

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS**

Danilo de Oliveira Luercio

**Bioprospecção de *Lactobacillus* spp. em Queijos Minas Artesanais: um estudo
de diversidade genética e propriedades tecnológicas**

Juiz de Fora

2021

Danilo de Oliveira Luercio

Bioprospecção de *Lactobacillus* spp. em Queijos Minas Artesanais: um estudo de diversidade genética e propriedades tecnológicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Luercio, Danilo de Oliveira Luercio.

Bioprospecção de *Lactobacillus* spp. em Queijos Minas Artesanais : um estudo de diversidade genética e propriedades tecnológicas / Danilo de Oliveira Luercio Luercio. -- 2021.

37 f. : il.

Orientador: João Batista Ribeiro

Coorientador: Humberto Moreira Húngaro

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2021.

1. bactérias lácticas. 2. bioprospecção. 3. queijos artesanais. 4. culturas adjuntas. I. Ribeiro, João Batista, orient. II. Húngaro, Humberto Moreira, coorient. III. Título.

Daniilo de Oliveira Luércio

**Bioprospecção de *Lactobacillus* spp.
em Queijos Minas Artesanais: um estudo de diversidade genética e propriedades tecnológicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 11 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Ribeiro - Orientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Júnio César Jacinto de Paula
EPAMIG/ILCT

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba

Juiz de Fora, 04/11/2021.



Documento assinado eletronicamente por **CELSO JOSÉ BRUNO DE OLIVEIRA**, Usuário Externo, em 12/11/2021, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Ribeiro**, Usuário Externo, em 12/11/2021, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Junio Cesar J. de Paula**, Usuário Externo, em 12/11/2021, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro**, Professor(a), em 16/11/2021, às 07:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0562030** e o código CRC **618AF1EA**.

Dedico esse trabalho a meus filhos que são a razão para que eu siga lutando, dia após dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita misericórdia e amor demonstrados ao me dar a saúde e resiliência para seguir trabalhando e estudando mesmo diante de tantas dificuldades. Obrigado, Senhor, pela sabedoria e paciência que me deu para me calar em tantas situações e perdão pelos vários momentos em que não consegui.

Agradeço à minha esposa Priscila e a meus filhos amados Daniel, Isabel e Lia, pela paciência e amor que tiveram comigo tantas vezes nesse tempo. Por vocês tenho tentado evoluir, me tornar alguém melhor e abrir o maior número de novas oportunidades que eu conseguir.

Ao meu orientador, Dr. João Batista Ribeiro, agradeço pelo tempo e conhecimento compartilhados e, especialmente, por me receber e lutar por mim e comigo em duros momentos até o ingresso no Programa de Pós-graduação, emprestando sua credibilidade e seu nome a alguém até então desconhecido.

Ao meu coorientador, professor Humberto Moreira Húngaro, que sempre esteve pronto para me atender, ajudar e trabalhar junto, dedicando seu tempo, conhecimento e até recursos para que eu pudesse seguir adiante. Pela paciência de ouvir muitas vezes a resposta ou o questionamento que não esperava ou que não merecia, sempre me tratando como um igual, apesar da clara e justa diferença de experiência e conhecimento que nos separa.

Agradeço demais a meus colegas de trabalho e aos superiores imediatos que nunca colocaram qualquer obstáculo para que eu pudesse realizar as inúmeras tarefas inerentes a esse mestrado, me apoiando sempre. À Juliana, sempre pronta a ouvir e resolver todas minhas necessidades na secretaria do Programa. Aos colaboradores e estagiárias dos laboratórios por onde passei, na Embrapa e UFJF, que muito me auxiliaram em diversas atividades. À Carol Schettino vai meu agradecimento especial por me salvar na reta final desse trabalho.

Muito obrigado aos professores Marcelo Otênio, Marco Antônio e Virgílio que, mesmo sem saber, me deram gana e determinação de ingressar e concluir esse mestrado com o melhor resultado que pude obter.

Aos Doutores Júnio César Jacinto de Paula e Celso José Bruno de Oliveira pela participação na banca examinadora e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e enriquecimento desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Bactérias lácticas são as principais responsáveis pela formação de diversos aspectos sensoriais dos queijos artesanais, atuando também como bioprotetoras ao inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. A bioprospecção dessas bactérias possibilita encontrar novas linhagens distintas das comerciais e adaptadas às características específicas de produção de cada local. No presente estudo, foram isoladas bactérias lácticas autóctones de Queijos Minas Artesanais (QMA), formando um banco de recursos genéticos para usos tecnológicos futuros. Pela primeira vez foram analisadas amostras de QMA de todas as regiões produtoras, incluindo de maneira inédita a região das Serras de Ibitipoca. A partir de cinco amostras de queijos de cada região foram isoladas 191 bactérias lácticas. Desse total, foram identificados 83 *Lactobacillus* spp., sendo encontrados 64 perfis moleculares distintos através da técnica de Rep-PCR. Análises de agrupamento mostraram grande diversidade genética na população de *Lactobacillus* spp. e a existência de uma microbiota específica para cada região produtora, atestando o poder discriminatório da técnica de Rep-PCR para a separação de linhagens genotipicamente distintas. A utilização dos meios MRS e M17 para o isolamento do maior número possível de bactérias lácticas mostrou-se eficiente. Seis linhagens foram isoladas nos dois meios de cultura, mas dez *Lactobacillus* spp. genotipicamente distintos foram isolados exclusivamente no meio M17. Foram encontradas 5 linhagens de *Lactobacillus* com potencial para utilização como culturas adjuntas (CAN687, SER797, SAL815, CER844 e SAL933), que foram testadas para algumas propriedades tecnológicas. Todos cinco isolados foram capazes de produzir exopolissacarídeos, com destaque para o isolado SAL933 com a maior produção a partir de lactose. Apenas três isolados apresentaram capacidade proteolítica e nenhum foi capaz de realizar lipólise. Todos isolados testados antagonizaram *Listeria monocytogenes* ATCC7644, mas apenas o isolado SER797 apresentou produção de substância antimicrobiana de natureza proteica. Diversas são as possibilidades de utilização dessas bactérias na indústria de alimentos e biopolímeros, porém mais estudos são necessários para caracterizar esses microrganismos, suas potenciais aplicações e segurança.

