactose, galactosemia e, ou algumas reações alérgicas (AGAGUNDUZ et al., 2022).

Proteases e peptidases são enzimas hidrolíticas que atuam em ligações peptídicas, liberando peptídeos e aminoácidos de cadeias polipeptídicas ou peptídicas. Essas enzimas podem ser descritas como endopeptidases ou proteinases que clivam preferencialmente as porções internas das cadeias polipeptídicas, ou em exopeptidases que atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região C e N terminal. Também são subdivididas em proteases ácidas, neutras e alcalinas, de acordo com o pH de ação (MASKE et al., 2021).

As enzimas proteases e peptidases fazem parte dos processos de fermentação das BAL nos alimentos, onde a principal função é o catabolismo de moléculas de proteínas, oligopeptídeos e aminoácidos para o crescimento e manutenção das células microbianas. Essa atividade produz efeitos de desenvolvimento de sabor, redução de amargor e liberação de peptídeos bioativos no produto alimentício (MASKE et al., 2021). Quando esses aminoácidos livres são catabolizados, compostos de aroma voláteis, incluindo ácidos, aldeídos, álcoois e ésteres, ou compostos de enxofre são formados (AGAGUNDUZ et al., 2022).

A protease também está relacionada à mudança do perfil sensorial, causando tanto efeitos flavorizantes desejáveis quanto indesejáveis como o amargor, além da gelificação em produtos lácteos. Isso ocorre devido à resistência das proteinases aos tratamentos térmicos aplicados durante o processamento do leite em ultra alta temperatura (UAT) (YANG et al., 2021).

As β -galactosidases ou lactases pertencem a quatro famílias diferentes de glicosídeo hidrolase (GH1, GH2, GH35 e GH42), e foram caracterizadas em todos os domínios da vida. Na reação, as β -galactosidases hidrolisam a lactose e liberam galactose e glicose. Esta característica tem sido utilizada por muitas indústrias alimentícias para degradar a lactose e melhorar a digestibilidade, doçura, solubilidade e sabor dos produtos lácteos. Fontes microbianas são preferíveis devido à sua facilidade de produção fermentativa, alta atividade e boa estabilidade (LU et al., 2020; MASKE et al., 2021). Uma estratégia industrial é a utilização de β -galactosidases na diminuição das quantidades de lactose em produtos derivados do leite,

onde estas enzimas são imobilizadas em reator de banho. Essa é uma alternativa simples, porém onerosa, portanto, a caracterização de enzimas mais eficientes, estáveis e com perfis variados de atividade é extremamente importante (GODOY, 2016).

As lipases pertencem à classe de hidrolases (triacilglicerol-acil-hidrolase) e são capazes de quebrar as ligações éster encontradas nos triacilglicerídeos, formando os diacilgliceróis (DG), monoacilgliceróis (MG) e ácidos graxos livres (FFA). Entre as enzimas comerciais, as lipases têm grande potencial para uso industrial devido à sua versatilidade em catalisar processos hidrolíticos e sintéticos. Essa enzima participa de diferentes estratégias *in vitro*, como esterificação, transesterificação, interesterificação (SAMPAIO et al., 2022).

As lipases de origem microbiana são preferíveis para serem aplicadas na indústria pelo fato dos microrganismos crescerem rapidamente e serem facilmente manipulados geneticamente. Além disso, oferecem diversas vantagens, pois podem ser usadas em amplas faixas de pH e temperatura, reconhecem uma grande variedade de substratos, e podem apresentar uma alta especificidade, altos rendimentos, baixo consumo de energia e redução do tempo de processamento e custos de produção (SALGADO; SANTOS; VANETTI, 2022; SAMPAIO et al., 2022).

As lipases possuem um sítio ativo formado por uma tríade catalítica composta por histidina, serina e ácido aspártico ou glutâmico. A maioria delas possui uma cadeia polipeptídica cobrindo seu sítio ativo denominado *lid* (tampa). Quando o sítio ativo está coberto pela *lid* diz-se que as lipases estão em conformação fechada, ficando seu centro ativo isolado do meio reacional e, geralmente, inativo (SAMPAIO et al., 2022).

As enzimas hidrolíticas na indústria de laticínios são cruciais para alcançar as qualidades sensoriais desejadas, incluindo textura, sabor e aroma, sendo necessário constantes estudos sobre o perfil de solubilidade, grau especificidade e dosagem, com a finalidade de obter produtos lácteos de qualidade (KOCABAS et al., 2022).

2.5 PROBIÓTICOS

As BAL apresentam grande potencial para serem utilizadas como probióticos. A palavra probiótico é o mesmo que “para a vida” em grego e segundo a FAO possuem o significado de “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

A maioria dos microrganismos probióticos utilizados atualmente são originários do intestino humano. As BAL mais utilizadas como probióticos são do gênero *Lactobacillus*,

Enterococcus e *Leuconostoc*. Para serem considerados probióticos devem ser resistentes aos processamentos dos alimentos, ou da produção de fármacos e até da atividade digestiva do organismo do hospedeiro. Sendo assim, os microrganismos probióticos devem estar estáveis e viáveis ao passar pelo trato digestivo para realizar a atividade e benefícios esperados ao hospedeiro, portanto devem ser resistentes à exposição a ácidos e ao pH baixo do estômago que podem causar danos à membrana celular, DNA e proteínas microbianas. Com isso, essas bactérias devem ter a capacidade de aderir à mucosa intestinal e células epiteliais, e assim, multiplicar, colonizar e modular o sistema imunológico, suprimindo competitivamente os patógenos (ASHAULO et al., 2020).

O consumo de probióticos tem efeitos benéficos na prevenção de várias doenças e diferentes cepas exercem efeitos adversos no organismo. Estudos relatam que probióticos possuem ligação com a redução da pressão arterial e hipertensão; melhora o nível de colesterol no sangue; controle da diabetes e obesidade; melhora o sistema imunológico; prevenção de infecções intestinais; supressão de diarreia associada a antibióticos; melhoras dos sintomas associados a distúrbios gastrointestinais como intolerância a lactose, intestino irritável; melhora da enterocolite necrosante; redução do risco de câncer de cólon; melhoria da digestão do glúten; prevenção de alergias e dermatite atópica e, estudo recentes mostram que cepas probióticas podem atuar como reforço imunológico contra o vírus da COVID-19 (LILO-PEREZ et al., 2021; URIOT et al., 2017; ZENDEBOOD et al., 2020). A ingestão de probióticos ocorre pelo consumo de alimentos como produtos lácteos fermentados, iogurtes, queijos, kefir, chucrutes, dentre outros e com suplementação alimentar através de comprimidos em pó e líquidos. A ingestão de probióticos tem-se mostrado eficaz não só para humanos, mas também para alimentação de animais como as aves e suínos. A administração mínima para obter um impacto potencial na saúde em alimentos probióticos é de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL (ROOBAB et al., 2020).

Os queijos artesanais têm se destacado por sua grande variedade de bactérias, principalmente BAL. Além disso, essas bactérias apresentam uma ampla diversidade de funções que podem ser aplicadas de forma benéfica na elaboração de diversos produtos alimentícios. Portanto, torna-se importante a prospecção de novas BAL em matérias primas ainda não exploradas quanto ao potencial bacteriocinogênico, proteolítico e lipolítico para aplicações tecnológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DE BAL

3.1.1 Coleta de amostras

As amostras de soro-fermento foram obtidas em sete unidades produtoras de queijo Porungo localizadas nas cidades de Campina do Monte Alegre e Angatuba, na região sudoeste do estado de São Paulo. As amostras de 100 mL foram coletadas durante a produção do queijo, no momento exato em que o soro é adicionado ao leite recém-ordenhado juntamente com o coalho. O soro-fermento utilizado na produção do queijo é coletado em garrafas plásticas durante a dessoragem do queijo produzido no dia anterior. Este soro é armazenado à temperatura ambiente até a sua utilização na produção do dia seguinte. As amostras foram contidas em frascos reagentes estéreis e imediatamente transportadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Natureza sob refrigeração. As amostras foram mantidas a 4 °C até o momento das análises.

3.1.2 Contagem e isolamento de BAL no soro-fermento

A contagem de BAL iniciou-se com a diluição dos soros-fermento em água tamponada peptonada. Alíquotas de 0,1 mL das diluições decimais foram inoculadas em placas de Petri contendo três diferentes meios de cultivo seletivos: Agar De Man, Rogosa & Sharpe (MRS; Oxoid, EUA) para contagem de *Lactobacillus* spp., ágar M17 com adição de lactose (LM17; Oxoid, EUA) para contagem de *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e Agar Slanetz e Bartley Seletivo (ASB; Biolog, Brasil) para contagem de *Enterococcus* spp. (SENGUN et al., 2009). As placas foram incubadas à temperatura de 30 ± 1 °C por 48 h em jarros com atmosfera de microaerofilia.

Após o crescimento bacteriano, as colônias foram quantificadas e aquelas com diferentes características visuais presentes nas placas mais diluídas, ou seja, as bactérias predominantes, foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI; Acumedia, EUA) ou caldo M17 enriquecido com glicose (GM17). Foram selecionadas 12 colônias de cada produtor, com diferentes características morfológicas obtendo-se o total de 84 isolados. Os tubos de ensaio foram incubados à temperatura de 30 ± 1 °C por 24 h para as próximas análises.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL

3.2.1 Coloração diferencial de Gram e teste de catalase

Alíquota de 1 mL das culturas dos diferentes isolados microbianos foi centrifugada, o sobrenadante descartado, sendo o precipitado ressuspendido em água peptonada tamponada para o teste de coloração de Gram. Por fim, as células foram observadas em microscópio composto óptico (Novel BM2100, Brasil) em aumento de 1000 x.

O teste de catalase foi realizado acrescentando-se uma gota da suspensão de células sobre uma lâmina com o acréscimo de uma gota de peróxido de hidrogênio. A formação de bolhas de gás, resultado da atividade da enzima catalase, indica resultado positivo (+). Amostras sem produção de bolhas de gás foram consideradas negativas (-) para a presença da enzima catalase.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE BAL

Para analisar a sequência do gene *rDNA 16S*, o DNA genômico foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A partir do DNA extraído foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região 16S rRNA de 1465 pb, utilizando os oligonucleotídeos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1100R (5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3') (KHARCHENKO et al., 2015). A amplificação foi realizada em termociclador (A200 Gradient Thermal cycler) e a mistura de reação (25 µL) continha 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,4 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), tampão de PCR 1 × sem MgCl₂, 3 mM de MgCl₂, 0,05 U/µL de *Taq* DNA Polimerase (Promega, EUA) e 1,0 µL de DNA total extraído. Como controle positivo foi utilizada a amostra 54 padronizada anteriormente com a mesma reação. Como controle negativo, substituiu-se a amostra de DNA por 1 µL de água ultrapura. Fragmentos de DNA foram amplificados da seguinte forma: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos foram armazenados a -20 °C até o momento da corrida eletroforética. Alíquotas dos produtos amplificados adicionados de azul de bromofenol e GelRed (Invitrogen, EUA) foram submetidos à eletroforese (PWSys pw300) em géis de agarose 0,8 % (100 V, 40 min) em tampão TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 0.1 mM EDTA, pH 8,3). O marcador utilizado foi o de 1kb ladder RTU (Kasvi, Brasil). Após a corrida, os géis foram visualizados

em transiluminador Dual LED Blue/White Light (Kasvi, Brasil) para confirmação da amplificação na altura aproximada de 1465 pb. Após a amplificação e corrida eletroforética de todas as amostras, uma alíquota de 15 µL de cada amostra foi seca a 60 °C, bem como 300 µL dos oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação (5 µM). O material foi encaminhado para purificação e sequenciamento na empresa ACTGene (Alvorada, RS, Brasil). As sequências de nucleotídeos foram alinhadas e utilizadas para análise de similaridade de sequências por meio do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) utilizando o banco de dados GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Sequências consenso foram importadas para o software Mega 5, e um dendrograma foi criado com base no método Neighbour Joining.

3.4 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE BAL

Para avaliar o potencial antimicrobiano, os 84 isolados foram cultivados em 10 mL de caldo MRS ou GM17, seguindo os meios de cultivo iniciais. Nos tempos 24, 48 e 72 h, 5 mL de cada cultivo foram transferidos para tubos cônicos estéreis e centrifugados a 4.000 g durante 15 min a 15 °C. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e neutralizados para pH 6,5 ± 0,2 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 M ou 1 M utilizando-se um potenciômetro digital (Jenway 3510, Reino Unido). Então, 1,5 mL de cada cultivo foi transferido para microtubos estéreis e centrifugado a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes neutralizados obtidos foram transferidos para novos microtubos estéreis e acondicionados a 4 °C até o momento das análises de atividade antimicrobiana.

A atividade de inibição dos sobrenadantes neutralizados de cada isolado láctico foi avaliada pelo método de difusão em ágar (TAGG et al., 1976) sobre *Lactococcus lactis* ATCC 19435. Cinquenta microlitros dos sobrenadantes neutralizados foram adicionados em orifícios de 5 mm feitos em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura ágar LM17 inoculado com, aproximadamente, 10⁵ UFC/mL do microrganismo-teste. As placas foram mantidas a 4 °C por 18 a 20 h para difusão e, posteriormente, incubadas a 30 °C por 24 h.

