

**Bactérias ácido láticas isoladas de queijo de Coalho do nordeste brasileiro na produção de laticínios: Uma triagem para aplicação tecnológica**

**Lactic acid bacteria isolated from Coalho cheese from northeast Brazil in dairy production: A screening for technological application**

**Bacterias del ácido láctico aisladas del queso Coalho del noreste de Brasil en la producción de lácteos: Un examen para la aplicación tecnológica**

Recebido: 02/10/2020 | Revisado: 03/10/2020 | Aceito: 05/10/2020 | Publicado: 07/10/2020

**Leandro Paes de Brito**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3440-6431>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: [leandropaes02ufpe@gmail.com](mailto:leandropaes02ufpe@gmail.com)

**Elaine Cristina da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2395-7166>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [e.silva2@outloo.com](mailto:e.silva2@outloo.com)

**Priscilla Régia de Andrade Calaça**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9092-6832>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [priscilla.calaca@hotmail.com](mailto:priscilla.calaca@hotmail.com)

**Rosália Severo de Medeiros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8101-5121>

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: [medeiros.rsm@gmail.com](mailto:medeiros.rsm@gmail.com)

**Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9573-6296>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [mtecvsoares@yahoo.com.br](mailto:mtecvsoares@yahoo.com.br)

**Ana Lúcia Figueiredo Porto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

## Resumo

No Brasil, a produção laticínios é o segundo segmento mais importante da indústria de alimentos, devido as suas características nutricionais e sensoriais. As culturas lácticas são empregadas na tecnologia de produção para acentuar o sabor, aroma, textura e acidez dos laticínios que os tornam mais aceitáveis pelos consumidores. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial tecnológico de espécies do gênero *Enterococcus* e cepas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* isoladas de queijo de Coalho artesanal da Paraíba, Brasil, a fim de selecioná-las para a fabricação de produtos lácteos fermentados. Foram avaliados a capacidade acidificante, atividade proteolítica, produção de aroma, atividade de  $\beta$ -Galactosidase, tolerância ao cloreto de sódio e atividade antagonista contra diferentes patógenos. Das cepas analisadas, 26,67% foram consideradas rápidas acidificantes, 33,33% foram capazes de produzir enzimas proteolíticas, 26,67% apresentaram atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase e 33,33% foram tolerantes ao cloreto de sódio. Os patógenos foram inibidos por 40,00% das bactérias ácido lácticas (BAL) testadas. As cepas de *Enterococcus* apresentaram valores mais elevados do que as cepas de *S. infantarius subsp. infantarius*, em especial a cepa *Enterococcus faecium* KT990027. Assim podemos concluir que *E. faecium* KT990027 pode ser usada como cultura iniciadora, pois apresentou as melhores características tecnológicas gerais aplicáveis a este tipo de cultura. Esses resultados confirmam que o queijo de Coalho artesanal da Paraíba possui BAL que podem ser utilizadas na indústria de laticínios.

**Palavras-chave:** Cultura láctea; Queijo de coalho; Bioprospecção; Indústria de laticínios.

## Abstract

In Brazil, dairy production is the second most important segment of the food industry, due to its nutritional and sensory characteristics. Lactic cultures are used in production technology to accentuate the flavor, aroma, texture, and acidity of dairy products that make them more acceptable to consumers. Therefore, the objective of this study was to evaluate the technological potential of species of the genus *Enterococcus* and strains of *S. infantarius subsp. infantarius* isolated from artisanal Coalho cheese from Paraíba, Brazil, to select them for the manufacture of fermented dairy products. The acidifying capacity, proteolytic activity, aroma production,  $\beta$ -Galactosidase activity, tolerance to sodium chloride, and antagonistic activity against different pathogens were evaluated. Of the strains analyzed, 26.67% were considered fast acidifiers, 33.33% were able to produce proteolytic enzymes, 26.67% showed  $\beta$ -galactosidase enzymatic activity and 33.33% were tolerant to sodium chloride. The

pathogens are inhibited by 40.00% of the lactic acid bacteria (BAL) tested. The strains of *Enterococcus* showed higher values than the strains of *S. infantarius subsp. infantarius*, in particular the *E. faecium* KT990027 strain. Thus, we can conclude that *E. faecium* KT990027 can be used as a starter culture, as it presented the best general technological characteristics applicable to this type of culture. These results confirm that the artisanal Coalho cheese from Paraíba has BAL that can be used in the dairy industry.