Palavras chave: Bactérias lácticas, bioprospecção, queijos artesanais, culturas adjuntas, Rep-PCR.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are mainly responsible for the formation of various sensory aspects of artisanal cheeses, also acting as bioprotectors by inhibiting the growth of unwanted microorganisms. The bioprospection of these bacteria makes it possible to find new strains that are different from the existing commercial ones and adapted to the environmental conditions and specific production characteristics of each location. In this study, autochthonous lactic acid bacteria were isolated from Artisanal Minas Cheeses, forming a genetic resource bank for future technological uses. For the first time, cheese samples from all producing regions were analyzed, including, in an unprecedented way, those from Serras de Ibitipoca region. From five cheese samples from each region, 191 lactic acid bacteria were isolated using MRS and M17 culture media. Of this total, 83 *Lactobacillus* spp. were identified, and 64 distinct fingerprints were found using the Rep-PCR method. Cluster analysis showed a great genetic diversity in this population of *Lactobacillus* spp. and the existence of a specific microbiota for each producing region, reinforcing the high discriminatory power of the Rep-PCR technique for the identification of genetically unrelated strains, including those from different samples. The use of both MRS and M17 media improved the identification of genetically unrelated strains. Six strains could be cultured in both media, but ten genetically distinct *Lactobacillus* spp. were isolated exclusively from M17. Five *Lactobacillus* strains can potentially be used as adjunct cultures (CAN687, SER797, SAL815, CER844 and SAL933), according to some technological properties. All five isolates were able to produce EPS, highlighting the isolate SAL933 with highest EPS production from lactose. Only three isolates showed proteolytic capacity and none were able to perform lipolysis. All tested isolates antagonized *Listeria monocytogenes* ATCC7644, but only isolate SER797 showed the production of a protein-based antimicrobial compound. There are several possibilities for using these bacteria in the food and biopolymer industry, but further studies are necessary to characterize these microorganisms, and properly assess their safety and potential applications.

Keywords: Lactic acid bacteria, bioprospection, artisanal cheese, adjunct culture, Rep-PCR.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Autorização para o acesso ao patrimônio genético	13
2.2 Amostragem, isolamento e identificação presuntiva de BAL	13
2.3 Identificação e obtenção do perfil molecular de <i>Lactobacillus spp.</i>	14
2.4 Triagem de <i>Lactobacillus sp.</i> com potencial para utilização como CAS	15
2.5 Caracterização das propriedades tecnológicas e antimicrobianas	16
3. RESULTADOS	17
3.1 Isolamento e identificação presuntiva de BAL	17
3.2 Identificação e obtenção dos perfis moleculares de <i>Lactobacillus spp.</i>	17
3.3 Capacidade de acidificação	21
3.4 Propriedades tecnológicas e antimicrobianas	21
4. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

Os Queijos Minas Artesanais (QMA) são elaborados a partir de leite integral de vaca fresco e cru, conforme tradição histórica e cultural do local onde foram produzidos, isentos de quaisquer aditivos e coadjuvantes de tecnologia. Dessa forma, recebem certificação diferenciada e possuem identidade geográfica protegida por leis específicas. Oito regiões são reconhecidas como produtoras de QMA: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro e a mais recente denominada Serras de Ibitipoca. (MINAS GERAIS, 2011, 2020; MONTEIRO; DA MATTA, 2018). Cada região possui seu QMA com características sensoriais únicas, que são conferidas pela presença de uma microbiota autóctone, especialmente bactérias do ácido láctico (BAL), com diversas linhagens específicas para cada local. BAL são as principais responsáveis pelos processos de acidificação e fermentação do leite, além de contribuírem para a formação de aromas, sabores e textura característicos desses alimentos durante o processo de maturação (MENESES, 2006; MOTTA; GOMES, 2015).

O principal grupo de BAL responsável pelos aromas e sabores característicos dos queijos artesanais é denominado NSLAB (*nonstarter lactic acid bacteria*). As NSLAB são bactérias presentes no ambiente, instalações e utensílios de produção, que contaminam o leite e os queijos durante o processo de fabricação. Essas bactérias têm contagens populacionais baixas no momento da fabricação, crescendo após a fermentação e podendo se tornar dominantes com poucas semanas de maturação dos queijos. Por essas características, as NSLAB são encontradas em maior quantidade nos queijos artesanais maturados ou em processo de maturação (BANCALARI *et al.*, 2020). Os principais representantes das NSLAB são *Lactobacillus* mesófilos e heterofermentativos facultativos ou obrigatórios. Essas bactérias normalmente têm baixa ou regular capacidade acidificante e contribuem com os aromas e sabores dos alimentos fermentados através da liberação de subprodutos da fermentação e da ação de enzimas durante o seu metabolismo, especialmente as proteolíticas e lipolíticas (GARCIA-CANO *et al.*, 2019; MOTTA; GOMES, 2015). Além disso, *Lactobacillus* contribuem significativamente com a textura, consistência e outros aspectos reológicos dos queijos através da produção de exopolissacarídeos (EPS) (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002; WELMAN; MADDOX, 2003).