Após o período de incubação, o diâmetro dos halos de inibição ao redor das colônias ou orifícios foi medido com paquímetro e o resultado expresso em milímetros (mm). A partir deste ensaio, a formação de um halo de inibição ao redor dos orifícios foi considerada como indicativo da atividade antimicrobiana. Como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e como controle negativo o próprio meio de cultivo, BHI estéril.

Nos tempos indicados, alíquota de 2 µL de cada cultivo foi transferida para a superfície de ágar LM17 inoculado com, aproximadamente, 10⁵ UFC/mL de *L. lactis* ATCC 19435, bactéria referência em estudos de susceptibilidade a antimicrobianos. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h, sendo avaliadas também após 24 h. Os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana a partir do crescimento das colônias foram novamente cultivados, neutralizados para pH 6,5 ± 0,2, esterilizados por filtração utilizando-se filtros para seringa com membrana de polietersulfona (PES) de 0,22 µm (Kasvi, Brasil) e avaliados pelo método de difusão em ágar como descrito previamente. Todos os experimentos descritos foram realizados em três repetições biológicas.

3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE BAL

3.5.1 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica, centrifugou-se a 10.000 g por 5 min a 4 °C alíquota de 1 mL a partir do cultivo dos 84 isolados nas condições descritas previamente. Cinquenta microlitros dos sobrenadantes não neutralizados foram adicionados em orifícios de 5 mm feitos em placas contendo 20 mL de meio de cultivo ágar leite (Ágar para Contagem Padrão (PCA; Himedia, Índia) adicionado de 1 % (p/v) de leite desnatado em pó) (BEERENS; LUQUET, 1990). As placas foram incubadas a 4 °C durante 10 dias e, posteriormente, a 37 °C por 48 h. O diâmetro dos halos transparentes ao redor dos orifícios, indicando atividade proteolítica, foi medido com paquímetro e o resultado dado em milímetros (mm). Como controle positivo do experimento foi utilizado a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 e para o controle negativo o próprio meio de cultivo BHI estéril.

3.5.2 Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi testada usando o meio de cultura proposto por Kouker e Jaeger (1987) com modificações (0,5 % de peptona, 0,1 % de extrato de levedura, 0,4 % de NaCl, 1,5 % de ágar, 0,1 % de solução de rodamina B, 2,5 % de azeite estéril). Alíquota de 2 µL de cada cultivo foi transferida para superfície de meio de cultura seguido da incubação a 30 °C por 72 h. A ação lipolítica foi visualizada pela fluorescência em cor alaranjada das colônias quando expostas à luz ultravioleta a 350 nm. Os resultados foram expressos em atividade positiva (+) ou negativa (-). Como controle positivo do experimento foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923.

3.6 ASPECTOS DE SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE BAL

3.6.1 Produção de DNase

A produção de DNase foi determinada por meio da adição de alíquotas de 2 μ L dos isolados lácticos no meio de cultura ágar teste DNase com azul de toluidina a 0,1% (Himedia, Índia). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. A formação de halos claros ao redor da colônia representa resultado positivo para a presença desta enzima. Como controle positivo do experimento foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923 e como controle negativo, o próprio meio de cultivo BHI estéril (GUPTA; MALIK, 2007). O teste foi realizado em duplicata.

3.6.2 Teste de coagulase

Para o teste de coagulase, 0,3 mL de cada cultura dos isolados foi transferido para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho (Coagu-Plasma LaborClin®, Brasil) e incubados a 36 °C durante 6 h, conforme recomendações do fabricante. A formação de um coágulo parcial ou total foi considerado como microrganismos coagulase positivo. Como controle positivo do experimento foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923. O teste foi realizado em duplicata.

3.6.3 Teste de hemólise

No teste de hemólise, os isolados de BAL foram cultivadas em caldo MRS a 30 °C por 24 h. Então, alíquotas foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Muller Hinton (Difco, EUA) suplementado com 5 % (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado. Após a incubação a 37 °C por 48 h, a reação hemolítica foi avaliada por meio da observação da hidrólise parcial das células vermelhas do sangue e a produção de uma zona verde (α -hemólise), bem como a hidrólise total de células vermelhas do sangue, produzindo uma zona clara em torno da colônia bacteriana (β -hemólise) ou nenhuma reação (γ -hemólise) (ASTERI et al., 2009). Para o controle positivo do experimento foi utilizado a bactéria *S. aureus* ATCC 25923. O teste foi realizado em triplicata.

3.7 POTENCIAL APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL NA ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO

Oito isolados de BAL obtidas de soro-fermento de queijo Porungo, correspondendo a 10% do total de isolados, com as melhores características considerando as atividades antimicrobiana, proteolítica e lipolítica e ainda, aquelas caracterizadas como seguras foram

utilizados na produção de leite fermentado. Para ativação das culturas de BAL, tubos de ensaio contendo 10 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 12% foram esterilizados a 121 °C por 15 min e, após resfriados, foram inoculados 100 µL de cada isolado, homogeneizados e incubados a 30 °C por 24 h. Para a produção do leite fermentado foi utilizado leite integral UAT da marca Hércules, adquirido no comércio local, que foi aquecido a 70 °C e, posteriormente, resfriado em banho termostato até atingir 40 °C. Em frascos reagentes de borossilicato esterilizados foram adicionados 100 mL de leite e 2 mL dos isolados de BAL previamente cultivados em LDR 12%. Os frascos foram incubados a 40 °C por 10 h, sendo coletadas amostras de leite nos tempos 0, 4, 8 e 10 h para análises posteriores. Em seguida, os frascos contendo o leite fermentado foram acondicionadas em refrigerador com temperatura ajustada para 6 °C. Nos tempos, 24 h, 15 dias e 30 dias, amostras foram coletadas para análises posteriores.

3.7.1 Capacidade de acidificação do leite e crescimento bacteriano

Para avaliar a capacidade de acidificação do leite pelos isolados de BAL selecionados, foram realizadas análises de pH e acidez titulável nos tempos determinados: 0, 6, 10 e 24 h e, 15 e 30 dias. As análises de pH foram realizadas utilizando-se um potenciômetro digital (Jenway 3510, Reino Unido). As análises de acidez (porcentagem de ácido láctico) foram feitas pelo método titulométrico com NaOH a 0,1 M e indicador fenolftaleína. Ambas as análises seguiram metodologia estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). A população de BAL foi determinada em cada leite fermentado nos diferentes tempos. Alíquotas foram diluídas e plaqueadas sobre a superfície de ágar MRS contido em placas de Petri (APHA, 2001). Após a incubação a 30 °C por 24 h, as colônias foram contadas e os resultados, expressos em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), foram transformados em \log_{10} .

3.7.2 Proteólise

Para a avaliação da atividade de proteólise promovida pelo desenvolvimento dos isolados de BAL no leite fermentado após 30 dias de fabricação foi analisado o teor de nitrogênio não proteico presente na amostra pelo do método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Proteínas presentes em 10 mL de cada amostra de leite fermentado foram precipitadas em 40 mL de ácido tricloroacético a 12%. Em seguida, a amostra foi filtrada em papel Wachtman e o filtrado, contendo a fração de nitrogênio não proteico, foi utilizado para a etapa de digestão. Em um tubo de digestão, pesou-se 1,5 g de catalisador ($K_2SO_4 + CuSO_4$) e 0,2 g do filtrado. O

peso final foi anotado e, então, acrescentou-se 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Os tubos foram alocados no bloco digestor com a tampa de condensação e a temperatura foi aumentada gradualmente até atingir $350\text{ }^\circ\text{C}$. O processo de digestão ocorreu até que o líquido no interior dos tubos ficasse com coloração clara (verde-azulado). A partir de então, os tubos permaneceram sob aquecimento por mais 120 min. Após resfriados, os tubos foram alocados no destilador e neutralizados com NaOH a 50% até o aparecimento de cor escura devido à formação de óxido de cobre. O destilado foi recolhido em frascos Erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico (H_3BO_4) a 4% e o indicador misto (solução de vermelho de metila a 0,1% e solução de verde de bromocresol a 0,1% em etanol absoluto). Volume de 150 mL do destilado foi titulado com ácido clorídrico (HCl) a 0,01%, até o indicador virar da cor azul para vinho. Como controle experimental, 10 mL de leite integral UAT foi utilizado, seguindo o mesmo protocolo previamente descrito. Realizou-se a amostra do branco contendo a mistura catalítica e H_2SO_4 . O valor encontrado no branco após a titulação com HCl foi descontado das amostras contendo o sobrenadante. Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos foram comparados com o controle por meio do teste t de Student a um nível de significância de 5% utilizando o software Microsoft® Excel versão 16.72.

3.7.3 Lipólise

O grau de lipólise do leite fermentado foi estimado por meio da alteração da concentração de ácidos graxos livres (AGL) no produto em decorrência do crescimento dos isolados de BAL após 30 dias de fabricação. A determinação foi feita pelo Método LIPO R (MAHIEU, 1984). Volumes de 5 mL de cada amostra de leite fermentado foram transferidos para tubos de ensaio com tampa e acrescido de 16 mL de reagente de extração LIPO R (mistura de 44,1% de isopropanol p.a, 44,8% de éter de petróleo p.a., 1,1% de ácido sulfúrico 2 M e 10% de butanol-2 p.a.) e 4 mL de água destilada. Os tubos foram homogeneizados por inversão por 15 vezes. Aguardou-se 5 min para decantação e, em seguida, transferiu-se 8 mL do sobrenadante para outro tubo de ensaio adicionado de 4 mL de H_2SO_4 a 0,05% (v/v) invertendo-se por 5 vezes. Após 1 min em repouso para decantação, transferiu-se 4 mL do sobrenadante para frasco Erlenmeyer, adicionou-se cinco gotas da solução indicadora de azul de timol e titulou-se com a solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,002 M em etanol S.V. até ponto de viragem detectável pela mudança de coloração vermelho-violeta para amarelo e, posteriormente, azul. Como controle experimental, 5 mL de leite integral UAT foi utilizado, seguindo o mesmo protocolo previamente descrito. Realizou-se o mesmo procedimento para a

prova em branco utilizando-se água destilada. Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos foram comparados com o controle por meio do teste t de Student a um nível de significância de 5% utilizando o software Microsoft® Excel versão 16.72.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BAL OBTIDAS A PARTIR DE SORO-FERMENTO DE QUEIJO PORUNGO (QP)

Os soros-fermento dos diferentes produtores apresentaram variação na população de bactérias lácticas em função do meio de cultivo utilizado (Tabela 1). De maneira geral, os meios MRS e M17 apresentaram maiores contagens de colônias quando comparados ao meio ASB. Oitenta e quatro isolados foram obtidos e submetidos às análises das características fenotípicas e morfológicas, que incluiu coloração de Gram, determinação das formas e arranjos, bem como a produção de catalase.

Tabela 1 - Número de contaminantes nas amostras de soro fermento determinadas em diferentes meios de cultivo expressas em Log_{10}

Produtor	MRS	M17	ASB
1	7,66	7,77	8,43
2	8,30	8,49	7,69
3	8,48	8,65	8,28
4	6,57	7,36	4,60
5	8,30	8,65	7,57
6	6,38	8,66	5,26
7	5,81	8,86	3,98

MRS: Ágar De Man, Rogosa e Sharpe; ASB: Ágar Slanetz e Bartley

Foi observada prevalência de bactérias Gram-positivas na forma de cocos, representando o total de 77 dos isolados (91,7%) (Tabela 2). Também foi visualizada a forma de cocobacilos em sete isolados (8,3%). Apenas o isolado QP9 (1,2%) apresentou-se como Gram-negativo, sendo também o único isolado considerado catalase-positivo.

Características como Gram-positividade, incapacidade de produzir catalase, forma de cocos, cocobacilos (bastonetes curtos) ou bacilos são típicas do grupo das BAL. Isolados classificados como bacilos podem pertencer aos gêneros *Lactobacillus* e *Carnobacterium* enquanto que aqueles na forma de cocos podem pertencer aos gêneros *Lactococcus*,

Streptococcus, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*. Os gêneros *Leuconostoc* e *Weissella* podem apresentar-se na forma de cocos ou cocobacilos (DABA; ELKHATEEB, 2020).

Tabela 2 - Características fenotípicas dos isolados obtidos de soro-fermento utilizado na produção do queijo Porungo.