**Keywords:** Dairy culture; Coalho cheese; Bioprospecting; Dairy industry.

## Resumen

En Brasil, la producción de lácteos es el segundo segmento más importante de la industria alimentaria, por sus características nutricionales y sensoriales. Los cultivos lácticos se utilizan en la tecnología de producción para acentuar el sabor, aroma, textura y acidez de los productos lácteos que los hacen más aceptables para los consumidores. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial tecnológico de especies del género *Enterococcus* y cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* aislado de queso Coalho artesanal de Paraíba, Brasil, con el fin de seleccionarlos para la fabricación de productos lácteos fermentados. Se evaluó la capacidad acidificante, actividad proteolítica, producción de aroma, actividad  $\beta$ -galactosidasa, tolerancia al cloruro de sodio y actividad antagonista frente a diferentes patógenos. De las cepas analizadas, el 26,67% se consideraron acidificantes rápidos, el 33,33% fueron capaces de producir enzimas proteolíticas, el 26,67% presentaron actividad enzimática de  $\beta$ -galactosidasa y el 33,33% fueron tolerantes al cloruro de sodio. Los patógenos son inhibidos por el 40,00% de las bacterias del ácido láctico (BAL) analizadas. Las cepas de *Enterococcus* mostraron resultados más altos que las cepas de *S. infantarius subsp. infantarius*, en particular la cepa *E. faecium* KT990027. Así, podemos concluir que *E. faecium* KT990027 se puede utilizar como cultivo iniciador, ya que presenta las mejores características tecnológicas generales aplicables a este tipo de cultivo. Estos resultados confirman que el queso Coalho artesanal de Paraíba tiene BAL que se puede utilizar en la industria láctea.

**Palabras clave:** Cultivo lácteo; Queso coalho; Bioprospección; Industria láctea.

## 1. Introdução

O setor de laticínios é uma grande força global responsável por impactos de longo alcance na economia, sociedade e indivíduos. Segundo os dados do Global dairy platform

(GDP, 2020), os laticínios estão entre cinco produtos mais comercializados mundialmente, tanto em volume quanto em valor. Estimativas do GDP (2020) indicam que cerca de 816 bilhões de litros de produtos lácteos são produzidos anualmente no mundo e, em média, 44,4 litros são consumidos por habitante ao longo do ano. No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017), as taxas de produção de laticínios em 2017 foram de 34,5 bilhões de litros e as projeções indicam que esse número deve atingir 48 bilhões em 2027.

Além da sua importância econômica para a população mundial, os leites e derivados também são fontes vitais de nutrição para os consumidores. São alimentos complexos que contém macro e micronutrientes importantes para o desenvolvimento humano como gorduras, carboidratos (lactose), proteínas e aminoácidos de alto valor biológico, além de vitaminas e minerais (Scholz-Ahrens et al., 2020).

Dentre os produtos lácteos mais consumidos destacam-se os leites fermentados, iogurtes, queijos e manteigas. Em particular, as bactérias ácido lácticas são as principais culturas microbianas empregadas na produção desses alimentos. Algumas BAL são geralmente reconhecidas como seguras (Generally Regarded as Safe - GRAS) e desempenham um papel importante na fermentação e preservação de alimentos como microbiota natural ou como culturas iniciadoras adicionadas sob condições controladas (Yang et al., 2012). Além disso, produzem compostos responsáveis pelas características sensoriais como aroma, textura e acidez, tornando-os mais atrativos e aceitáveis pelos consumidores.

Essas características são consideradas alvos principais a serem preservados durante os processos de fabricação. Portanto, no contexto de uma demanda por produtos lácteos que atendam esses critérios, a bioprospecção de novas BAL tem se tornado de interesse entre as indústrias de laticínios, e isso requer estudos de caracterização tecnológica e fisiológica úteis de cepas a fim de selecionar aquelas que são mais adequadas para aplicações industriais.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil tecnológico de espécie do gênero *Enterococcus* e cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* isoladas de queijos de Coalho artesanais do Sertão da Paraíba a fim de selecioná-las para a fabricação de produtos lácteos fermentados.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo**

As cepas de BAL foram isoladas e identificadas molecularmente em um estudo anterior realizado por Medeiros et al. (2016). Dentre estas, 15 cepas foram selecionadas para o nosso estudo, as quais encontram-se criopreservadas em glicerol e resfriadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no acervo bacteriológico do Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, campus Recife-PE. As culturas foram reativadas por duas vezes antes de cada experimento, sendo a primeira em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 10%, em seguida em caldo de Man Rogosa e Sharpe (MRS) (HIMIDIA) e incubadas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24h entre as reativações.

### **2.2 Avaliação da capacidade acidificante**

A taxa de acidificação foi calculada segundo a metodologia de Kihal et al. (1996) e o resultados foram expressos em Graus Dornic ( $^{\circ}\text{D}$ ).

As culturas lácticas ativadas foram ajustadas a uma concentração de  $10^8$  UFC/mL e inoculadas em tubos contendo 10 mL de LDR (10%) com pH inicial de 6,5 e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa bacteriológica, por 6 e 24 h. O controle do experimento foi realizado pela incubação de 10 mL de LDR (10%) com pH inicial de 6,5 sem inóculo. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

As estirpes foram classificadas em rápida ou lentas acidificantes, de acordo com Settanni e Moschetti (2010).

### **2.3 Determinação da atividade proteolítica e produção de aroma (diacetil)**

A determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa foi realizada segundo metodologia de Pailin et al. (2001), modificada pelo uso da técnica de Disco Difusão, com a padronização das BAL em  $10^8$  UFC/mL em  $5\mu\text{L}$  de meio nos discos-testes e  $5\mu\text{L}$  MRS acrescido de 5% de glicose nos discos controle negativo. As placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas, seguido de refrigeração a  $10^{\circ}\text{C}$  por mais 72h. Decorrido o tempo os halos foram medidos (mm) com auxílio de um paquímetro.