Essa diversidade metabólica faz com que as NSLAB possuam importância destacada para a indústria de alimentos lácteos. Outra característica interessante das BAL para a indústria de alimentos é a capacidade de agirem como inibidoras de microrganismos patogênicos ou deteriorantes através produção de bacteriocinas e da ação de diversos subprodutos do seu metabolismo (MOKOENA, 2017). As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos que possuem efeitos bactericidas ou bacteriostáticos, com grande espectro de ação. Diversos estudos têm demonstrado que a utilização de BAL, incluindo *Lactobacillus*, ou das bacteriocinas por elas produzidas na fabricação de alimentos fermentados se apresenta como alternativa promissora ao uso de conservantes artificiais se associadas a outras ferramentas de proteção, além de aumentar a segurança dos alimentos (PEREIRA *et al.*, 2020; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018; SKARIYACHAN; GOVINDARAJAN, 2019; VENEGAS-ORTEGA, 2019). Perales-Adán *et al.* (2018) demonstraram a atividade antimicrobiana da bacteriocina AS48 em conjunto com a nisina frente a *Staphylococcus aureus* e outras espécies do mesmo gênero, resistentes a diversos antimicrobianos. Em estudo realizado por Campagnolo *et al.* (2018), a adição de BAL, algumas reconhecidamente produtoras de bacteriocinas, na produção de queijos produziu efeitos de inibição e inativação de *Listeria monocytogenes* em queijos macios e semi-duros, respectivamente. A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode causar uma importante doença chamada listeriose. Essa doença pode se apresentar de maneira severa e com alta taxa de mortalidade, dependendo da imunidade do indivíduo infectado (BORGES *et al.*, 2009). Devido aos riscos à saúde causados pela presença dessa bactéria patogênica nos alimentos, a legislação brasileira estabelece a obrigatoriedade de ausência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos (BRASIL, 2019), o que torna o controle desse patógeno um importante desafio para a indústria de alimentos.

Todas as propriedades tecnológicas e de biocontrole descritas indicam que as NSLAB do gênero *Lactobacillus* apresentam potencial para serem usadas pela indústria de alimentos como culturas adjuntas secundárias (CAS) na fabricação de alimentos (BANCALARI *et al.*, 2020; BERESFORD *et al.*, 2001; BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018; GOBBETTI *et al.*, 2015). Na produção industrial de diversos queijos, culturas iniciadoras da fermentação (*starters*) e CAS comerciais são adicionadas com objetivo de promover rápida fermentação e contribuir com aspectos sensoriais dos produtos. Porém, o uso dessas culturas comerciais de forma

indiscriminada pode acabar causando uma padronização dos alimentos e redução das sutis diferenças de sabor e aroma entre os queijos produzidos em locais diferentes (SETTANNI; MOSCHETTI, 2014). A prospecção de linhagens autóctones de BAL, adaptadas às condições ambientais, à matéria prima local e às condições tradicionais de produção, além de ser eficaz, garante a fabricação de queijos com características típicas que não poderão ser reproduzidas em outro local e pode contribuir para a preservação da originalidade dos queijos com denominações de origem controlada. Além disso, a busca por novas linhagens autóctones pode beneficiar a fabricação de queijos industriais pela possibilidade de obtenção de linhagens mais adaptadas e eficientes que as comerciais existentes (ALEGRIA *et al.*, 2016; BASSI; PUGLISI; COCCONCELLI, 2015; PEREIRA *et al.*, 2020). Os critérios para seleção de CAS devem ser cuidadosamente escolhidos e avaliados. É fundamental que as linhagens de *Lactobacillus* prospectadas não causem defeitos no produto final, sejam capazes de crescer e manter-se viáveis durante o tempo de maturação dos queijos e impactem positivamente na sua qualidade sensorial e segurança. (BANCALARI *et al.*, 2020; BRUNO *et al.*, 2017). É desejável que as CAS não possuam capacidade de acidificação eficiente para que os níveis de acidez dos queijos não aumentem de maneira significativa durante a maturação. A presença de atividades proteolíticas e lipolíticas também são características tecnológicas interessantes que devem ser levadas em conta na seleção de *Lactobacillus* como culturas adjuntas (NIETO-ARRIBAS *et al.*, 2009). Diversos estudos têm comprovado os efeitos positivos da utilização de NSLAB como CAS. Foi demonstrada que a utilização de linhagens autóctones de *Lactobacillus* como culturas adjuntas na fabricação de queijos contribuiu para melhorar a textura e o sabor dos queijos industriais, intensificando sabores e aromas, reduzindo o aparecimento de defeitos de sabor e inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes (BANCALARI *et al.*, 2020; LYNCH *et al.*, 2014; NIETO-ARRIBAS *et al.*, 2009; PERALTA *et al.*, 2020). A adaptação das NSLAB presentes nos QMA às condições de produção e maturação dos queijos e a variabilidade genética encontrada nas diversas regiões produtoras reforça a importância dos QMA como fontes promissoras para a prospecção dessas NSLAB com alto potencial funcional e biotecnológico (MARGALHO, 2020). Até o presente momento não houve um estudo que tenha prospectado BAL em todas as regiões produtoras de QMA ao mesmo tempo, sendo o presente trabalho o primeiro também em que foi realizado isolamento de BAL em amostras de queijo da região das Serras

de Ibitipoca. A avaliação comparativa da diversidade genética existente na microbiota láctica de todas as regiões produtoras também foi realizada de maneira inédita.