Produtor	Isolados	Meio de cultivo pós isolamento	Gram*	Forma	Catalase**
1	QP1	MRS	+	cocos	-
1	QP2	MRS	+	cocos	-
1	QP3	MRS	+	cocos	-
1	QP4	MRS	+	cocobacilo	-
1	QP5	MRS	+	cocos	-
1	QP6	MRS	+	cocos	-
1	QP7	MRS	+	cocos	-
1	QP8	MRS	+	cocos	-
1	QP9	M17	-	cocobacilo	+
1	QP10	M17	+	cocos	-
1	QP11	M17	+	cocos	-
1	QP12	M17	+	cocos	-
2	QP13	MRS	+	cocos	-
2	QP14	MRS	+	cocos	-
2	QP15	MRS	+	cocos	-
2	QP16	MRS	+	cocos	-
2	QP17	MRS	+	cocos	-
2	QP18	MRS	+	cocos	-
2	QP19	MRS	(+/-)	cocobacilo	-
2	QP20	MRS	+	cocos	-
2	QP21	M17	+	cocos	-
2	QP22	M17	+	cocos	-
2	QP23	M17	+	cocos	-
2	QP24	M17	+	cocos	-
3	QP25	MRS	+	cocos	-
3	QP26	MRS	+	cocos	-
3	QP27	MRS	+	cocos	-
3	QP28	MRS	+	cocos	-

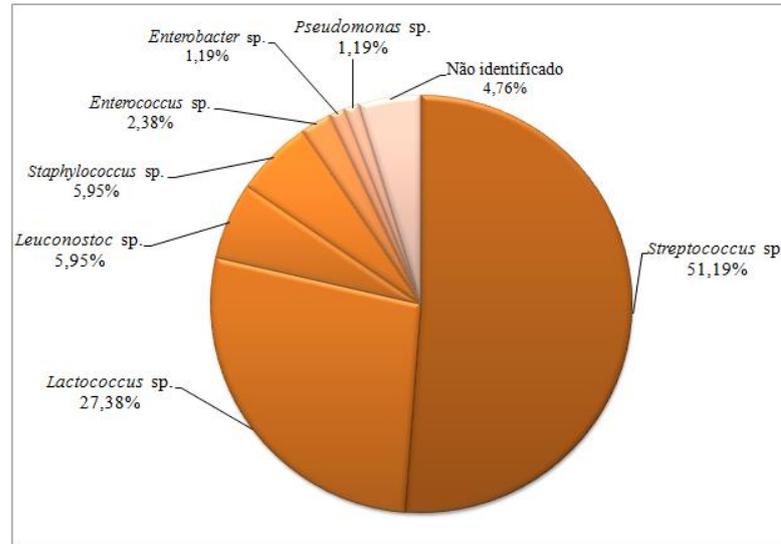
3	QP29	MRS	+	cocos	-
3	QP30	MRS	+	cocos	-
3	QP31	MRS	+	cocos	-
3	QP32	MRS	+	cocos	-
3	QP33	M17	+	cocos	-
3	QP34	M17	+	cocos	-
3	QP35	M17	+	cocos	-
3	QP36	M17	+	cocos	-
4	QP37	MRS	+	cocos	-
4	QP38	MRS	+	cocos	-
4	QP39	MRS	+	cocos	-
4	QP40	MRS	(+/-)	cocobacilo	-
4	QP41	MRS	+	cocos	-
4	QP42	MRS	+	cocos	-
4	QP43	MRS	+	cocos	-
4	Q44	MRS	+	cocos	-
4	QP45	M17	+	cocos	-
4	QP46	M17	+	cocos	-
4	QP47	M17	+	cocos	-
4	QP48	M17	+	cocos	-
5	QP49	MRS	+	cocos	-
5	QP50	MRS	+	cocos	-
5	QP51	MRS	+	cocos	-
5	QP52	MRS	+	cocos	-
5	QP53	M17	+	cocos	-
5	QP54	M17	+	cocos	-
5	QP55	M17	+	cocos	-
5	QP56	M17	+	cocos	-
6	QP57	MRS	+	cocos	-
6	QP58	MRS	+	cocos	-
6	QP59	MRS	+	cocos	-
6	QP60	MRS	+	cocos	-
6	QP61	MRS	+	cocos	-
6	QP62	MRS	+	cocos	-
6	QP63	MRS	+	cocos	-
6	QP64	MRS	+	cocos	-
6	QP65	M17	(+/-)	cocobacilo	-

6	QP66	M17	+	cocos	-
6	QP67	M17	+	cocos	-
6	QP68	M17	+	cocos	-
7	QP69	MRS	+	cocos	-
7	QP70	MRS	+	cocos	-
7	QP71	MRS	+	cocos	-
7	QP72	MRS	+	cocos	-
7	QP73	M17	+	cocos	-
7	QP74	M17	+	cocos	-
7	QP75	M17	+	cocos	-
7	QP76	M17	+	cocos	-
7	QP77	MRS	+	cocos	-
7	QP78	MRS	+	cocos	-
7	QP79	MRS	+	cocos	-
5	QP80	MRS	+	cocos	-
5	QP81	MRS	+	cocos	-
5	QP82	MRS	(+/-)	cocobacilo	-
5	QP83	MRS	+	cocos	-
5	QP84	MRS	+	cocobacilo	-

*Coloração de Gram: “+” indica Gram positiva; “-“ indica Gram negativa; “+/-“ indica que o teste foi inconclusivo. ** Catalase: “+” indica catalase positivo; “-“ indica catalase negativo.

Dentre os isolados bacterianos foi possível constatar, a partir do sequenciamento do rRNA 16S, a presença de sete gêneros. O grupo microbiano mais frequentemente detectado foi o das bactérias do ácido lático, reforçando seu papel na fermentação para a obtenção do queijo Porungo. O gênero *Streptococcus* foi o mais representativo nas amostras de soro-fermento de queijo Porungo, com o total de 51,2% dos isolados, seguido pelo gênero *Lactococcus* representando 27,4% dos isolados, *Leuconostoc* com 5,95% de frequência e *Enterococcus* 2,4% (Figura 1). No isolamento realizado, também foi possível identificar a presença de bactérias não pertencentes ao grupo das BAL, sendo o gênero *Staphylococcus* identificado em 6,0% dos isolados, *Enterobacter* e *Pseudomonas* em 1,2% cada.

Figura 1 - Distribuição dos gêneros de bactérias isoladas do soro-fermento de queijo Porungo



A partir da análise do gene rRNA16S, foi identificada a maioria dos isolados obtidos a partir soro-fermento do queijo Porungo. Apenas quatro isolados não foram identificados. A cobertura da consulta de homologia variou de 88 a 100%, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação dos isolados do soro do queijo Porungo

Nome do Gênero	Número do Isolado	Identificadas	Frequência de Gênero (%)	Cobertura consulta (%)
<i>Streptococcus</i> sp.	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 17; 20; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 45; 47; 48; 54; 65; 66; 67; 69; 70; 71; 73; 74; 75	43	53,57	100
<i>Lactococcus</i> sp.	18; 19; 21; 37; 38; 40; 41; 49; 53; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 77; 78; 79; 81; 82; 83; 84	23	28,75	100
<i>Leuconostoc</i> sp.	42; 44; 50; 51; 52	5	6,25	100
<i>Staphylococcus</i> sp.	43; 46; 63; 62; 72	5	6,25	100
<i>Enterococcus</i> sp.	64; 80	2	2,5	100
<i>Enterobacter</i> sp.	9	1	1,25	100
<i>Pseudomonas</i> sp.	68	1	1,25	100

Diferentes gêneros de BAL foram encontrados em vários tipos de queijos artesanais, demonstrando elevada diversidade. Em estudo realizado com queijo artesanal da Serra da Canastra, os gêneros *Streptococcus* e *Lactococcus* mostraram-se dominantes na cultura endógena (KAMIMURA et al. 2020), apresentando resultados semelhantes aos obtidos para o

soro-fermento utilizado na produção do queijo Porungo. Embora *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* sp. tenham sido encontrados em queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, o gênero predominante também foi *Lactococcus* (NERO et al., 2021). Semelhante ao queijo Porungo, no queijo Grana Padano italiano foi observado a prevalência dos gêneros *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. (Duarte et al. 2022), porém é importante salientar que dentre todas as amostras de soro-fermento analisadas nenhum isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Lactobacillus*. No queijo Quesillo e queijo cremoso colombiano a microbiota foi similar àquela encontrada no soro de queijo Porungo, com prevalência do gênero *Lactococcus*, seguido por *Leuconostoc* (DURANGO-ZULETA et al., 2022). Cinco gêneros bacterianos foram encontrados no leite e produtos lácteos da Etiópia: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (TAYE et al., 2021) apresentando resultados análogos à microbiota de BAL isolada de soro-fermento de queijo Porungo. Em estudo realizado com 152 isolados do queijo muçarela de búfala produzido em Brotas, Brasil, houve a prevalência e presença, em quase todas as etapas de produção, das bactérias *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei*, *Limosilactobacillus fermentum* e *Enterococcus* sp. (Silva et al. 2022), gêneros também encontrados dentre os isolados do presente estudo. Diferentemente do queijo Porungo, em uma análise com dez diferentes queijos artesanais brasileiros, foi apresentado predominância do gênero *Lactobacillus* em 76,5% das amostras, seguido por *Lactococcus* (3,2%) e *Pediococcus* (1,4%) (MARGALHO et al., 2020). Resultados divergentes também foram encontrados quando comparados ao queijo artesanal do Pico, produzido em Açores, Portugal, onde o gênero *Enterococcus* foi dominante (DOMINGOS-LOPES et al., 2017), assim como ocorreu com o queijo Feta fresco produzido na Grécia a partir do leite de cabra que obteve a prevalência dos gêneros *Enterococcus* seguido de *Lactococcus* (BOZOUDI et al., 2016). O gênero *Enterococcus* aparece entre os isolados identificados no soro de queijo Porungo, porém com pouca prevalência (2,4%) (Figura 1). Espécies desse gênero estão associadas à produção de bacteriocinas, e contribuem na maturação de queijos e no desenvolvimento de sabor e aromas típicos devido à proteólise, lipólise, produção de diacetil e liberação de outros compostos voláteis importantes (BRAIEK; SMAOIU, 2019; HANCHI et al. 2018).

Com base nas sequências do gene rRNA 16S, uma árvore filogenética foi construída indicando a posição relativa dos 80 isolados identificados (Figura 2). Uma espécie bacteriana externa ao grupo das BAL, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, foi inserida na análise promovendo o agrupamento de todas as bactérias identificadas como não pertencentes ao grupo das BAL.

Figura 2 - Árvore filogenética mostrando a posição relativa dos isolados obtidos a partir de soro-fermento de queijo Porungo baseado nas sequências de rRNA 16S.