A avaliação da capacidade de produção de diacetil foi realizada segundo a metodologia de Furtado (1990), modificada quanto ao tempo de agitação que foi de 5 minutos. Esta metodologia consiste em adicionar a 2,5mL da cultura previamente ativada (descrito no item 2.1), 1 mL de solução de creatina 1% e 2,5ml de solução de NaOH 10N, seguidos de agitação em vortex por 5 minutos. A produção de diacetil e acetil metil carbinol foi indicado pelo aparecimento de coloração rósea e classificada de acordo com a intensidade da cor desenvolvida como fraca, moderada, forte e ausente.

## **2.4 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase**

Para a atividade da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ - gal) as cepas bacterianas foram cultivadas em meio contendo 5% p/v de leite desnatado, 0,35% p/v de extrato de levedura, 0,35% p/v de peptona e 5% p/v de lactose, onde foram inoculadas 1% v/v da cultura ativada e incubadas por 24h a 37°C, conforme Van den Berg et al. (1993) com modificações.

Após o período de cultivo, as cepas foram padronizadas para  $10^8$  UFC/mL, centrifugadas (6440xg, 10min, 4°C), lavadas em tampão 0,1M fosfato de sódio pH 7 e ressuspendidas no mesmo tampão. As células foram submetidas a lise em banho de gelo utilizando sonicador (Sonoplus, Bandelin) a uma amplitude de 30% durante 6 minutos (30 segundos em agitação e 10 segundo em repouso), e em seguida centrifugadas para obtenção da enzima intracelular.

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com o procedimento de Nagy et al. (2001) modificado onde 3mM do substrato cromogênico o-nitrofenol-b-D-galactopiranosideo (ONPG) (Sigma) foi dissolvido em 0,05M tampão fosfato pH 7. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ONPG por minuto sob as condições do ensaio.

## **2.5 Tolerância ao Cloreto de Sódio**

A tolerância das culturas lácticas ao cloreto de sódio (NaCl) foi avaliada com base nos testes de crescimento em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (HIMIDIA), suplementado com NaCl a 3 e 4% (p/v) (Vetec Química Fina Ltda) seguidos de incubação a 37°C, por 48h (Harrigan, 1998). O controle do experimento foi realizado com o crescimento das culturas lácticas em caldo TSB, sem suplementação de NaCl. A avaliação do crescimento foi determinada pela leitura da absorbância a 630 nm.

## 2.6 Avaliação da atividade antagonista

As bactérias ácido lácticas foram avaliadas contra agentes contaminantes indicadores de origem alimentar ou não, incluindo *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria innocua* ATCC 33090. As bactérias indicadoras testadas foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) (HIMIDIA) e incubadas a 37°C por 18 horas em condições aeróbias, ao final da incubação foram ajustadas para uma concentração de  $10^7$  UFC/mL.

Para o cultivo das BAL foi utilizado o caldo MRS, incubando-se a 37° C por 24h. Após o crescimento, 5µL de cada cultivo, ajustados através de uma curva padrão a uma concentração de  $10^8$  UFC/mL, foram colocados sob a superfície de discos de papel filtro esterilizados em uma placa de Petri contendo ágar MRS e incubados a 37°C, durante 24 horas. A seguir, 3,5 mL de ágar semissólido contendo as bactérias patogênicas cultivadas por 24h em caldo BHI foram adicionados por cima do disco nas placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, durante 48 horas, sob observação a cada 24 horas. As zonas de inibição em torno dos discos de papel foram medidas em milímetros com paquímetro e as análises dos dados foram avaliadas conforme as metodologias de Guedes Neto et al. (2005) e Thirabunyanon & Thongwittaya (2012). Todo o experimento foi realizado em duplicata.

## 2.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a uma avaliação quantitativa para a obtenção do percentual (%) de eficiência dos microrganismos.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1 Avaliação da atividade acidificante

De acordo com a metodologia utilizada, apenas 26,67% dos 15 isolados foram capazes de reduzir o pH do leite para  $\leq 5,3$  ( $\Delta$ pH de 1,23 a 1,46) após 6h de incubação e exibiram  $\Delta$ pH de 2,02 a 2,66 após 24h, sendo estes pertencentes a *Enterococcus faecium* (KT990025, KT990027, KT990026 e KT990019). Podemos observar que *E. faecium* KT990025

apresentou as maiores variações de acidificação  $\Delta\text{pH}$  1,46 e  $\Delta\text{pH}$  2,66 a 6 e 24h, respectivamente (Tabela 1).

Para as cepas de *E. faecium* citadas acima, os resultados da acidez titulável, após 6h de incubação, variaram nos intervalos de 15,50 a 19,50°D e depois de 24h exibiram variações entre 28,00 a 33,50°D. Consequentemente, o *E. faecium* KT990025 apresentou os maiores valores na acidez titulável,  $19,50\pm 0,71$  e  $34,50\pm 2,12$  após 6h e 24h, respectivamente.