A variabilidade genética da microbiota dos queijos artesanais pode ser influenciada por condições específicas da produção de cada produtor. Já foi demonstrada a existência de genótipos diversos de uma mesma espécie de BAL em QMA de regiões diferentes, dentro de uma mesma região ou mesmo em amostras de queijo de um mesmo produtor. Segundo Perin *et al.* (2017), a combinação de métodos dependentes de cultivo e independentes de cultivo é fundamental para a correta caracterização e identificação dos gêneros, espécies e linhagens intraespecíficas e permitirá a prospecção de linhagens específicas para cada região ou produtor. Nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares é fundamental para a realização de um estudo confiável e preciso sobre a diversidade genética da microbiota dos produtos fermentados. A técnica de Rep-PCR tem se mostrado confiável, simples de realizar, e com alto poder discriminatório, tornando-se importante ferramenta de análise de similaridade genética (KAUR *et al.*, 2017; VASIEE *et al.*, 2018).

Assim, esse trabalho teve como objetivo isolar e identificar BAL autóctones de todas as regiões reconhecidas como produtoras de QMA, formando um banco de recursos genéticos para futuras utilizações tecnológicas. A partir desse banco genético, buscou-se identificar *Lactobacillus* spp. autóctones, avaliar sua similaridade genética e identificar linhagens com potencial tecnológico e de biocontrole para serem utilizadas como CAS na indústria de alimentos fermentados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Autorização para o acesso ao patrimônio genético

Foi realizado um cadastro (número AB78D00) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) em conformidade com a Lei 13.123/2015 para autorização ao acesso ao patrimônio genético para fins de pesquisa científica.

2.2 Amostragem, isolamento e identificação presuntiva de BAL

Quarenta amostras de QMA adquiridas diretamente dos produtores ou no comércio foram analisadas nesse estudo. Todas amostras foram provenientes de produtores diferentes, abrangendo 24 municípios pertencentes a todas regiões reconhecidas por lei como produtoras de QMA. Uma porção representativa de cada amostra foi utilizada para produzir uma primeira diluição decimal em solução de citrato de sódio a 2% (Synth, Brasil). As demais diluições foram preparadas em solução tampão fosfato (Merck, Alemanha), semeadas em placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS (BD Difco, EUA) e ágar M17 (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas em aerobiose a 35 °C por 24 a 48 h, até que se pôde observar crescimento evidente de colônias. Em seguida, todas as placas foram inspecionadas visualmente com o auxílio de lupa. Colônias bacterianas consideradas fenotipicamente distintas em cada amostra foram inoculadas por meio de estrias compostas em placas de Petri contendo MRS ou M17 conforme cultivo inicial e incubadas novamente a 35 °C por 24 horas. Após esse tempo, os isolados foram testados qualitativamente para a produção de catalase, submetidos à coloração de Gram e observados em microscópio ótico. Todas bactérias Gram positivas em forma de cocos ou bacilos e com resultados negativos no teste da catalase foram consideradas BAL. As BAL foram estriadas novamente em placas de Petri contendo ágar MRS para a obtenção de colônias isoladas e garantia de pureza. Após o crescimento, esses isolados foram transferidos, em duplicata, para microtubos contendo *Litmus Milk* (Sigma-Aldrich, EUA) que foram estocados a -20 °C e -80 °C para análises futuras.

2.3 Identificação e obtenção do perfil molecular de *Lactobacillus spp.*

Com o objetivo de identificar os *Lactobacillus*, todos os bacilos isolados previamente foram submetidos a uma PCR *monoplex* gênero-específica de acordo com a metodologia descrita por Dubernet, Desmasures e Guéguen (2002) e Senan, Grover e Batish (2008) com algumas modificações. *Lactobacillus casei* foi usado como controle positivo. Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) de colônias isoladas com utilização do kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA). Cada reação continha tampão 1X, MgCl₂ (2,25 mM), DNTPs (0,4 mM cada), *primers* LbLMA1 e R16-1 (80 nM cada), Taq DNA Polimerase (0,06 U/μl), uma colônia bacteriana e água deionizada em quantidade suficiente para um volume total de 15 μl. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) partindo de uma desnaturação inicial (95 °C, 5 min), seguida de 20 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (59 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s) e uma etapa final de extensão (72 °C, 7 min). Todas reações de PCR foram submetidas a eletroforeses horizontais em gel de agarose 0,9% (Ludwig Biotec, Brasil) com voltagem constante (80 V) por aproximadamente 2 h. Após as corridas, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 0,01% por 7 min e em seguida banhado em água destilada. A visualização e captura das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador LPIX-EX (Loccus Biotecnologia, Brasil) sob luz ultravioleta. A amplificação de um fragmento específico de DNA com 250 pb foi considerada evidência favorável à identificação do isolado como *Lactobacillus sp.*

Para cada isolado identificado como *Lactobacillus sp.* foi gerado um perfil molecular de DNA utilizando a técnica de Rep-PCR de acordo com a metodologia de Versalovic *et al.* (1994) com algumas modificações. Foram realizadas PCR de colônias isoladas com utilização do kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, EUA). Cada reação continha tampão 1X, MgCl₂ (1,5 mM), DNTPs (0,2 mM cada), *primer* **GTG₅** (2 μM), Taq DNA Polimerase (0,06 U/μl), uma colônia bacteriana e água deionizada em quantidade suficiente para um volume total de 25 μl. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems, EUA) partindo de uma desnaturação inicial (95 °C, 15 min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (40 °C, 1 min) e extensão (65 °C, 8 min) e uma etapa final de extensão (65 °C, 10 min). Após a amplificação, as PCR

foram imediatamente congeladas a -20 °C, para posterior análise. Todas os amplificadores foram submetidos a eletroforeses de acordo com a metodologia descrita acima, nessa subseção. Os perfis eletroforéticos foram comparados utilizando o software Bionumerics® v.6.6.11 (Applied Maths, Bélgica). A similaridade entre os perfis de cada linhagem foi calculada usando as distâncias de Jaccard com tolerância de 2% para a igualdade entre as bandas. A relação entre as populações microbianas foi avaliada através da construção de dendrogramas por análise de agrupamentos utilizando o algoritmo *unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA) (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