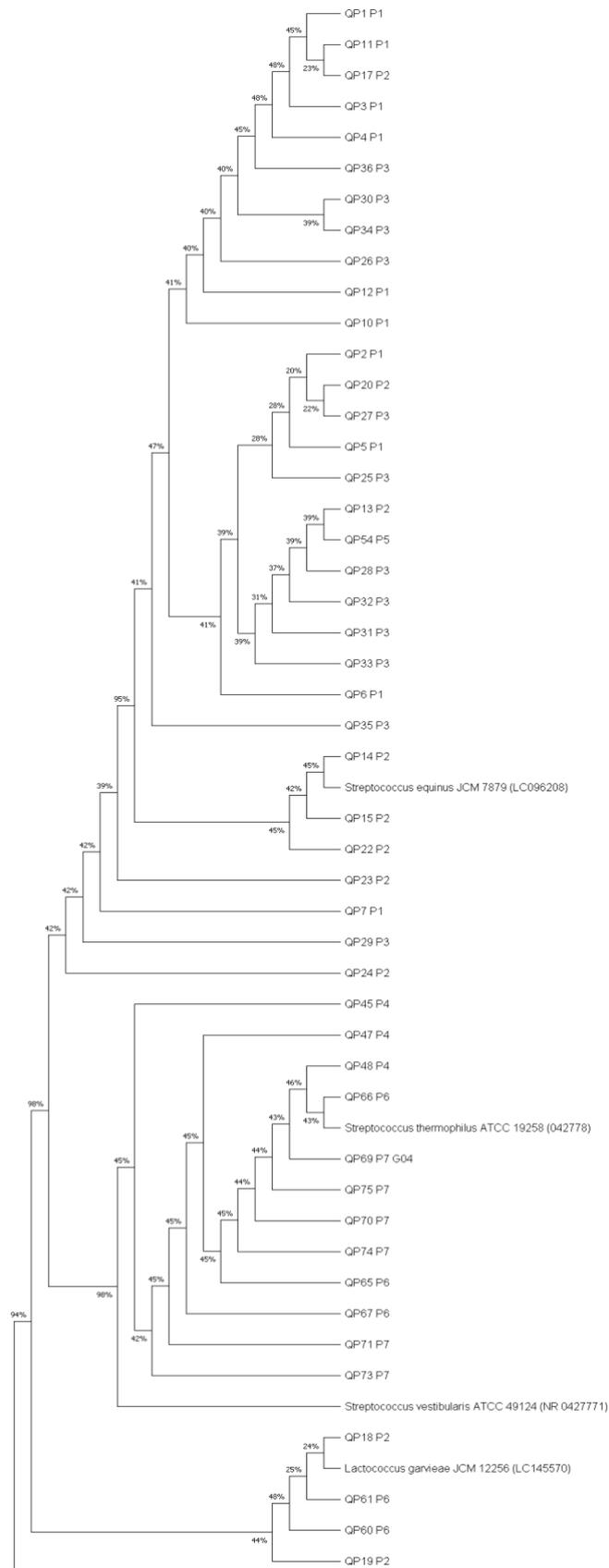
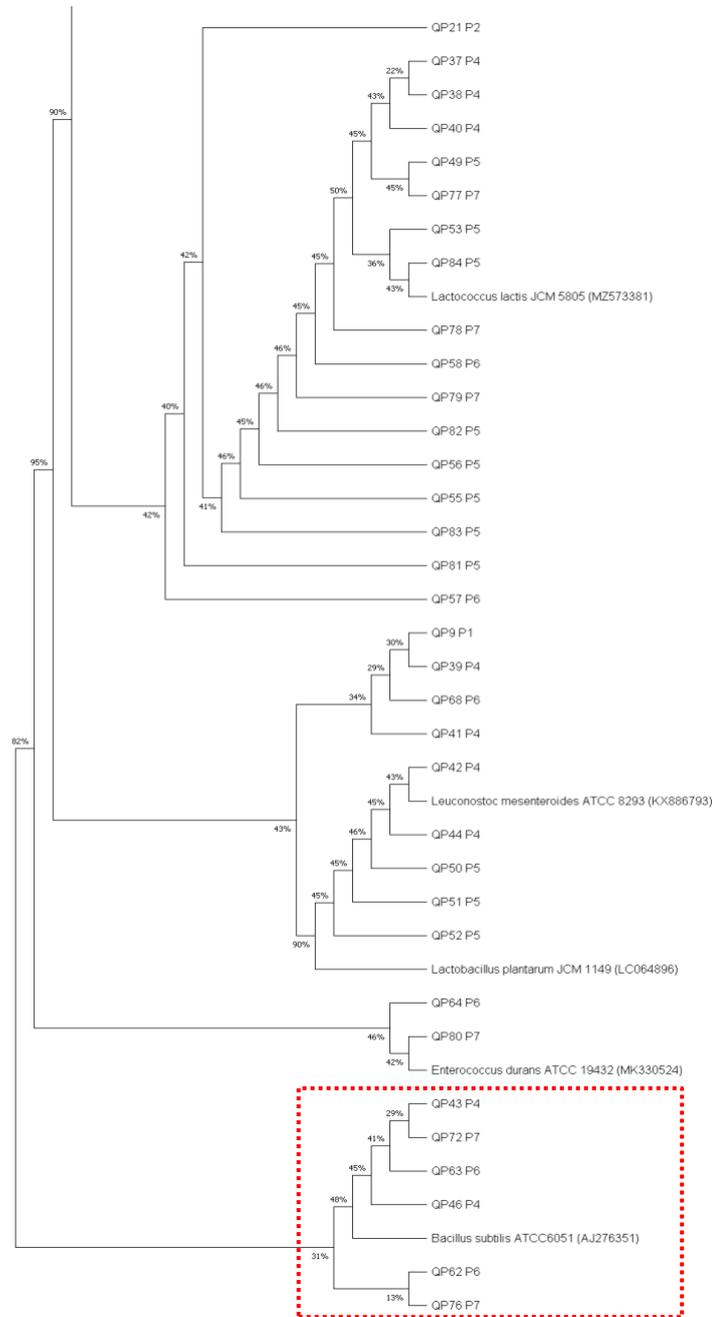


Figura 2 - Continuação



Retângulo vermelho pontilhado indica o agrupamento das bactérias não pertencentes ao grupo das BAL.

4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DO SORO-FERMENTO DO QUEIJO PORUNGO

A produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados obtidos a partir do soro-fermento utilizado na fabricação de queijo Porungo foi avaliada sobre o microrganismo indicador *L. lactis* ATCC 19435. Grande parte dos sobrenadantes centrifugados e neutralizados

obtidos a partir do cultivo dos isolados bacterianos (71,4%) apresentou atividade antibacteriana frente à bactéria indicadora no período de incubação de 48 h (Tabela 4).

Os halos observados foram de mínimo 7 mm de diâmetro para os isolados analisados, e em comparação com o estudo realizado por Pan et al. (2009) que considerou a zona de inibição entre 0 e 3 mm de diâmetro como fraca atividade antimicrobiana, entre 3 e 6 mm de diâmetro como boa atividade antimicrobiana, e zona de inibição superior a 6 mm de diâmetro classificada como forte atividade antimicrobiana, foi possível indicar que os isolados apresentaram forte atividade de inibição. Entretanto, a inibição observada não foi considerada completa uma vez que tais halos não estavam completamente translúcidos.

O teste também revelou que o tempo de incubação influenciou na produção dos compostos antimicrobianos uma vez que a maioria dos sobrenadantes centrifugados apresentou efeito inibitório a partir de 48 h, sendo que nem todos mantiveram alguma atividade após 72 h de cultivo (Tabela 4). Todos os sobrenadantes tiveram seu pH neutralizado após a centrifugação com o objetivo de excluir o efeito antimicrobiano dos ácidos presentes e possibilitar a atribuição da atividade inibitória a outros compostos não ácidos.

Quando alíquotas dos cultivos microbianos foram depositadas sobre o meio de cultivo inoculado com o microrganismo teste, apenas as colônias de cinco isolados (QP48, QP60, QP73, QP75 e QP76) apresentaram algum halo de inibição ao longo do tempo de incubação (Tabela 4; Figura 3). Então, esses cinco isolados foram novamente cultivados por 24, 48 e 72 h sendo uma alíquota do meio de cultivo neutralizado, filtrado e testado. Atividade antimicrobiana foi revelada nos sobrenadantes obtidos a partir do cultivo nos diferentes tempos de incubação (Tabela 4; Figura 3). Apenas o isolado QP60, pertencente ao gênero *Lactococcus* sp., apresentou atividade antimicrobiana superior, baseado no diâmetro dos halos de inibição, em todos os tempos de cultivo, indicando que este isolado possui boa perspectiva biotecnológica e potencial para novos testes com outras bactérias, principalmente patógenos de origem alimentar. Elevado potencial antimicrobiano foi verificado por Alegria et al. (2010) ao avaliarem 17 cepas de *Lactococcus* e sugerirem a presença de compostos antimicrobianos associados às colônias semelhantes a bacteriocinas como nisina A, nisina Z e lactococina 972.

Melhores resultados de inibição de patógenos a partir do cultivo dos isolados em comparação com a utilização do sobrenadante neutralizado e do sobrenadante tratado termicamente foram observados por Agostine et al. (2018). O mesmo ocorreu com Ren et al. (2014) que ao avaliarem o efeito inibitório do crescimento dos isolados de lactobacilos e dos

sobrenadantes neutralizados, obtiveram melhores resultados utilizando a cultura pura, indicando que os isolados inibiram os patógenos principalmente pela produção de ácido láctico.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes neutralizados dos isolados a partir de soro-fermento do queijo Porungo

Halo de inibição (mm) indicando atividade antimicrobiana									
Isolado	Sobrenadante centrifugado neutralizado			Colônias			Sobrenadante neutralizado filtrado		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
QP1	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP2	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP3	-	8	10	-	-	-	-	-	-
QP4	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP5	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP6	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP7	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP8	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP13	-	9	9	-	-	-	-	-	-
QP14	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP15	-	9	9	-	-	-	-	-	-
QP16	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP17	-	9	9	-	-	-	-	-	-
QP18	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP19	-	9	9	-	-	-	-	-	-
QP20	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP21	-	8	8	-	-	-	-	-	-
QP22	-	8	-	-	-	-	-	-	-

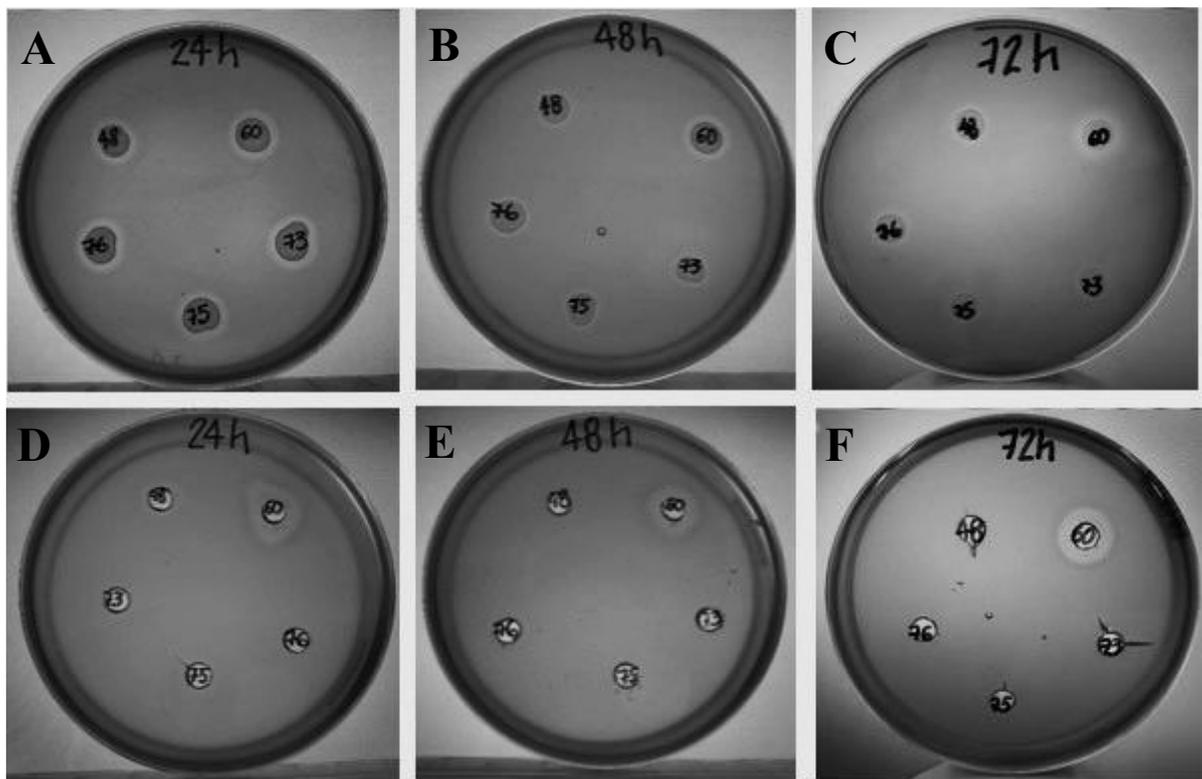
QP56	-	-	11	-	-	-	-	-	-
QP57	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP58	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP59	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP60	10	11	11	7	9	-	11	12	14
QP61	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP62	-	10	-	-	-	-	-	-	-
QP63	-	7	-	-	-	-	-	-	-
QP64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP69	-	8	-	-	-	-	-	-	-
QP70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP71	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP73	-	-	-	6	6	7	8	7	-
QP74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP75	-	-	-	6	6	7	9	6	-
QP76	-	7	-	7	6	6	7	-	-
QP77	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP78	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QP79	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP80	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP81	-	9	-	-	-	-	-	-	-
QP82	-	8	14	-	-	-	-	-	-
QP83	-	9	13	-	-	-	-	-	-
QP84	-	8	-	-	-	-	-	-	-

Nota: O sinal “-” indica ausência de halo de inibição.

A capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, principalmente de patógenos, é importante para a seleção de BAL para aplicação nas indústrias, pois a capacidade de produzir

compostos antimicrobianos naturais se torna um diferencial e contribui para a conservação dos alimentos. Algumas cepas de BAL são capazes de produzir substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento tanto de microrganismos patogênicos quanto de bactérias esporulantes. As BAL produzem metabólitos como ácido lático, ácidos orgânicos, acetaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, bacteriocinas e polissacarídeos com efeitos antimicrobianos (ARAUJO, 2017; AGOSTINE et al., 2018).

Figura 3 - Atividade antimicrobiana de isolados obtidos a partir de soro-fermento de queijo Porungo



A-C: Inibição de *L. lactis* ATCC 19435 a partir do crescimento das colônias dos isolado QP48, QP60, QP73, QP75 e QP76 após cultivo por 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C). D-E: Inibição de *L. lactis* ATCC 19435 a partir de sobrenadante neutralizado filtrado dos isolado QP48, QP60, QP73, QP75 e QP76 após cultivo por 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F).

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE BAL

A presença de enzimas com atividades proteolíticas e lipolíticas nos isolados de BAL obtidos a partir de soro-fermento utilizado na fabricação de queijo Porungo foi verificada em meios de cultivo contendo leite e lipídeos, respectivamente. A maioria dos isolados apresentou atividade proteolítica, sendo a atividade identificada em 81 isolados (96,4 %) com tamanho de halos variados como apresentado na Tabela 5 e Figura 4. Os resultados positivos de atividade

lipolítica foram reduzidos, uma vez que apenas colônias de 11 isolados (13,1 %), apresentaram coloração alaranjada brilhante quando expostas à luz ultravioleta (Tabela 5), indicando produção de lipases.