**Tabela 1.** Propriedades tecnológicas das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal do Sertão da Paraíba.

Espécies	Amostras	Acidificação					Proteólise (mm)	Diacetil *	β-gal (U/mL <sup>-1</sup> )	NaCl **	
		0h	6h	24h	Acidez titulável 6h	Acidez titulável 24h				3%	4%
<i>Enterococcus faecium</i>	KT990013	6,50	5,61±0,01	4,48±0,02	12,00±0,00	29,00±1,41	0,00	-	0,00	90%	130%
	KT990024	6,50	5,44±0,01	4,13±0,00	14,00±1,41	36,50±0,71	0,00	-	0,00	84%	89%
	KT990022	6,50	5,53±0,01	4,03±0,00	13,00±0,00	28,50±0,71	0,00	-	3,64±0,018	64%	69%
	KT990025	6,50	5,04±0,00	3,84±0,01	19,50±0,71	34,50±2,12	15,50±0,7	-	0,00	74%	62%
	KT990027	6,50	5,26±0,01	4,11±0,01	15,50±0,71	27,50±3,54	12,00±1,4	-	10,42±0,002	91%	95%
	KT990026	6,50	5,12±0,00	3,87±0,01	16,00±1,41	33,50±3,54	13,00±1,4	-	0,00	132%	120%
	KT990019	6,50	5,27±0,00	4,05±0,01	15,50±0,71	30,00±0,00	14,50±2,1	-	0,00	87%	76%
	KT990028	6,50	5,52±0,01	4,03±0,00	14,00±0,00	28,00±1,41	0,00	-	1,79±0,001	81%	89%
<i>Enterococcus faecalis</i>	KT990001	6,50	5,41±0,01	4,02±0,00	13,50±0,71	31,50±2,12	0,00	-	0,00	143%	84%
<i>Enterococcus durans</i>	KT989997	6,50	5,42±0,01	4,02±0,00	15,50±0,71	35,50±0,71	0,00	-	7,78±0,04	125%	113%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	KT989994	6,50	5,55±0,01	4,11±0,00	14,00±0,71	31,00±1,41	0,00	-	0,00	88%	82%
<i>S. infantarius subsp. infantarius</i>	KT990067	6,50	5,57±0,01	4,10±0,00	12,00±0,00	34,00±1,41	17,00±1,4	-	0,00	66%	49%
	KT990068	6,50	5,54±0,00	4,12±0,01	13,00±0,00	33,50±2,12	0,00	-	0,00	188%	132%
	KT990068	6,50	5,50±0,00	4,06±0,01	13,50±0,71	34,50±2,12	0,00	-	0,00	159%	208%
	KT990071	6,50	5,47±0,00	4,05±0,00	15,00±0,00	30,00±0,00	0,00	-	0,00	226%	182%

\*+Presença; -Ausência; \*\*Percentual de crescimento bacteriano. Fonte: Elaborado pelas autoras.

Corroborando com nossos resultados, Giraffa (2003) relataram que as cepas de *E. faecalis* isoladas de queijo italiano foram consideradas rápidas acidificantes por reduzirem o pH do leite desnatado para cerca de 4,5 após 24h de incubação. Em um outro estudo, as cepas de *E. faecium* também foram consideradas boas acidificantes ao reduzirem o pH do leite para a faixa de 3,85 a 4,05 após 24h de fermentação (Banwo et al., 2012). Nossos resultados também foram similares aos reportados por Ribeiro et al. (2013) onde o isolado de *Enterococcus* (L3A21M3) apresentou atividade acidificante, reduzindo o pH do leite para 4,9 em 6h a 37°C.

Os resultados obtidos neste estudo são importantes para as culturas lácticas iniciadoras, pois os microrganismos que produzem ácido suficiente para reduzir o pH do leite de seu valor inicial de 6,6 a 5,3 em 6h a 30-37°C (Cogan et al., 1997; Beresford et al., 2001), colaboram grandemente com a tecnologia de produção, sendo essa diminuição essencial para a coagulação, dando firmeza na coalhada e controle de microrganismos indesejáveis (Ribeiro et al., 2013), além de permitir que o tempo total de produção seja diminuído, o que reduz a quantidade de sinérese e atribui maior teor de umidade (McMahon & Oberg, 2017).

Em outro estudo, Cabral et al. (2016) também identificaram rápida acidificação entre as 25 cepas do gênero *Enterococcus spp.* isoladas de queijo de Coalho no agreste do estado de Pernambuco, uma vez que todas foram capazes de reduzir o valor do pH em 0,4 valores de pH até 3h, em relação ao valor inicial do pH do leite de 6,48. A capacidade acidificante de *Enterococcus spp.* também foi relatada por Dias et al. (2019), onde 14 das 29 cepas analisadas reduziram o pH do leite para 5,3 em 6h de incubação.

Desse modo, as quatro estirpes que reduziram o valor do pH do leite para  $\leq 5,3$  em até 6 h apresentam capacidade elevada para utilização como culturas iniciadoras tanto na produção de queijos como na produção de bebidas lácteas.