2.4 Triagem de *Lactobacillus* sp. com potencial para utilização como CAS

Cada isolado identificado como *Lactobacillus* sp. foi avaliado quanto à sua capacidade acidificante de acordo com a metodologia de Durlu-Ozcaya *et al.* (2001) com algumas modificações. Os isolados foram retirados do estoque, estriados em ágar MRS e incubados em aerobiose a 35 °C por 24 a 48 horas. Após esse tempo, uma colônia isolada de cada BAL foi transferida para tubos contendo 5 ml de caldo MRS (BD Difco, EUA) e incubada por 14 a 18 horas a 35 °C. Tubos contendo 20 ml de leite desnatado reconstituído (BD Difco, EUA) foram inoculados com 1% (v/v) da cultura de BAL ativada anteriormente e incubados a 30 °C. O pH do leite desnatado reconstituído foi medido imediatamente após a inoculação e após 6h e 48 h de incubação usando um pHmetro (PG2000, Gehaka, Brasil). Linhagens capazes de reduzir o pH a 5,3 após 6h foram consideradas rápidas produtoras de ácido e com potencial para serem usadas como iniciadoras (BERESFORD *et al.*, 2001). As linhagens que não foram capazes de acidificar o leite desnatado reconstituído a valores de pH abaixo de 5,3 após 48 h de incubação foram consideradas com capacidade limitada de acidificação e com potencial para serem utilizadas como CAS (FRANCIOSI *et al.*, 2008). Essas BAL foram selecionadas e caracterizadas para produção de EPS, atividades proteolítica e lipolítica e capacidade antagonista contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 com a verificação da natureza proteica das substâncias antagonistas. As demais BAL foram consideradas com capacidade de acidificação regular e permaneceram em estoque para estudos futuros.

2.5 Caracterização das propriedades tecnológicas e antimicrobianas

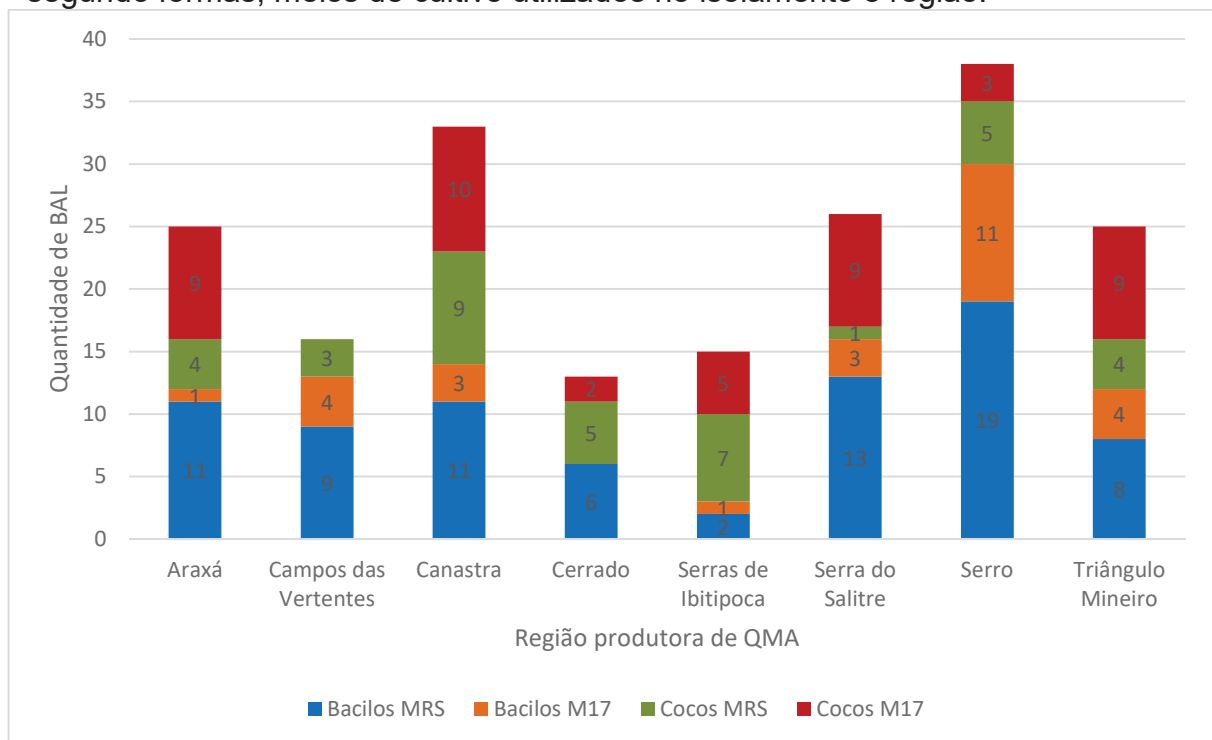
Para avaliar a capacidade de produção de EPS, *Lactobacillus* sp. selecionados foram semeados na superfície de placas de Petri contendo ágar MRS modificado com adição de lactose, frutose e maltose, separadamente (5% p/v), e incubadas a 30 °C por 72 h. Os isolados foram considerados positivos para EPS quando produziram colônias viscosas e pegajosas. A produção de EPS foi classificada como alta (+++), regular (++) e baixa (+) (JAOUANI *et al.*, 2015; MARGALHO *et al.*, 2020). A capacidade proteolítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Jaouani *et al.* (2015) e a capacidade lipolítica foi avaliada de acordo com Sahraoui *et al.* (2015) sem o uso do corante vermelho fenol. As atividades proteolíticas e lipolíticas foram confirmadas qualitativamente pela formação de zonas claras ao redor das colônias de BAL. A capacidade antagonista de BAL contra *Listeria monocytogenes* ATCC7644 foi avaliada por meio de dois ensaios. O primeiro seguiu a metodologia descrita por Campagnollo *et al.* (2018). Os testes foram realizados em duas repetições e os halos de inibição foram medidos em milímetros com o auxílio de paquímetro e calculada a média entre as medições. Concomitantemente, foi realizado um segundo ensaio de acordo com as metodologias de Lewus, Kaiser e Montville (1991) e Lewus e Montville (1991). Esse segundo ensaio teve como objetivo avaliar a capacidade antagonista das BAL sem a possível influência da produção de ácidos e também avaliar a sensibilidade das substâncias antimicrobianas à pepsina e proteinase K. Halos de inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em torno das colônias de BAL foram avaliadas qualitativamente, pela presença ou ausência. O aparecimento de uma retração no halo de inibição na região onde as enzimas foram localizadas (halo em forma de “meia-lua”) indica que a substância antagonista é sensível àquela enzima proteolítica, sendo possivelmente de natureza proteica.