Tabela 5 - Atividade enzimática proteolítica e atividade lipolítica dos isolados

Isolados	Atividade proteolítica (halos mm)	Atividade lipolítica
QP1	19,3 ± 1,2	-
QP2	17 ± 3,0	-
QP3	16,7 ± 2,1	-
QP4	18 ± 2,0	-
QP5	19 ± 1,7	-
QP6	18 ± 2,0	-
QP7	14 ± 2,6	-
QP8	12,3 ± 1,5	-
QP9	0	+
QP10	18,3 ± 1,2	+
QP11	13,3 ± 1,2	-
QP12	15,7 ± 1,5	-
QP13	16,3 ± 0,6	-
QP14	11,3 ± 2,1	-
QP15	15 ± 1,0	-
QP16	17,3 ± 0,6	-
QP17	17,3 ± 0,6	-
QP18	18,3 ± 1,2	-
QP19	16,7 ± 1,5	-
QP20	15,3 ± 1,5	-
QP21	15,7 ± 1,2	-
QP22	10,3 ± 9,3	-
QP23	14,3 ± 0,6	-
QP24	18 ± 0,0	-
QP25	15,7 ± 1,5	-
QP26	16,7 ± 0,6	-
QP27	19 ± 1,0	-
QP28	17,7 ± 0,6	-
QP29	17 ± 1,0	-
QP30	18 ± 1,0	-
QP31	18,7 ± 1,2	-
QP32	17 ± 0,0	-
QP33	18 ± 0,0	-
QP34	16,7 ± 2,1	-
QP35	16,7 ± 0,6	-

QP36	16,7 ± 0,6	-
QP37	20 ± 0,0	-
QP38	19,7 ± 0,6	-
QP39	19 ± 1,0	-
QP40	19,3 ± 0,6	-
QP41	0	+
QP42	16,7 ± 1,5	-
QP43	19,3 ± 0,6	-
QP44	17 ± 8,7	-
QP45	16,7 ± 8,7	+
QP46	18 ± 2,5	-
QP47	19 ± 1,2	-
QP48	18 ± 12,1	-
QP49	14 ± 0,0	-
QP50	12,3 ± 1,5	-
QP51	16,3 ± 2,1	-
QP52	18,3 ± 0,6	-
QP53	13,3 ± 0,0	-
QP54	15,7 ± 10,8	-
QP55	0	-
QP56	0	-
QP57	15 ± 2,6	-
QP58	17,3 ± 2,3	-
QP59	17,3 ± 3,0	-
QP60	18,3 ± 1,2	-
QP61	16,7 ± 0,6	-
QP62	15,3 ± 1,0	-
QP63	15,7 ± 3,8	-
QP64	10,3 ± 0,6	-
QP65	14,3 ± 9,2	+
QP66	18 ± 8,1	+
QP67	15,7 ± 0,0	+
QP68	16,7 ± 0,6	-
QP69	19 ± 2,0	-
QP70	17,7 ± 1,0	-
QP71	17 ± 2,0	-
QP72	18 ± 0,6	-
QP73	18,7 ± 0,6	+
QP74	17 ± 2,0	+
QP75	18 ± 12,3	+
QP76	16,7 ± 2,5	+
QP77	16,7 ± 2,5	-
QP78	16,7 ± 1,0	-
QP79	20 ± 0,0	-

QP80	19,7 ± 1,0	-
QP81	19 ± 5,0	-
QP82	19,3 ± 1,0	-
QP83	19,7 ± 3,1	-
QP84	16,7 ± 1,2	-

Nota: A atividade proteolítica foi expressa pela média do diâmetro dos halos (em mm ± desvio-padrão). A atividade lipolítica foi expressa em positivo (+) e negativo (-), indicando a presença ou ausência das colônias no meio de cultivo.

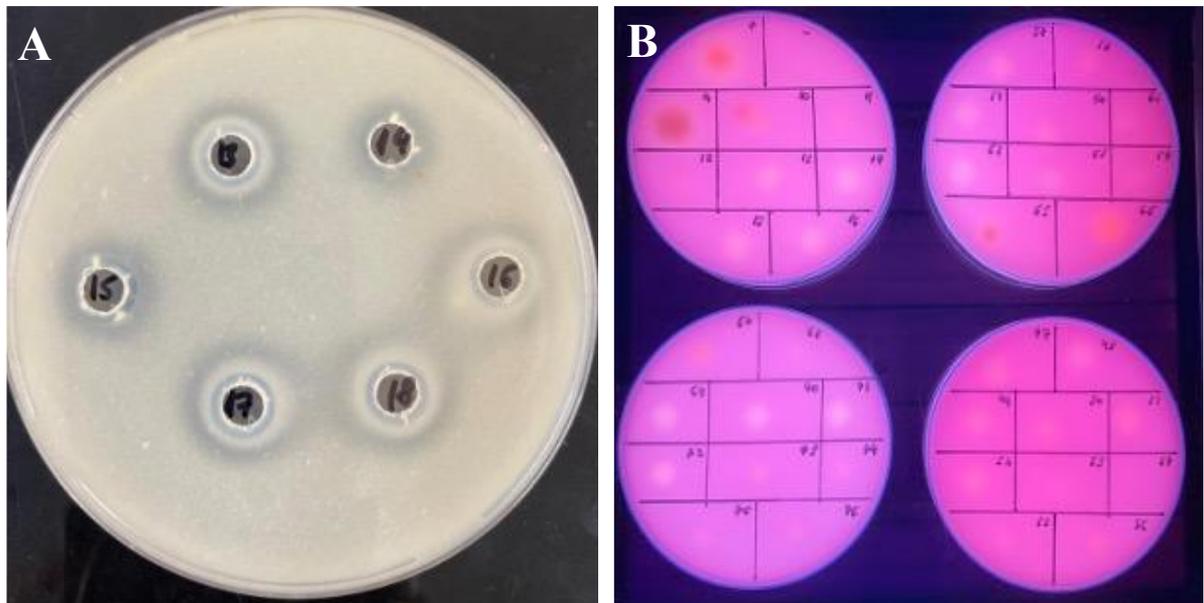
Dias et al. (2019), analisando o queijo coalho artesanal produzido em Pernambuco, encontraram atividade proteolítica em parte dos isolados, especialmente em bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, que apresentaram halos proteolíticos com diâmetros entre 15 mm e 20,5 mm. Esses resultados são semelhante aos reportados neste estudo, onde os diâmetros de proteólise variaram de 10,3 mm a 20,0 mm (Tabela 5).

Brito et al. (2020) estudaram a atividade proteolítica de isolados bacterianos de queijo coalho artesanal produzido no estado da Paraíba e observaram valores semelhantes aos encontrados para os isolados de BAL do soro de queijo Porungo. A espécie *Enterococcus faecium* (KT990025; KT990027; KT990026; KT990019) apresentou capacidade de degradação da caseína com valores médios dos halos encontrados variando entre 12,0 ± 1,4 mm e 15,5 ± 0,7 mm e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* (KT990067) com 17,0 ± 1,4 mm. Os halos observados neste meio advém da ação de enzimas proteolíticas que hidrolisam a caseína do leite como fonte de aminoácidos e nitrogênio para o próprio crescimento, proporcionando sabores característicos aos produtos fermentados (BRITO et al., 2020; GIAZZI et al., 2020).

Domingos-Lopes et al. (2017) identificaram atividade proteolítica em isolados de *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus pseudoavium* obtidos de queijo do Pico. Algumas dessas espécies pertencem aos mesmos gêneros de BAL identificados neste estudo e que também apresentara propriedades proteolíticas.

A presença de BAL com atividades proteolíticas pode contribuir para a prevenção de alergias relacionadas à má digestibilidade das proteínas do leite, porém a proteólise excessiva gera a produção descontrolada de peptídeos amargos e outros compostos indesejáveis (MENG et al., 2018).

Figura 4 - Atividades de proteólise e lipólise dos isolados de BAL obtidos a partir de sorofermento de queijo Porungo.



A) Atividade proteolítica observada pela formação de halos claros ao redor dos poços feitos em ágar leite inoculados com os diferentes isolados. B) Atividade lipolítica observada pela coloração alaranjada das colônias crescidas em ágar contendo azeite quando expostas à luz ultravioleta.

Atividades proteolítica e lipolítica também foram relatadas a partir do estudo com 605 cepas de *Enterococcus* obtidas de diversos queijos artesanais brasileiros sendo que apenas 26,8% dos isolados foram capazes de produzir enzimas proteolíticas em ágar leite, enquanto 25,1% foram capazes de produzir enzimas lipolíticas (MARGALHO et al., 2020).

Com relação à atividade lipolítica, foi identificado que 30% das BAL isoladas do queijo artesanal do Pico apresentaram esta atividade, sendo a maioria do gênero *Enterococcus* seguido de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (DOMINGOS-LOPES et al., 2017). Para essa pesquisa, o resultado apresentou-se menor (13,1%), com prevalência para *Streptococcus* seguido de *Lactococcus*. Já nos queijos Serpa, produzidos em Portugal, a atividade lipolítica foi presente para isolados bacterianos pertencentes às espécies *L. paracasei* e *L. plantarum* (ARAÚJO-RODRIGUES et al., 2021).

Assim como as enzimas proteolíticas, as lipases hidrolisam a gordura como fonte de substrato para geração de energia, e oferecem aos produtos características sensoriais, tecnológicas e nutricionais atuando, por exemplo, na melhoria da digestibilidade dos lipídios naturais. Atualmente as fontes bacterianas produtoras de lipases comerciais mais comuns incluem *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* sp. e *Burkholderia* sp. (RIGO et al.,

2021) e considerando que as principais lipases comercializadas atualmente não são provenientes de BAL, vê-se nas lipases um nicho a ser explorado.

Os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos realizados por outros autores comprovando a existência da diversidade metabólica existente entre os diferentes isolados de BAL, mesmo pertencentes ao mesmo gênero ou espécie.

4.4 ASPECTOS DE SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE BAL

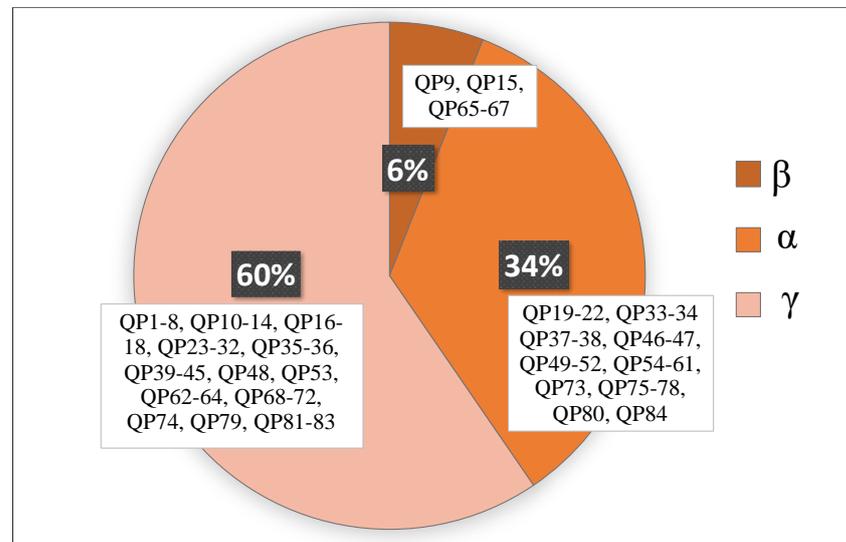
A determinação do potencial de virulência de microrganismos é necessária quando se trata da identificação de isolados em uma amostra, principalmente quando se deseja empregá-los em produtos alimentícios tanto para humanos quanto para animais. Para garantir a segurança, até mesmo de BAL, que são normalmente consideradas como GRAS, são realizados testes de segurança (FERRARI et al., 2016).

A produção de DNase, coagulase e atividade hemolítica foi investigada nos 84 isolados. Todos os isolados testaram negativo para a produção de DNase. A atividade de despolimerização do DNA da enzima desoxirribonuclease (DNase) é frequentemente associada a vantagens competitivas de cepas patogênicas (CHAUDHURI; SINGH, 1992). Bactérias do gênero *Lactococcus* spp. também podem carregar genes de virulência distintos, portanto é necessário sempre realizar análise de segurança dos isolados recém obtidos (PERIN et al., 2014).

A atividade hemolítica foi constatada em 5,95% dos isolados microbianos que apresentaram lise completa das hemácias presentes no sangue de cavalo, sendo classificado como β -hemolíticos (Figura 5). Em 59,5% dos isolados não foram observados a presença de hemólise (γ -hemolíticos) e, em 34,5% dos isolados foi verificado a atividade de hemólise parcial, sendo classificados como α -hemolíticos (Figura 5). *S. aureus* ATCC 25923, utilizado como controle positivo nas análises, apresentou atividade de hemólise completa (β -hemolítico) como característico desta espécie.

A hemólise é um fator de virulência comum entre os patógenos. A hemólise parcial do tipo alfa (α) não é considerada uma verdadeira hemólise, pois é causada pelo peróxido de hidrogênio produzido pela bactéria, oxidando a hemoglobina em metemoglobina, responsável pela coloração esverdeada da colônia bacteriana. A β -hemólise é a lise completa dos glóbulos vermelhos no meio ao redor e sob as colônias, fazendo com que a área pareça mais clara (amarela) ou até transparente (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Figura 5 - Atividade de hemólise dos isolados de BAL obtidos de soro-fermento de queijo Porungo



Nota: (β) hemólise total; (α) hemólise parcial; (γ) ausência de hemólise ausente.