As demais cepas apresentaram baixa capacidade acidificante e podem ser utilizadas para outros fins. O baixo perfil acidificante exibido por isolados de BAL também é uma característica desejável para sua aplicação como culturas adjuvantes em queijos (Gobbetti et al., 2015). Além disso, as cepas de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. casseliflavus* e todos os *S. infantarius subsp. infantarius* de acidificação lenta, encontradas nesse estudo, podem ser utilizadas na fabricação de bebidas lácteas em co-cultura com outras BAL a fim de otimizarem e reduzirem o pH ao longo do processamento, dado que essas bebidas são comumente produzidas a partir da simbiose de culturas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *S. thermophilus* (Han et al., 2013; Aryana & Olson, 2017).

### 3.2 Determinação da atividade proteolítica e produção de diacetil

Os resultados da atividade proteolítica apresentados na Tabela 01 indicam que 33,33% das 15 estirpes apresentaram capacidade de degradação da caseína, dentre estes, quatro pertencem a *Enterococcus faecium* (KT990025; KT990027; KT990026; KT990019) e um de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* (KT990067). Os valores médios dos halos variaram entre  $12,00 \pm 1,4$  mm e  $17,00 \pm 1,4$  mm.

Os isolados de *Enterococcus* que exibiram acidificação rápida também foram responsáveis pela hidrólise da caseína. Além disso, a cepa de *E. faecium* (KT990025) mostrou maior medida do diâmetro de halo ( $15,50 \pm 0,7$  mm) dentre as espécies deste gênero.

O sistema proteolítico das BAL é essencial para o crescimento ideal no leite, são microrganismos que apresentam um complexo de proteases e peptidases, que lhes permitem o uso da caseína do leite como fonte de aminoácidos e nitrogênio (Aspri et al., 2016).

Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por Dias et al. (2019) onde 76,00% cepas de *Enterococcus* ssp. isoladas de queijo de Coalho apresentaram atividade proteolítica com média de 15,83 ( $\pm 3,2$ ) de diâmetros de halos. Jaouani et al. (2015), ao avaliarem as características tecnológicas de cepas do gênero de *Enterococcus* identificaram que três estirpes de *E. faecium* e duas de *E. faecalis* foram capazes de degradar a caseína. Aspri et al. (2016) reportaram um total de 78% de *E. faecium* isolados de leite cru de burra também apresentaram proteólise da caseína.

A estirpe do *S. infantarius subsp. infantarius* (KT990067), destacou-se com o maior halo observado no experimento. Delorme et al. (2010) descrevem que o gênero *Streptococcus* comumente abriga o gene PrtS em seu cromossomo e que este é responsável pela codificação de uma enzima chave da atividade proteolítica. Os resultados encontrados por Galia et al. (2009) corroboram com os nossos achados. Esses autores identificaram que entre uma coleção de 30 cepas de *S. thermophilus*, 15 apresentaram o gene PrtS e demonstraram atividade proteolítica.

Domingos-López et al. (2016) relatam que propriedades tecnológicas, como atividade proteolítica extracelular, são características importantes que auxiliam na maturação, textura, desenvolvimento de aromas e síntese de peptídeos bioativos (antimicrobianos) de produtos fermentados tais como queijos e bebidas lácteas. Sendo assim, as cepas analisadas em nosso estudo, foram positivas para a proteólise da caseína e podem ser empregadas para a fabricação desses produtos, principalmente as que pertencem ao gênero *Enterococcus*, pois apresentaram também uma rápida acidificação, demonstrando aparentemente serem culturas iniciadoras.

Nenhuma das cepas foi capaz de produzir o composto diacetil, apesar desse composto estar envolvido na formação de sabor, textura e aroma durante a fermentação e maturação de produtos lácteos (Moreno et al., 2006), nem sempre são produzidos, pois de acordo com Ribeiro et al. (2013), nem todas as cepas de BAL, como as do gênero *Enterococcus* spp., têm capacidade de metabolizar o citrato, portanto, esse comportamento pode diferir entre espécies e linhagens.

### 3.3 Determinação da atividade enzimática de $\beta$ -galactosidase

Os resultados reportados na Tabela 01 demonstram que a cepa com maior capacidade de síntese de  $\beta$ -galactosidase foi o *E. faecium* KT990027 com 10,4 U/mL<sup>-1</sup>. No entanto, 26,67%, três cepas de *E. faecium* (KT990022; KT990027; KT990028) e uma de *E. durans* (KT989997) apresentaram resultados da atividade enzimática.

De acordo com a literatura consultada, o *E. faecium* possui como característica individual a produção de  $\beta$ -galactosidase. Favaro et al. (2013) relataram que todas as cepas *E. faecium* (ST209GB, ST278GB, ST315GB e ST711GB) também apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase, e no estudo de Ribeiro et al. (2013) cada cepa de *E. faecalis* (L3A21M3, L3A21K6 e L321K7) produziram cerca de 5 U mL<sup>-1</sup>, valores abaixo ou acima dos observados na nossa pesquisa.