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento e identificação presuntiva de BAL

A partir de 5 amostras de QMA de cada uma das 8 regiões produtoras, foram isoladas 260 colônias bacterianas fenotipicamente diferentes. Desse total de isolados, 191 foram identificados presuntivamente como BAL (73,5%). Do total de BAL isoladas no presente estudo, 85 exemplares (44,5%) apresentaram forma de cocos e 106 (55,5%) a forma de bacilos. A maioria dos bacilos (74,5%) foi isolada no meio MRS, enquanto a maior parte dos cocos (55,3%) foi isolada no meio M17 (Figura 1).

Figura 1. Distribuição de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de amostras de QMA segundo formas, meios de cultivo utilizados no isolamento e região.

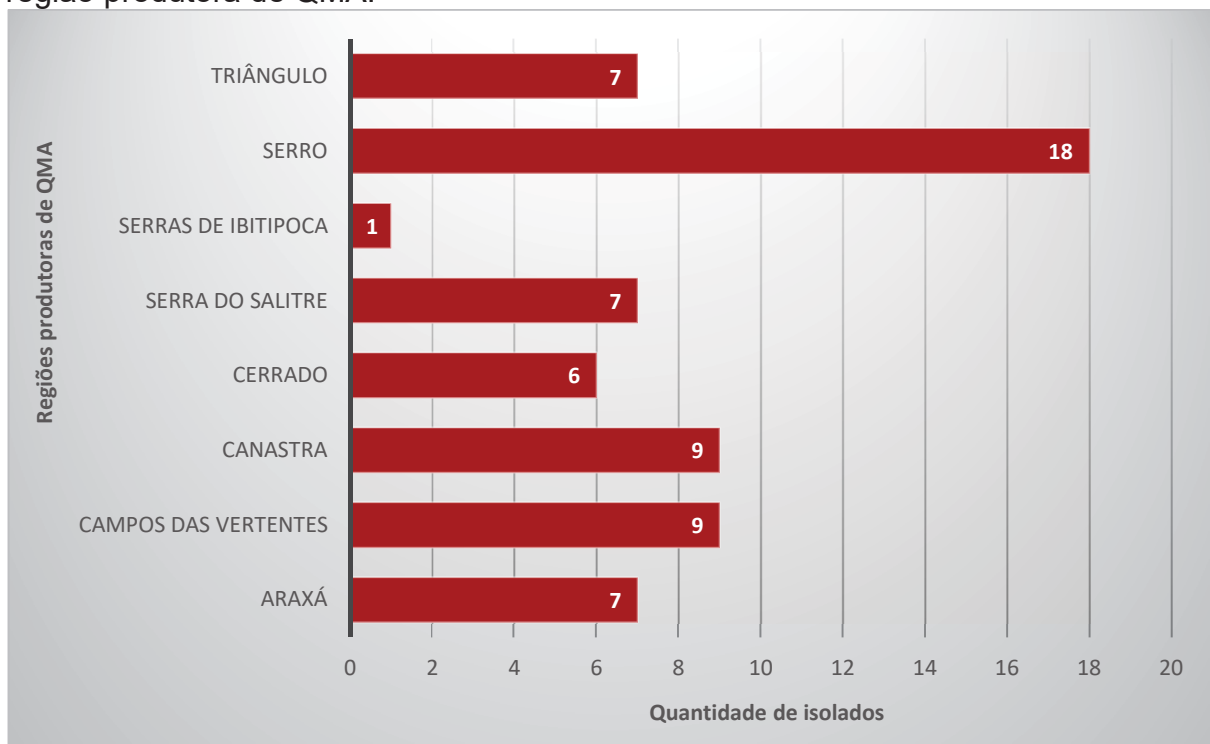


3.2 Identificação a nível de gênero e obtenção dos perfis moleculares de linhagens de *Lactobacillus* spp.

BAL em forma de bacilos (n=106) foram submetidas à PCR *monoplex* gênero-específica e 83 delas (78,3%) apresentaram uma única banda correspondente ao