Fatores de virulência são detectados em BAL, porém são de baixa incidência no gênero *Lactobacillus*, sendo, portanto, raramente relatadas infecções em seres humanos saudáveis. No entanto, podem manifestar um comportamento patogênico no hospedeiro com saúde comprometida. Na maioria dos estudos prevalece a ausência da atividade de β-hemólise em cepas de *Lactobacillus*, porém a atividade α-hemolítica é normalmente encontrada (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

A avaliação de segurança é um critério importante especialmente no caso de novas cepas que não têm histórico de uso seguro. Os isolados que apresentaram atividade hemolítica total não foram utilizados nas etapas posteriores, pois a ausência de atividade hemolítica é um critério de seleção para as potenciais cepas candidatas à aplicação em produtos alimentícios.

4.5 POTENCIAL APLICAÇÃO DE ISOLADOS DE BAL SELECIONADOS NA ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO

4.5.1 Potencial fermentativo de isolados de BAL

Oito isolados, aproximadamente 10% do total de isolados, que apresentaram os melhores resultados nas análises previamente realizadas foram selecionados para elaboração de leite fermentado objetivando explorar o potencial biotecnológico para aplicação na indústria de alimentos. Assim, QP6, QP13, QP29 e QP32 identificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus* e QP40, QP60, QP79 e QP83 pertencentes ao gênero *Lactococcus* foram

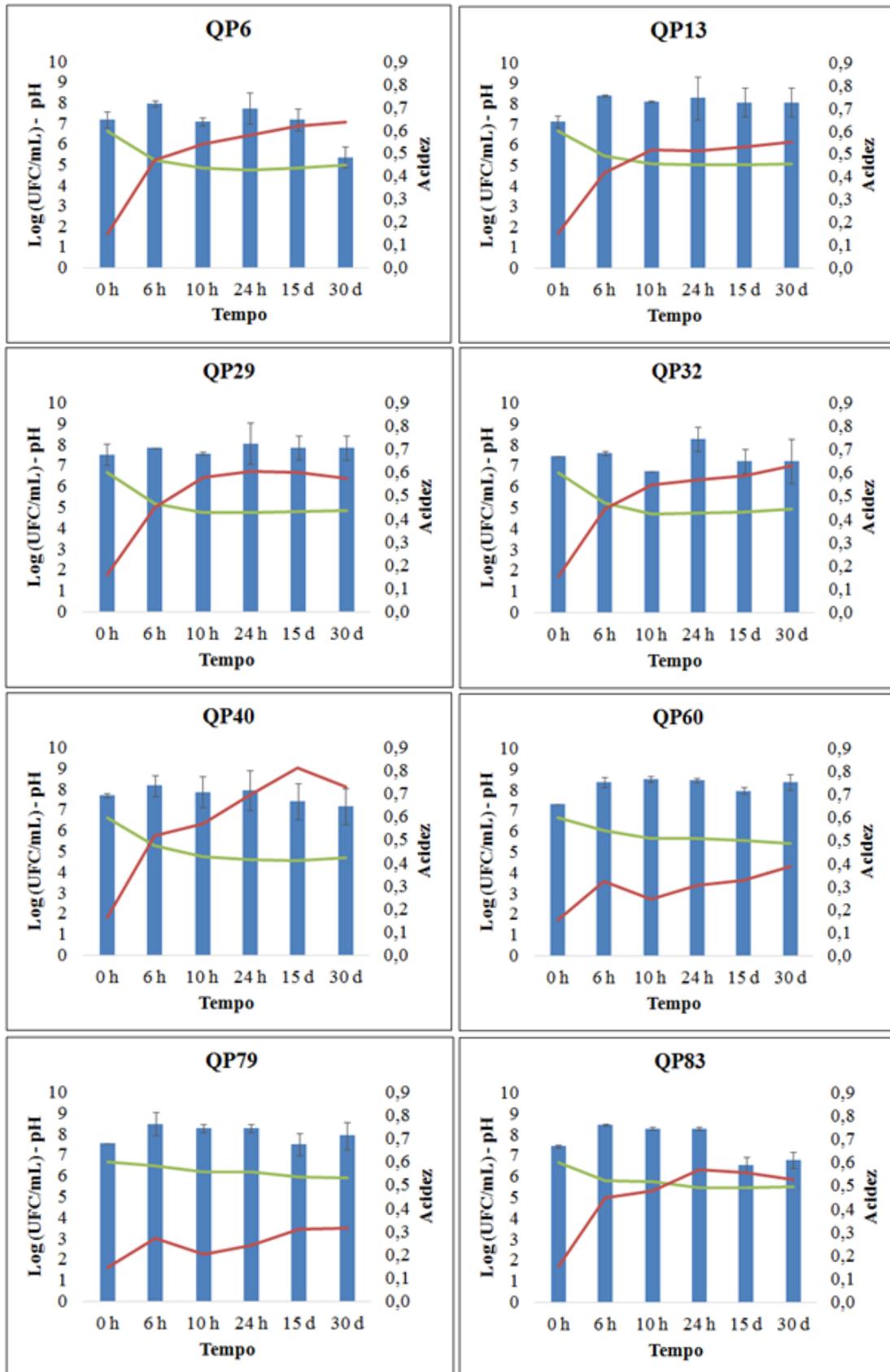
inoculados em leite integral UAT e mantidos a 40 °C por 10 h, seguido por refrigeração por até 30 dias.

A Figura 6 apresenta os gráficos de população, pH e acidez em função do tempo para cada amostra contendo os diferentes isolados. A concentração inicial dos isolados no leite foi de, aproximadamente, 7,0 log UFC/mL. A maioria dos isolados obteve maior crescimento celular no tempo 6 h, com valores variando entre 7,6 e 8,5 log UFC/mL, exceto o isolado QP60 que atingiu maior população (8,5 log UFC/mL) no tempo 10 h. Os isolados mantiveram população acima de 6,5 log UFC/mL ao longo do tempo, porém o isolado QP6 apresentou o maior decréscimo na população bacteriana no tempo 30 dias quando comparado aos demais (Figura 6).

De acordo com o Codex Alimentarius (2003), o leite fermentado é um produto lácteo obtido pela fermentação do leite com ou sem modificação de composição, pela ação de microrganismos adequados, resultando na redução do pH com ou sem coagulação. A norma para esse produto de acordo com CODEX STAN 243 (2003), estabelece os requisitos técnicos para a produção de leite fermentado, incluindo acidez titulável mínima de 0,3% de ácido lático (m/m). Esse valor foi alcançado no tempo 6 h pelos isolados, excesso para QP79, sendo a acidez mantida até o último tempo analisado (30 dias) para todos os isolados. Seguindo os mesmos requisitos, a população mínima de células no leite fermentado deve ser de 10^7 UFC/g, que foi a população inicial inoculada no leite. Este número se manteve igual ou superior para a maioria dos isolado até o tempo 30 dias, exceto para QP6 e QP83 que decresceu com 15 dias para 10^6 UFC/mL.

Em um leite fermentado inoculado com diferentes cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* desenvolvido por Shen et al. (2022), a concentração inicial do inóculo foi de 10^6 UFC/mL e a fermentação cessou quando o pH atingiu 4,6 e a população final estabilizou-se a 10^9 UFC/mL no tempo 10,5 h a 37°C. Já para os isolados do queijo Porungo, QP40 reduziu o pH para 4,8 após 10 h de incubação a 40 °C, atingindo pH de 4,6 e população de 10^8 UFC/ml no tempo 24 h. Embora QP60 tenha alcançado a maior população, a redução de pH por este isolado não foi relevante, uma vez que o pH não foi inferior a 5,3 no tempo 10 h de incubação a 40°C indicando que esse isolado tem pouco poder acidificante em comparação com os demais (Figura 6). Rubak et al. (2020) ao avaliarem 10 diferentes cepas de BAL em leite fermentado, verificaram que para que o pH alcançasse o valor de 4,5, foi necessário entre 24 e 48 h, dependendo da bactéria avaliada. Nessas condições, as populações variaram de 9,11 a 9,62 log UFC/mL e acidez titulável de 0,77 a 0,91%.

Figura 6 - Potencial fermentativo de isolados de BAL em leite integral



Nota: As barras azuis indicam a população bacteriana em log (UFC/mL). A linha verde indica a variação de pH enquanto a linha vermelha indica a acidez titulável (% de ácido láctico).

Com 30 dias de refrigeração a 4 °C, os isolados QP60 (*Streptococcus*), QP13 (*Streptococcus*) e QP79 (*Lactococcus*) obtiveram os valores mais altos para contagem de células viáveis, sendo 8,37 log UFC/mL, 8,08 log UFC/mL e 7,92 log UFC/mL, respectivamente, indicando a natureza psicrotrófica desses isolados. Dimitrellou et al. (2019) em estudo com *S. thermophilus* em leite de vaca fermentado obtiveram resultados semelhantes, com 8,08 log UFC/mL em 28 dias de armazenamento sob refrigeração.

A capacidade de fermentar a lactose com rápida produção de ácido láctico e coagulação das caseínas é uma importante propriedade tecnológica das BAL na fermentação de iogurtes e outros leites fermentados (COELHO et al, 2022; SLYVKA et al., 2022). Essas características foram observadas pela maioria dos isolados, com destaque para QP40. Cepas com capacidade de produzir ácido rapidamente são consideradas eficientes na produção de ácido láctico, que acidifica o leite, aumentando assim a atividade de enzimas como proteases, degradando rapidamente as proteínas em pequenos peptídeos (SHEN et al., 2022).

Foi possível verificar aumento na acidez titulável e redução do pH durante todo o período analisado. O pH inicial foi de 6,7 para todas as amostras de leite. Além do isolado QP40, que apresentou o valor mais baixo de pH dentre os demais isolados, resultados favoráveis também foram obtidos no tempo 10 h para os isolados QP29 e QP32 com pH de 4,7 e QP6 com pH 4,8 que são as bactérias do gênero *Streptococcus*. Todos os valores de pH diminuíram durante o armazenamento. Isso pode ser devido à pós-acidificação atribuído à atividade residual dos microrganismos que utilizam a lactose remanescente para produzir pequenas quantidade de ácidos orgânicos e diminuir o pH (MANI-LOPES; PALOU; LÓPES-MALO ,2014). Em um estudo feito por Silva et al. (2020) com cepas de *S. thermophilus* em queijo de búfala, o tempo para alcançar o pH 5,0 foi de 5 h. Nesse estudo, os isolados identificados como *Streptococcus* sp. (QP6, QP29 e QP32) atingiram esse valor de pH em 8 h a 40°C.

Referente à fermentação, o isolado QP40 atingiu os melhores valores de acidez (0,8% (m/m) de ácido láctico) e pH (4,6) em comparação aos outros isolados no tempo 15 dias, sendo a população bacteriana neste tempo (7,4 log UFC/mL) muito semelhante à população inicial, podendo indicar maior eficiência na produção de ácido por este isolado. Esse comportamento também foi semelhante para QP6 no tempo 30 dias.

Estudo conduzido por Mani-Lopes et al. (2014), avaliou a viabilidade de diferentes BAL durante a fermentação e o armazenamento, bem como as propriedades físico-químicas de iogurtes e leites fermentados elaborados com as bactérias. O valor de pH atingiu 4,5 após 8 h de fermentação quando foi utilizado conjuntamente as bactérias *S. thermophilus* e *L.*

acidophilus. Após a seleção de diferentes linhagens de BAL e com as melhores características tecnológicas foi identificado que *L. lactis* após 8 h de incubação apresentou valores médios para pH e acidez total de 5,59 e 0,36 g de ácido láctico/100 mL de amostra, respectivamente (ABARQUERO et al. 2022), esses valores foram inferiores aos encontrados para a maioria das amostras no mesmo tempo pelos isolados do queijo Porungo.

4.5.2 Avaliação de proteólise

Os leites fermentados também foram avaliados quanto a atividade de hidrólise de proteínas pelos isolados de BAL selecionados. Durante a fermentação, as BAL degradam as proteínas do leite, especialmente a caseína e as proteínas do soro do leite em peptídeos ou fração nitrogenada solúvel de baixo peso molecular por diferentes proteases produzidas pelas BAL (ASAHINA et al., 2020; AGAGUNDUZ et al., 2022).