Silvério et al. (2018) explicam que essa enzima é considerada como a glicosidase mais promissora que apresenta atividades hidrolíticas e de transglicosilação e por exibirem capacidade de hidrolisar a lactose e liberar galactose e glicose, que no geral são mais doces e mais solúveis que a própria lactose, tornando-se importantes para indústria de laticínios.

Além disso, Vaillancourt et al. (2004) esclarecem que a glicose, gerada a partir da atividade da  $\beta$ -galactosidase, é catabolizada principalmente em ácido láctico através do metabolismo do piruvato na fermentação homolática elevando as taxas de acidificação e titulação ácida. Portanto, a atividade da  $\beta$ -galactosidase é essencial para o desempenho das BAL na redução do pH durante a fermentação (Husain, 2010), além de atribuírem melhores propriedades sensoriais como textura, doçura, valor nutricional e solubilidade aos produtos lácteos, e serem também amplamente utilizadas contra distúrbios intestinais, como intolerância a lactose (Zárate & Chaia, 2012).

### 3.4 Tolerância ao cloreto de sódio

Os percentuais de tolerância ao NaCl das BAL estão apresentados na Tabela 01. Podemos observar que 33,33% das cepas avaliadas neste estudo demonstraram tolerância ao NaCl nas concentrações usadas. Mais uma vez o gênero *Enterococcus* se destacaram, entretanto a faixa de tolerância diferiu entre as espécies testadas aqui. As cepas de *Streptococcus infantarius subsp infantarius* (KT990068, KT990070; KT990071) também apresentaram tolerância nas condições usadas.

Corroborando com os nossos achados, Jaouani et al. (2015) observaram que todas as cepas do gênero *Enterococcus* (nove *E. faecium*, oito *E. faecalis*, três *E. hirae* e dois *E. mundii*) foram capazes de crescer a 2%, 4% e 6% de NaCl. Em um outro estudo realizado por Ribeiro et al. (2013) as estirpes de *E. faecalis* isolados de queijo Pico, também apresentaram resistência ao alto teor de cloreto de sódio (até 10%).

A tolerância dos representantes do gênero *Streptococcus* foi um resultado esperado, pois de acordo com a literatura, são capazes de suportar uma concentração máxima de sal de até 2,5% (Fox et al., 2000).

Sendo assim, as BAL que foram capazes de tolerar a presença de NaCl nas duas concentrações ou pelo menos a uma delas podem ser utilizadas principalmente na fabricação de queijos de Coalho (produzido com 3,0% a 4,0% de NaCl), queijo Pico (1% de NaCl) (Ribeiro et al., 2013), queijo Minas Fescal (1,4% a 1,5% de NaCl) e queijo Parmesão (2,0% a 3,5% de NaCl) (Silva, 2005).

### 3.5 Determinação da atividade antagonista

A atividade antagônica das cepas de BAL contra microrganismos indicadores estão apresentados na Tabela 2, nela podemos observar que 40,00% das BAL avaliadas neste estudo apresentaram efeito antagônico contra os sete microrganismos utilizados. Os indicadores *E. faecalis* ATCC6057 e *K. pneumoniae* ATCC26665 foram os únicos inibidos por todas as BAL. O percentual de BAL capazes de inibir *S. aureus* ATCC6538 foi de cerca de 53,33%.

**Tabela 2.** Média dos halos de inibição (mm) do antagonismo *in vitro* de amostras de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal do Sertão da Paraíba frente bactérias indicadoras.

Espécies	Amostras	Bactérias Indicadoras						
		Gram-Positivas				Gram-Negativas		
		<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. faecalis</i> ATCC6057	<i>L. innocua</i> ATCC33090	<i>S. aureus</i> ATCC6538	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC26665	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853
<i>Enterococcus faecium</i>	KT990013	13,00±0,0	10,50 ±0,7	11,50±0,7	10,00±0,0	10,50±0,7	13,00±0,0	9,50±0,7
	KT990024	13,00±1,4	11,00±1,4	12,00±0,0	10,00±0,0	9,00±0,0	15,00±0,0	16,60±2,1
	KT990022	11,00±0,0	10,00±0,0	13,50±0,7	15,00±0,0	14,00±0,0	12,00±0,0	0,00±0,0
	KT990025	11,00±0,0	11,00±0,0	15,00±1,4	13,00±0,0	10,50±0,7	10,50±0,7	12,00±0,0
	KT990027	10,50±0,7	12,50±0,7	16,00±0,0	0,00±0,0	10,50±0,7	12,00±0,0	17,50±0,7
	KT990026	0,00±0,0	13,00±0,0	13,00±1,4	0,00±0,0	10,00±1,4	13,00±1,4	16,50±0,7
	KT990019	0,00±0,0	10,50±0,7	12,50±0,7	0,00±0,0	11,50±0,7	12,00±0,0	12,00±0,0
	KT990028	0,00±0,0	11,50±0,7	15,50±0,7	14,50±2,1	12,50±0,7	11,50±0,7	14,50±2,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	KT990001	12,00±0,0	12,00±0,0	12,00±0,0	12,00±0,0	13,00±0,0	11,50±0,7	18,00±0,0
<i>Enterococcus durans</i>	KT989997	0,00±0,0	10,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	8,00±0,0	0,00±0,0
<i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	KT989994	0,00±0,0	16,00±0,0	10,00±0,0	0,00±0,0	12,00±1,4	12,50±0,7	18,00±0,0
	KT990067	11,00±0,0	14,00±0,0	13,00±0,0	13,50±2,1	12,50±0,7	13,00±0,0	12,00±2,8
	KT990068	11,00±0,0	13,00±0,0	16,50±2,1	0,00±0,0	11,50±0,7	12,00±0,0	18,00±0,0
	KT990070	13,00±0,0	12,00±0,0	11,50±0,7	0,00±0,0	13,50±0,7	11,50±0,7	15,50±0,7
	KT990071	12,50±0,7	13,00±0,0	12,50±0,7	14,00±1,4	14,00±2,8	12,50±0,7	16,50±0,7