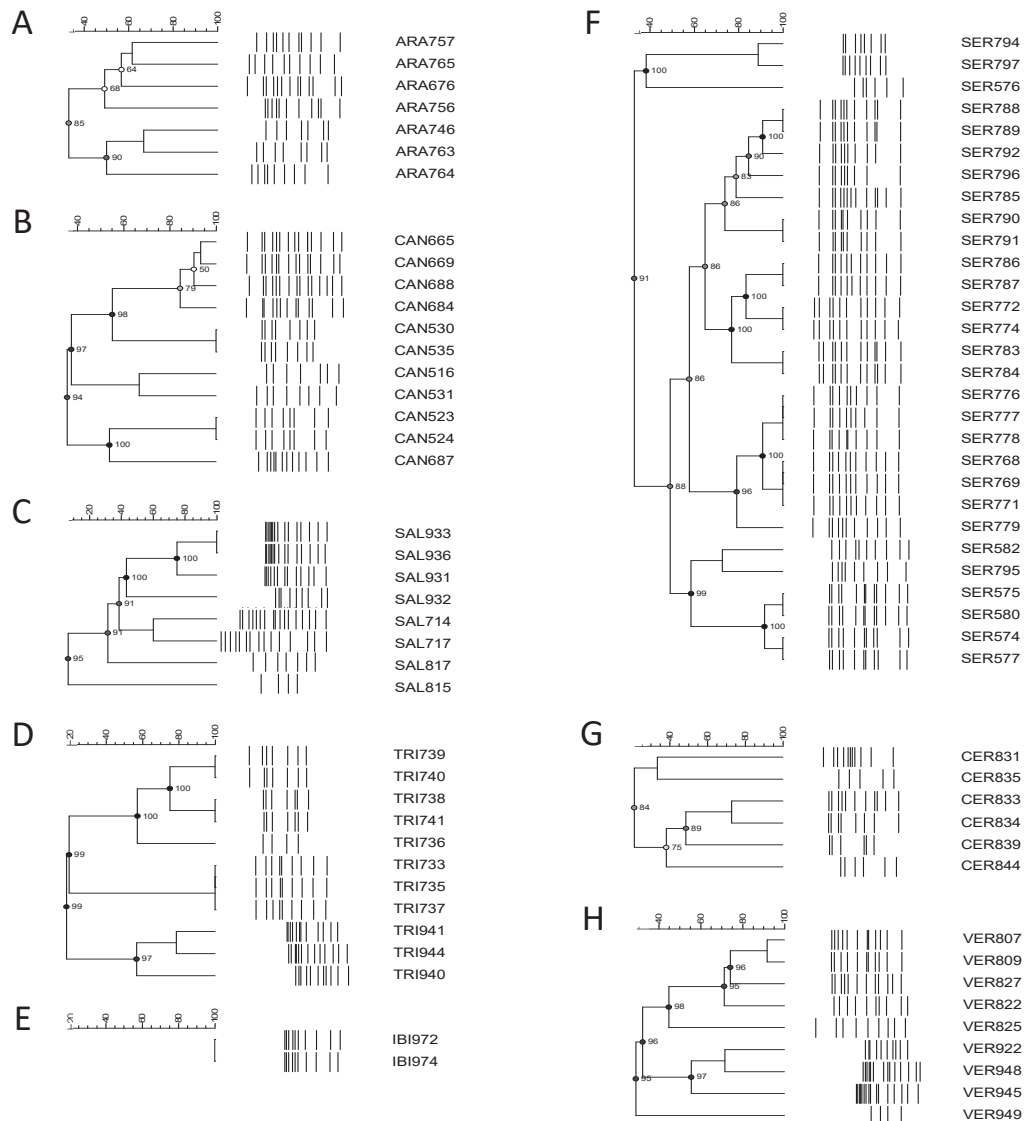
fragmento de 250 pb específico do gênero *Lactobacillus*. Todos isolados identificados como *Lactobacillus* spp. foram submetidos à técnica de Rep-PCR. Foram identificados 64 perfis moleculares diferentes (77,1%), sendo considerados linhagens geneticamente distintas. A região do Serro contribuiu com o maior número linhagens de *Lactobacillus* spp. enquanto a região das Serras de Ibitipoca foi onde menos *Lactobacillus* sp. genotipicamente distintos foram identificados (Figura 2).

Figura 2. Quantidades de *Lactobacillus* sp. geneticamente distintos isolados em cada região produtora de QMA.