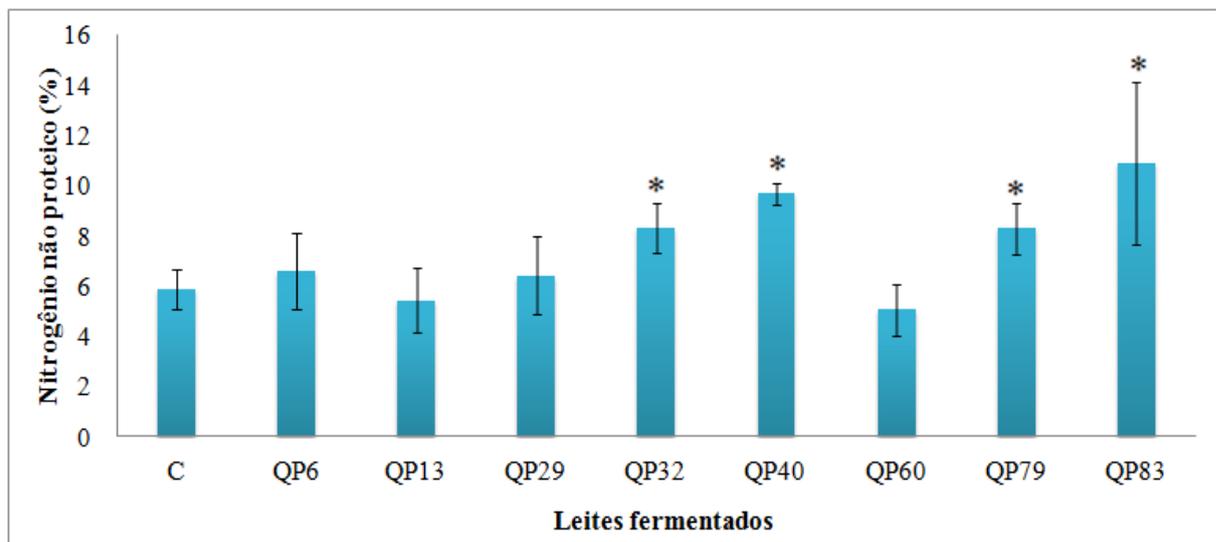
A Figura 7 apresenta os teores de nitrogênio não proteico presentes nos leites fermentados após 30 dias de armazenamento em temperatura de refrigeração. O índice de nitrogênio não proteico expressa a quantidade de peptídeos de baixa massa molecular (2 a 20 resíduos de aminoácidos ou < 600 Da), aminoácidos livres solúveis em ácido tricloroacético (TCA) a 15% formados a partir da hidrólise de proteínas como a caseína (21 kDa) e peptídeos de média massa molecular (5 kDa) (MASOTI et al., 2017; NIRO et al., 2017).

O leite no tempo 0 h foi utilizado como controle, apresentando o valor de 5,83% de compostos nitrogenados de baixa massa molar. Pode-se observar que a concentração final de nitrogênio não proteico foi maior nas amostras inoculadas com os isolados QP6, QP29 e QP32 pertencentes ao gênero *Streptococcus* e QP40, QP79 e QP83 pertencentes ao gênero *Lactococcus* quando comparadas com o controle (Figura 7), sendo estatisticamente significante ($p < 0,05$) apenas para as quatro últimas amostras. Esse efeito demonstra uma atividade de proteólise das bactérias que cresceram no produto, sendo uma estimativa da atividade proteolítica desses microrganismos, corroborando com os resultados obtidos com esses isolados em ágar leite onde os halos de proteólise foram de 17, 19,3 e 20 mm para os isolados QP32, QP40 e QP79, respectivamente (Tabela 5).

O leite fermentado pelo isolado QP83 mostrou-se como o mais proteolisado, apresentando um teor de compostos nitrogenados de baixa massa molar de 11%, o que representa um aumento de 86% com relação ao controle. A elevada atividade de proteólise apresentada pelo isolado QP83 (*Lactococcus* sp.) o torna um bom candidato para aplicação como coadjuvante na produção de derivados lácteos como queijos, principalmente na etapa de

maturação onde a proteólise auxilia no desenvolvendo de sabor, aroma, textura, porém, não é ideal para ser aplicado como uma cultura iniciadora (*starter*), já que pH foi de 5,5 (Figura 6). BAL podem ser utilizadas como culturas iniciadoras, que iniciam o processo fermentativo, porém a viabilidade é reduzida em algumas horas, ou dias, devido ao consumo dos carboidratos presentes e produção de ácido. Porém, as BAL não iniciadora são capazes de crescer utilizando outras fontes de energia além da lactose e são mais resistentes a estresses ambientais (GATTI et al., 2014).

Figura 7 - Teor de nitrogênio não proteico em leites fermentados com BAL isoladas de soro-fermento de queijo Porungo



Nota: Leite integral UAT foi fermentado a partir da inoculação de diferentes bactérias do ácido láctico isoladas de soro fermento com potencial biotecnológico: *Streptococcus* sp. (QP6; QP13; QP29; QP32) e *Lactococcus* sp. (QP40; QP60; QP79; QP83). Leite integral não inoculado foi utilizado como controle experimental (C). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de duas repetições biológicas e três repetições técnicas para cada amostra. Asteriscos indicam que a amostras difere estatisticamente ($p < 0,05$) do controle.

Esses resultados demonstram que uma cultura com alta atividade de proteólise, não é necessariamente a mais acidificante. Comparado aos iniciadores primários, os genomas das BAL não iniciadoras possuem um maior número de genes relacionados ao catabolismo de proteínas e aminoácidos livres, sendo uma das vantagens para considera-las como agentes bioquímicos indispensáveis para a maturação de queijos (GOBBETTI et al., 2015).

A amostra fermentada pelo isolado QP40 também demonstrou considerável atividade de proteólise com 10% de compostos nitrogenados de baixa massa molar, e um aumento da proteólise de 66% em relação ao controle. Semelhante ao resultado encontrado, em análise da proteólise em queijos Strachitunt maturados a 4 °C por 70 dias com predominância de

micrococcos, enterococos e lactobacilos, obtiveram a fração de nitrogênio total variando de 7,87 a 11,59%, expresso em nitrogênio total (NT) (MASOTI et al. (2017)). Da mesma forma, em estudos com queijo Camembert, foi relatado um aumento contínuo do teor de nitrogênio total SN-12% TCA ao longo do processo de maturação, atingindo um valor máximo de 13,9% no 56° dia de maturação, valor quase três vezes superior ao da amostra no dia zero (4,8%) (CHEN et al, 2022). A evolução de nitrogênio total SN-12% TCA indica alterações no teor de aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular promovidos pela ação de bactérias iniciadoras e não iniciadoras durante a maturação do queijo (CHEN et al, 2022).

Para algumas amostras os resultados não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) do controle, indicando uma atividade basicamente negligenciável ou não detectável pela técnica utilizada. Outra possibilidade sugerida por Yadav et al. (2014) para explicar a baixa concentração de nitrogênio não proteico em leite fermentado é o consumo desses compostos pelos microrganismos como fonte de nitrogênio durante a fermentação e maturação.

Dentre os isolados, QP40 (*Lactococcus* sp.) demonstrou grande potencial biotecnológico, pois apresentou elevada atividade de proteólise e também poder acidificante, com o valor médio de pH de 4,6 no tempo 24 h, sendo indicado para ser uma cultura iniciadora (*starter*) em processos fermentativos.

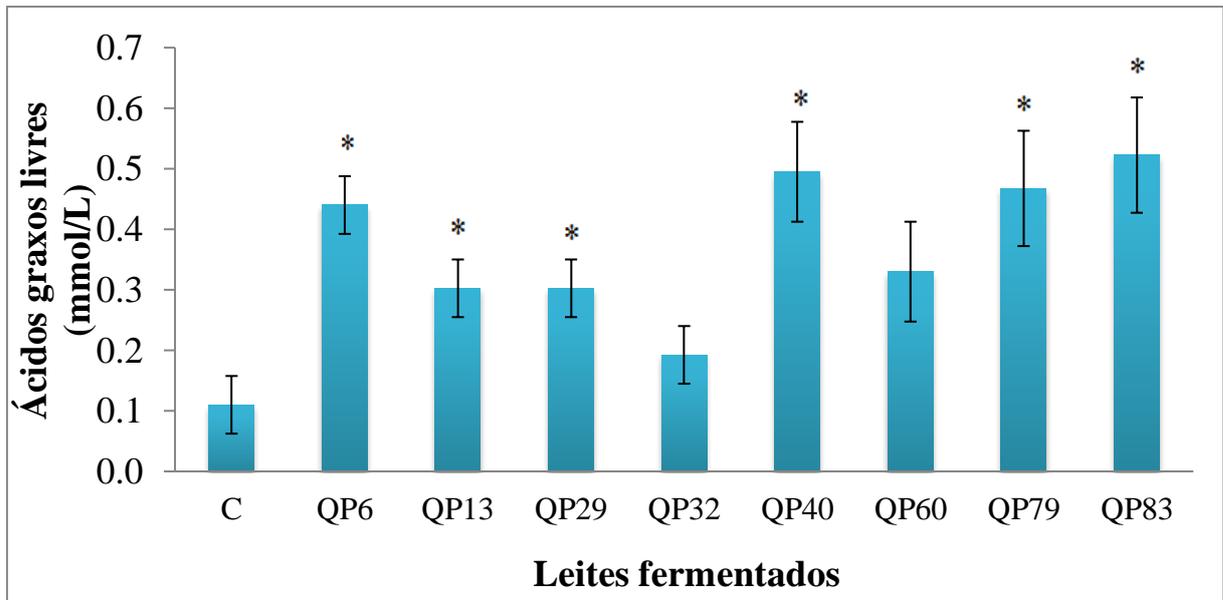
4.5.3 Avaliação da lipólise

A capacidade de degradar lipídeos dos isolados de BAL com maior número de atributos que levam a sugeri-los como potencialmente biotecnológicas foi avaliada em leite integral UAT inoculado com as respectivas bactérias. As lipases produzidas pelas BAL são capazes de hidrolisar gradualmente os triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos e, com isso, contribuem para as características sensoriais do produto (LI et al., 2021). Todas as amostras de leite fermentado contendo os isolados bacterianos apresentaram alguma atividade lipolítica quando comparadas ao controle (Figura 8).

Foi possível perceber que os isolados de BAL identificados como *Streptococcus* sp. (QP6) e *Lactococcus* sp. (QP40, QP79 e QP83) demonstraram relevante atividade de lipólise, aumentando estatisticamente ($p<0,05$) a quantidade de ácidos graxos livres no leite fermentado, quando comparado do controle, após 30 dias de refrigeração (Figura 8). Batista et al. (2017) não observaram diferença estatística no teor de ácidos graxos entre o 1° e o 21° dia de armazenamento refrigerado do leite fermentado com adição de farinha de banana verde. Porém, a adição de 1% e 3% (p/v) de farinha de banana verde aumentou os ácidos graxos de cadeia

longa, como oleico, linoleico, α -linolênico e compostos voláteis como ésteres, cetonas e ácidos carboxílicos, contribuindo na aceitação de sabor e aroma dos produtos (BATISTA et al., 2017).

Figura 8 - Concentração de ácidos graxos livres em leites fermentados com BAL isoladas de soro de queijo Porungo



Leite integral UAT foi fermentado a partir da inoculação de diferentes bactérias do ácido lático isoladas de soro fermento com potencial biotecnológico: *Streptococcus* sp.(QP6; QP13; QP29; QP32) e *Lactococcus* sp. (QP40; QP60; QP79; QP83). Leite integral não inoculado foi utilizado como controle experimental (C). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de duas repetições biológicas e três repetições técnicas para cada amostra. Asteriscos indicam que a amostras difere estatisticamente ($p < 0,05$) do controle.

Em estudos comparando o leite de vaca cru e o iogurte fresco recém fermentado foi observado que as quantidades de ácidos graxos também aumentaram devido à lipólise da gordura durante a fermentação, onde as concentrações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados nos iogurtes foram maiores em comparação com o leite cru (GU et al., 2021). O mesmo aconteceu na elaboração de iogurte com adição de lipase à fermentação conduzida por BAL onde foram identificados ácidos graxos de cadeia curta em níveis baixos, porém esses contribuem para o sabor característico do iogurte (HUANG et al. 2020). Já Garavand et al. (2023) observaram que os ácidos graxos diminuíram com o decorrer da fermentação, atribuindo o fenômeno às BAL que podem utilizar os ácidos graxos como substratos decorrentes da hidrólise da posição sn-3 pela ação da lipase. Outra razão foi atribuída à combinação de alta temperatura de pasteurização e cisalhamento que pode ter causado uma queda substancial no teor de ácidos graxos livres no produto final, devido à exposição à reação de oxidação.