Fonte: Elaborado pelas autoras.

Para a seleção de culturas iniciadoras ou adjuvantes visando sua utilização em alimentos fermentados, propriedades como síntese de substâncias antimicrobianas contra certos patógenos se torna crucial (Ispirli et al., 2016), uma vez que alimentos como produtos lácteos apresentam diversos patógenos deteriorantes de origem alimentar, como *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (Aspri et al., 2016).

Os nossos resultados foram aproximados aos obtidos por Ispirli et al. (2016), esses autores observaram que 50% das cepas de *Enterococcus* spp. testadas apresentaram halos de inibição com diâmetros variando entre 5-10 mm contra *E. coli* e *S. aureus*. Em outro estudo, realizado por Belgacem et al. (2009), todas as cepas de *E. faecium* apresentaram inibição contra *L. innocua*, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecalis* JH2-2 e *E. faecium* 603, como halos entre 12,00 a 15,00 mm.

Podemos observar que as cepas de *E. faecium* apresentaram o maior número de inibição frente aos microrganismos indicadores. Esse fato também foi observado por Aspri et al. (2017) onde as cepas de *E. faecium* (DM 33, CM 224 e DM270) apresentaram atividade inibitória contra quatro tipos de indicadores, como *B. cereus* DPC 6089, *S. aureus* RF122 e *L. monocytogenes* 33104 e *L. monocytogenes* 33413.

Todas as cepas de BAL analisadas em nossa pesquisa, exceto *E. durans* (KT989997) apresentaram atividade antagonista frente a *L. innocua* ATCC33090, um dado relevante, uma vez que, o queijo é considerado um dos alimentos mais frequentemente contaminados com *Listeria* spp., principalmente *L. monocytogenes*, sendo um microrganismo capaz de se adaptar e proliferar a baixas temperaturas e pH, altos teores de sal e possuem alta capacidade de formação de biofilmes (Papademas & Aspri, 2014).

Franz et al. (2007) relatam que além das aplicações tecnológicas, cepas de *Enterococcus* podem ser usadas para prolongar a vida útil e melhorar a segurança dos alimentos, porque produzem substâncias como ácido lático e peróxido de hidrogênio, que podem apresentar alguns efeitos antimicrobianos, e determinadas bacteriocinas.

De acordo com Aspri et al. (2017) as bacteriocinas dos *Enterococcus*, denominadas enterocinas, são sintetizadas principalmente por *E. faecium* e *E. faecalis* e apresentam grande interesse devido à sua atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp., *S. aureus* e *Bacillus* spp.

#### 4. Conclusão

A partir dos nossos resultados podemos sugerir que a cepa *E. faecium* KT990027 pode ser usada como cultura iniciadora, pois apresentou características tecnológicas gerais aplicáveis a este tipo de cultura, entretanto, seu comportamento na produção em grande escala deve ser avaliado.

Este estudo confirma que produtos artesanais, produzidos com leite cru, como o queijo de Coalho do Sertão da Paraíba é uma boa fonte para a bioprospecção de novas cepas de BAL com diferentes propriedades fermentativas, que podem ser úteis no desenvolvimento de novos produtos lácteos fermentados com propriedades sensoriais distintas e também para aumentar a quantidade de microrganismos para serem utilizados em indústrias.

#### Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro, processo IBPG-1268-2.12/18, ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) e o Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) pertencentes a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela assistência infraestrutura.

#### Referências

Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-year review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, (100), 9987–10013.

Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, (73), 81-90. Doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.022.

Aspri, M., O'Connor, P. M., Field, D., Cotter, P. D., Ross, P. R., Hill, C., & Papademas, P. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, (73), 1-9. Doi: 10.1016/j.idairyj.2017.04.008.



Banwo, K., A. Sanni, A., & Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (1), 229-241.

Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Canamero, M. M., Gálvez, A., & Manai, M. (2009). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21 (4), 462-470. Doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.007.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy*, (11), 259-274.

Cabral, M. L. B., Lima, M. S. F., Araújo, G. A., Costa, E. F., Porto, A. L. F., & Cavalcanti, M.T. H. (2016). Queijos artesanais fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. *Journal of bioenergy and food Science*, 3(4), 207-215. doi:10.18067/jbfs. v3i4.111.

Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., & Fernandes, I. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, (64), 409-421.

Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(2), 451– 460.

Dias, G. M. P., Silva, A. B., Granja, N. M. C., Silva, T. N., Lima, G.V. M., Cavalcanti M. T. H., & Porto, A. L. F. (2019). Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? *Scientia Plena*, 15 (2), 1-9. Doi: 10.14808/sci.plena.2019.021501.

Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, (63), 178-190. Doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014.

Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Franco, B. D. G. M., & Todorov, S. D. (2013). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*, (38), 228-239. Doi: 10.1016/j.fm.2013.09.008.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & Mcsweeney, P. L. H. (2000). Fundamentals of cheese science. *Gaithersburg: Aspen Publishers*, (1), 1-588.

Franz, C., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., & Galvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, (31), 293–310.

Furtado, M. M. (1990). *Leite de búfala: Características e Fabricação de Queijos*. EPAMIG 125 (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Institute de Laticínios. Minas Gerais.

Galia, W., Perrin, C., Genay, M., & Dary, A. (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *Int. Dairy J.*, 19(2), 89–95.

GDP, Global Dairy Platform. (2020). Recuperto de <https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol*, (88), 215–222.

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P.F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci. Tech.* (45), 167-178.

Guedes Neto, L. G., Souza, M. R., Nunes, A. C., Nicoli, J. R. & Santos, W. L. M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e

industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Supl.*, (2)245-250.

Han, X., Zhang, L., Yu, P., Yi, H., & Zhang, Y. (2013). Potential of LAB starter culture isolated from Chinese traditional fermented foods for yoghurt production. *International Dairy Journal*, 34 (2), 247-251. Doi: 10.1016/j.idairyj.2013.09.007.

Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*. (3a ed.), San Diego: Academic Press.

Husain, Q. (2010). Beta galactosidases and their potential applications: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* (30), 41–62. <https://doi.org/10.3109/07388550903330497>.

İspirli, H., Demirbaş, F., & Dertli, E. (2016). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT - Food Science and Technology*, (75), 358-365. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.010>.

Jaouani, I., Abbassi, M. S., Ribeiro, S. C., Khemiri, M., Mansouri, R., Messadi, L., & Silva, C. C. G. (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (4), 1189-1100. Doi: 10.1111/jam.12916.

Kihal, M., Prevost, H., Lhotte, M. E., Huang, D. Q., & Diviès, C. (1996). Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*. *J. Appl. Microbiol.*, (22), 219–223.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2017). Recuperado de [file:///C:/Users/leand/Downloads/projecoes\\_agronegocio\\_2017\\_2\\_web%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/leand/Downloads/projecoes_agronegocio_2017_2_web%20(4).pdf).

McMahon, D. J., & Oberg, C. J. (2017). Pasta-Filata Cheeses, in: *Cheese*. Elsevier, 1041–1068.

Medeiros, R. S., Araújo, L. M., Queiroga Neto, V., Andrade, P. P., Melo, M. A., & Gonçalves M. M. B. P. (2016). Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. *CyTA - Journal of Food*, 14 (4), 613-620.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, (106),1-24.

Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., & Biró, S. (2001).  $\beta$ -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif*, 21(1), 24-29. Doi: 10.1006 / prep.2000.1344.

Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K., & Fung, D. Y. C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Applied Microbiology*, (33)45–49.

Papademas, P., & Aspri, M. (2014). Dairy pathogens: Characteristics and impact. In P. Papademas (Ed.), *Dairy microbiology: A practical approach* (pp. 69-113). New York, NY, USA: CRC Press.

Ribeiro, S. C., Costa, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (3), 573-585.

Scholz-Ahrens, K. E., Ahrens, F., & Barth, C. A. (2020). Atributos nutricionais e de saúde do leite e imitações do leite. *Eur J Nutr* (59), 19–34. Doi: 10.1007/s00394-019-01936-3.

Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, (27), 691-697.

Silva, F. T. (2005). *Queijo Mussarela*. Brasília: Embrapa.

Silvério, S. C., Macedo, E. A., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2018). New  $\beta$ -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresour. Technol.* (250), 131-139. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.045.

Thirabunyanon, M., & Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. *Research in Veterinary Science*. (93), 74-81.

Vaillancourt, K., Bedard, N., Bart, C., Tessier, M., Robitaille, G., Turgeon, N., Frenette, M., Moineau, S., & Vadeboncoeur, C. (2008). Role of galK and galM in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* (74), 1264–1267. Doi: 10.1128/AEM.01585-07.

Van den berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pHdependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, (107) 159-170.

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., & Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2(1):1-12. Doi 10.1186/2191-0855-2-48.

Zárate, G., & Chaia, A.P. (2012). Influence of lactose and lactate on growth and  $\beta$ -galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionici*. *Anaerobe*, (18), 25-30.

#### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Leandro Paes de Brito – 45%

Elaine Cristina da Silva – 5%

Priscilla Régia de Andrade Calaça – 5%

Rosália Severo de Medeiros – 5%

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – 20%

Ana Lúcia Figueiredo Porto – 20%