As amostras QP79 e QP83 demonstraram baixo poder de acidificação (Figura 6), porém alto grau de lipólise, podendo ser um indicativo do potencial uso como BAL não iniciadoras. Por outro lado, QP6 e QP32, apresentaram elevada atividade de acidificação e de lipólise. BAL iniciadoras tem o potencial de rápida acidificação no leite, enquanto BAL não iniciadoras são utilizadas na maturação de produtos lácteos devido à sua capacidade de hidrolisar proteínas e lipídeos, pois algumas BAL não iniciadoras possuem maiores atividades de lipase e esterase quando comparadas às BAL iniciadoras, levando a uma maior produção de ácidos graxos livres (GOBETTI et al., 2015; MARGALHO et al., 2021). Em diferentes produtos lácteos, as atividades das enzimas lipolíticas são desejáveis para formar aroma, sabor e textura em queijos, iogurtes, manteigas e demais derivados lácteos, porém a lipólise excessiva pode causar sabor amargo e rançoso (ISLAM et al., 2021).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que o soro-fermento de queijo Porungo é rico em BAL com potencial biotecnológico. Essas bactérias são responsáveis pelas características sensoriais do queijo e podem ser utilizadas na elaboração de outros derivados lácteos. Esta pesquisa apresenta grande relevância, pois apresentam resultados inéditos sobre a microbiota existentes no queijo Porungo. As diferentes características dos isolados permitem a utilização destes como culturas *starters* ou mesmo como bactérias coadjuvantes em processos fermentativos. Novos testes combinando diferentes isolados na elaboração de alimentos fermentados precisam ser realizados afim de expandir a aplicação destes na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARQUERO, D. *et al.* Evaluation of technological properties and selection of wild lactic acid bacteria for starter culture development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 171, p. 114-121, 2022.
- ABEDI, E., HASHEMI, S.M.B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art . **Heliyon**, v.6, 2020.
- AGAGÜNDÜZ, D.*et al.* Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. **Food Bioscience**, v. 47, 2022.
- AGOSTINI, C. *et al.* Characterization of technological and probiotic properties of indigenous *Lactobacillus* spp. from south Brazil. **Biotech**, v. 8, p. 451, 2018.

ALEGRIA, A. *et al.* Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p 61-66, 2010.

ALLAM, M.G.M. *Lactococcus* species for conventional Karish cheese conservation. **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p. 625-631, 2017.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4^a ed. Washington, 2001.

ARAÚJO, LM (2017). **Avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas infantis de queijo de coalho do sertão da Paraíba**. 2017. 72 f. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

ARAÚJO-RODRIGUES, H. *et al.* Technological and protective performance of LAB isolated from Serpa PDO cheese: Towards selection and development of an autochthonous starter culture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 150, 2021.

ARRIOJA-BRETÓN, D. *et al.* Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. **Food Control**, v. 115, 2020.

ASAHINA, Y. *et al.* Expression profiles of milk proteolysis-related genes in *Lactobacillus paracasei* EG9, a non-starter lactic acid bacterial strain, during Gouda-type cheese ripening. **International Dairy Journal**, v.110, 2020.

ASHAOLU, T.J. *et al.* Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 130-110625. 2020.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the Association of the Official Analytical Chemists**. 16th ed. Arlington, Virginia: AOAC, 1995.

ASTERI, I. A. *et al.* Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses—A pool of novel species and starters. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 595-604, 2009.

BANGAR, P. S. *et al.* Retrospecting the concept and industrial significance of LAB bacteriocins. **Food Bioscience**, v. 46, 2022.

BATISTA, A.L.D. *et al.* Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 242-250, 2017.

BEERENS, H.; LUQUET, F. M. **Guía práctico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Acríbia Zaragoza, v. 1, 1990.

BOZOUDI, D. *et al.* A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. **International Journal of Food Microbiology**, v.200, p 87–96, 2015.

BRAJĚK, B.O.; SMAOUI S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. **Biomed Research International**, v.38, 2019.

BRITO, L.P. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from coalho cheese from northeast Brazil in dairy production: A screening for technological application. **Research, Society and Development**, v. 9, n.10, 2020.

CAMESASCA, L. *et al.* Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate. **Biotechnology Reports**, v. 31, 2021.

CHAUDHURI, P., SINGH, D. Modified methods for simple and rapid detection of bacterial deoxyribonuclease production. **Journal of Microbiological Methods**. v 16, p 307-3011, 1992.

CHEN, P.T. *et al.* Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. **Bioresource Technology**, v 308, 2020.

CHEN, X. *et al.* What happens to commercial camembert cheese under packaging? Unveiling biochemical changes by untargeted and targeted metabolomic approaches. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132-137, 2022.

CODEX ALIMENTARIUS. Norma para Iogurte. CODEX STAN 243-2003. 2003. Disponível em: www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/shroxy/en/?lnk=1&url=Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf

COELHO M.C. *et al.* Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. **Foods**, n 11, v.15, p. 22-76 2022.

DABA, G.M., ELKHATEEB, W.A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, 2020.

DIAS, F. S. *et al.* Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? **Scientia Plena**, v.15, n.2, 2019.

DIMITRELLOU D. *et al.* Effect of Milk Type on the Microbiological, Physicochemical and Sensory Characteristics of Probiotic Fermented Milk. **Microorganisms**, v.7, n 9, p. 274, 2019.

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.

DUARTE, V. da S. *et al.* Assessment of the microbiological origin of blowing defects in Grana Padano Protected Designation of Origin cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 2858-2867, abr. 2022.

DURANGO-ZULETA, M.M. *et al.* Isolation, identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria associated with two traditional Colombian types of cheese: Quesillo and double-cream cheese. **LWT- Food Science and Technology**, v.171, 2022.

FAO/WHO. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April to 1 May 2002.

FAO/WHO. **Proposals for new and/or revision of food additive provisions**. Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO) Standards Programme: Codex Alimentarius Commission. China, 2016.

FERRARI, I.S. *et al.* Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella* Typhi in artisanal cheese. **Food Microbiology**, v.60, p. 29-38, 2016.

GAO, P. *et al.* Analysis of the non-volatile components and volatile compounds of hydrolysates derived from unripened cheese curd hydrolysis by different enzymes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 168, 2022.

GARAVAND, F. *et al.* The consequence of supplementing with synbiotic systems on free amino acids, free fatty acids, organic acids, and some stability indexes of fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 137, 2023.

GATTI, M. *et al.* Elaboration of dairy products with reduced levels of lactose and high survival of probiotic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7380-7390, 2014.

GHOSH T, *et al.* Mechanistic Insights Into Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Associated With Ethnic Fermented Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, v.26, 2019.

GIAZZI, A. *et al.* Technological properties of lactic acid bacteria isolated in northern Paraná **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 4, p. 18861-18877, 2020.

GOBBETTI, M. *et al.* Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 167-178, 2015.

GODOY, A.S. **Estudos estruturais e funcionais das enzimas beta-galactosidases de bacterias**. 2016. Tese (Doutorado em Física Aplicada). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

GONTIJO, M.T.P. *et al.* Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food Research International**, v.128, 2020.

GU, Y. *et al.* Evaluation of FAAs and FFAs in yogurts fermented with different starter cultures during storage. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 96, 2021.

GUPTA, H.; MALIK, R. K. Incidence of virulence in bacteriocin-producing enterococcal isolates. **Le Lait**, v. 87, n. 6, p. 587-601, 2007.

HANCHI H. *et al.* The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. **Journal Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

HATTI-KAUL, R. *et al.* Lactic acid bacteria: From starter cultures to chemical producers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 20, p. 213, 2018.

HUANG, Y. *et al.* Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase, **LWT - Food Science and Technology**, v.131, 2020.

ILLIKOUD, N. *et al.* Dairy starters and fermented dairy products modulate gut mucosal immunity. **Current Opinion in Food Science**, v.40, p. 34-40, 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4^a ed. (1^a Edição digital), 2008. 1020 p.

ISLAM, M. Z. *et al.* Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties. **Small Ruminant Research**, v. 205, 2021.

JUILLARD, V. *et al.* The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 12, p. 3472-3478, 1995.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p.40–49, 2018.

KAMIMURA, B.A. *et al.* Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v.89, 2020.

KASSAA, I. *et al.* LABiocin database: A new database designed specifically for Lactic Acid Bacteria bacteriocinas. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, p.771–779, 2020.

KAYA, H.I. *et al.* O. Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 115, 2019.

KHARCHENKO, N.V. *et al.* New approaches for the isolation of bifidobacterial strains, their molecular characterization, and assessment of their probiotic potential. **Microbiology**, v. 84, p. 419–424, 2015.

KIRTONIA, K. *et al.* Review Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, p.102-141, 2021.

KOCABAS, D.S.; LYNE, J.; USTUNOL, Z. Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 467–475, 2022.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211 – 213, 1987.

KUMARIYA, R. *et al.* Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis** 128 171–177, 2019.

LI, S. N. *et al.* Metabolomic profile of milk fermented with *Streptococcus thermophilus* cocultured with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, or both during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 8493-8505, 2021.

LILLO-PEREZ, S. *et al.* Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 151, 2021.

- LU, L. *et al.* β -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. **Biotechnology Advances**, v. 39, 2020.
- MAHIEU, H. Fast method of determination of free fatty acids in milk: "Lipo R" method. **Revue de Medecine Veterinaire (France)**, v.135, p. 709-716, 1984.
- MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2578-2590, 2014.
- MANZOOR, A., TAYYEB, A., Functional probiotic attributes and gene encoding plantaricin among variant *Lactobacillus plantarum* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 131, p. 22–32, 2019.
- MARGALHO, L.P. *et al.* Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, 2020.
- MARGALHO, L.P. *et al.* *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. **Food Control**, v.118, 2020.
- MARGALHO, L.P. *et al.* High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. **Food Microbiology**, v.100, 2021.
- MARTINS, M.C. F. *et al.* Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295-300, 2018.
- MASKE, B.L. *et al.* A review on enzyme-producing lactobacilli associated with the human digestive process: From metabolism to application. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 149, 2021.
- MASOTTI, F. *et al.* Composition, proteolysis, and volatile profile of Strachitunt cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1679-1687, 2017.
- MENG, Z. *et al.* Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, 2018.
- MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.
- NERO, L.A. *et al.* Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the Serro region, Minas Gerais, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 148, 2021.
- NIRO S, *et al.* Evolution of free amino acids during ripening of Caciocavallo cheeses made with different milks. **Journal Dairy Sci.**, v.100, n.2, 2017.
- NWAMBA M.C. *et al.* Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass. **Environmental Technology & Innovation**, v.21, 2021.

- O'CONNOR, P.M. *et al.* Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v.61, p.160–167, 2020.
- OLIVEIRA, R.A. *et al.* Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219–239, 2018.
- PAN *et al.* The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, v 20, p 598-602, 2009.
- PENG, K. *et al.* Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, p. 544, 2020.
- PERIN, L.M. *et al.* Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 121-126 2014.
- PRADHAN, D; MALLAPPA, R. H.; GROVER, S. Review Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, 2020.
- RAMA, G.R. *et al.* Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. **International Dairy Journal**, v. 98, p. 25-37, 2019.
- REN *et al.* In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. **Anaerobe**, v. 30, p 1-10, 2014.
- RIGO *et al.*, Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.9232-9254 jan. 2021.
- ROOBAB, U. *et al.* Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion in Food Science**, v.32, p.17–28, 2020.
- RUBAK, Y.T. *et al.* Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. **Vet World.**, v.13, n 2, p. 345-353, 2020.
- SALGADO, C.A, SANTOS, C.I.A.; VANETTI, M.C.D. Microbial lipases: Propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, v. 45, 2022.
- SAMPAIO, C.S. *et al.* Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, p.434–449, 2022.
- SARHIR, S.T. *et al.* Evaluation of Techno-functional and Biochemical Characteristics of Selected Lactic Acid Bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) Used for the Production of Moroccan Fermented Milk: Lben. **International Dairy Journal**, v. 140, p. 105, 2023.
- SENGUN, I. Y. *et al.* Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 105-111, 2009.

- SHEN, X. *et al.* Metabolomics analysis reveals differences in milk metabolism and fermentation rate between individual *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. **Food Research International**, v. 162, 2022.
- SILVA L. F. *et al.* Biodiversity and succession of lactic microbiota involved in Brazilian buffalo mozzarella cheese production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.53, p. 303-316, 2022.
- SILVA, N. F. N. *et al.* Milk quality, production process and physicochemical characteristics of Porungo, an artisanal cheese from the state of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 4, p. 480-483, 2020.
- SILVEIRA, R.F., ROQUE-BORDA, S.A., VICENTE, E.F. Review Article Antimicrobial peptides as a feed additive alternative to animal production, food safety and public health implications: An overview. **Animal Nutrition**, p. 896-904, 2021.
- SLYVKA, I. *et al.* Identification and Investigation of Properties of Strains *Enterococcus* spp. Isolated from Artisanal Carpathian Cheese. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, 2022.
- STEELE, J.; BROADBENT, J.; KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. **Current Opinion in Biotechnology**, 24:135–141, 2013.
- TAGG, J.R., DAJANI, A. S., WANNAMAKER, L.M. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriology Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.
- TAYE Y, *et al.* Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. **Scientific World Journal.**, v. 10, 2021.
- URIOT, O. *et al.* *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? **Journal of Functional Foods** 37, 74–89. 2017.
- VERMA, D. K. *et al.* Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. **Food Bioscience**, v. 46, 2022.
- WANG, S. *et al.* Properties and mechanism of the antimicrobial peptide APT produced by *Lactobacillus* ALAC-4. **LWT - Food Science and Technology**, v. 165, 2022.
- YADAV J. S. *et al.* Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v.37, n.6, p.1017-1029, 2014.
- YANG,X. *et al.* Assessment of the production of *Bacillus cereus* protease and its effect on the quality of ultra-high temperature-sterilized whole milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n.6, 2021.
- ZENDEBOODI, F. *et al.* Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v.32, p. 103–123, 2020.
- ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHENG, X. et al. Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. **Food Research International**, v.105, p.733–742, 2018.