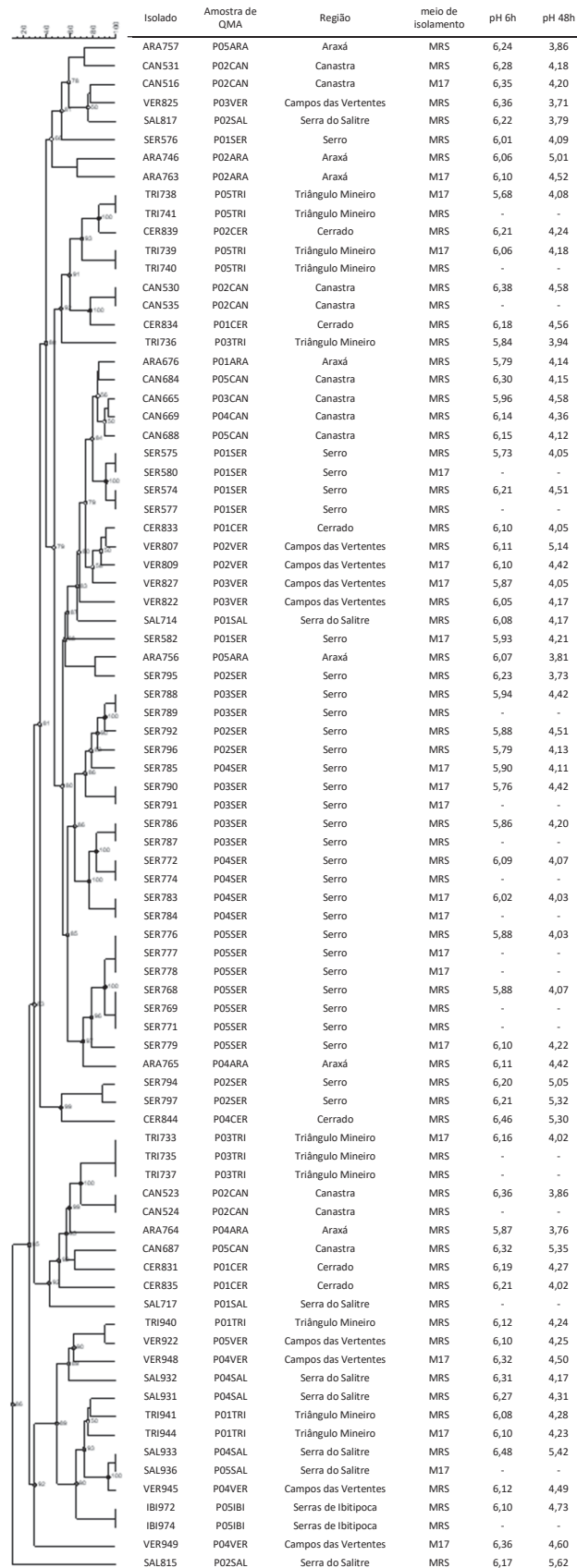
Análises de agrupamento dos perfis moleculares de *Lactobacillus* spp. realizadas separadamente para cada região produtora de QMA mostraram que os QMA da região da Serra do Salitre apresentaram maior diversidade genotípica, com 7 linhagens divididas em 5 agrupamentos, considerando uma taxa de similaridade arbitrária de 45%. A região das Serras de Ibitipoca foi a que apresentou a menor diversidade genotípica, com apenas uma linhagem de *Lactobacillus* genotipicamente indistinguível, seguida da região de Araxá, com 7 linhagens de *Lactobacillus* agrupadas em apenas 2 grupos. Pode ser destacada também a região do Serro que apresentou 18 linhagens geneticamente distintas agrupadas em 3 grupos, sendo que 83,3% delas (15 linhagens) estão localizadas em apenas um desses agrupamentos (Figura 3).

Figura 3. Análise de agrupamento dos perfis moleculares obtidos de 83 *Lactobacillus* isolados de QMA apresentados separadamente para cada região produtora (A – Araxá, B – Canastra, C – Serra do Salitre, D – Triângulo, E – Serras de Ibitipoca, F – Serro, G – Cerrado, H – Campos das Vertentes).



Ao analisar o agrupamento de todos *Lactobacillus* isolados de QMA conjuntamente, foi observado que todos os perfis moleculares indistinguíveis pertencem a isolados de uma mesma região, sendo que a maior parte foi isolada a partir da mesma amostra. Apenas os clones SAL933 e SAL 936, ambos da região da Serra do Salitre, foram isolados em amostras diferentes. Foram encontradas BAL genotipicamente indistinguíveis nos meios MRS e M17 concomitantemente, como os três clones TRI735 e TRI737 (meio MRS) e TRI733 (meio M17), mas 10 linhagens de *Lactobacillus* foram identificadas exclusivamente no meio M17 (Figura 4).

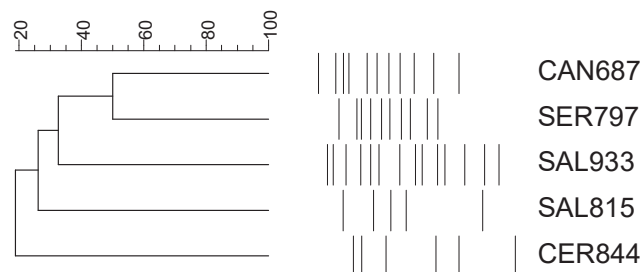
Figura 4. Análise de agrupamento dos perfis moleculares obtidos de 83 *Lactobacillus* isolados em QMA e valores de pH de leite desnatado reconstituído com 6h e 48h de incubação, para as linhagens não redundantes.



3.3 Capacidade de acidificação de isolados de *Lactobacillus* sp.

Nenhuma das 64 linhagens distintas de *Lactobacillus* sp. apresentou rápida produção de ácido. Assim, todas permaneceram incubadas até 48h, quando o pH foi medido novamente. A grande maioria (59 isolados) foi capaz de reduzir o pH abaixo de 5,3 após esse tempo de incubação, apresentando assim capacidade de acidificação regular. De acordo com o parâmetro adotado no presente trabalho, apenas 5 isolados de *Lactobacillus* (CAN687 da região da Canastra, SER797 da região do Serro, CER844 da região do Cerrado, SAL815 e SAL933 ambos da região da Serra do Salitre) apresentaram baixa capacidade de acidificação, sendo então selecionados para as análises subsequentes. A análise de agrupamento entre os cinco *Lactobacillus* selecionados demonstra que os isolados CAN687 e SER797 se agrupam com perfis moleculares 50% similares enquanto os outros isolados têm similaridade genética inferior a 35% em relação a esse grupo e entre si (Figura 5).

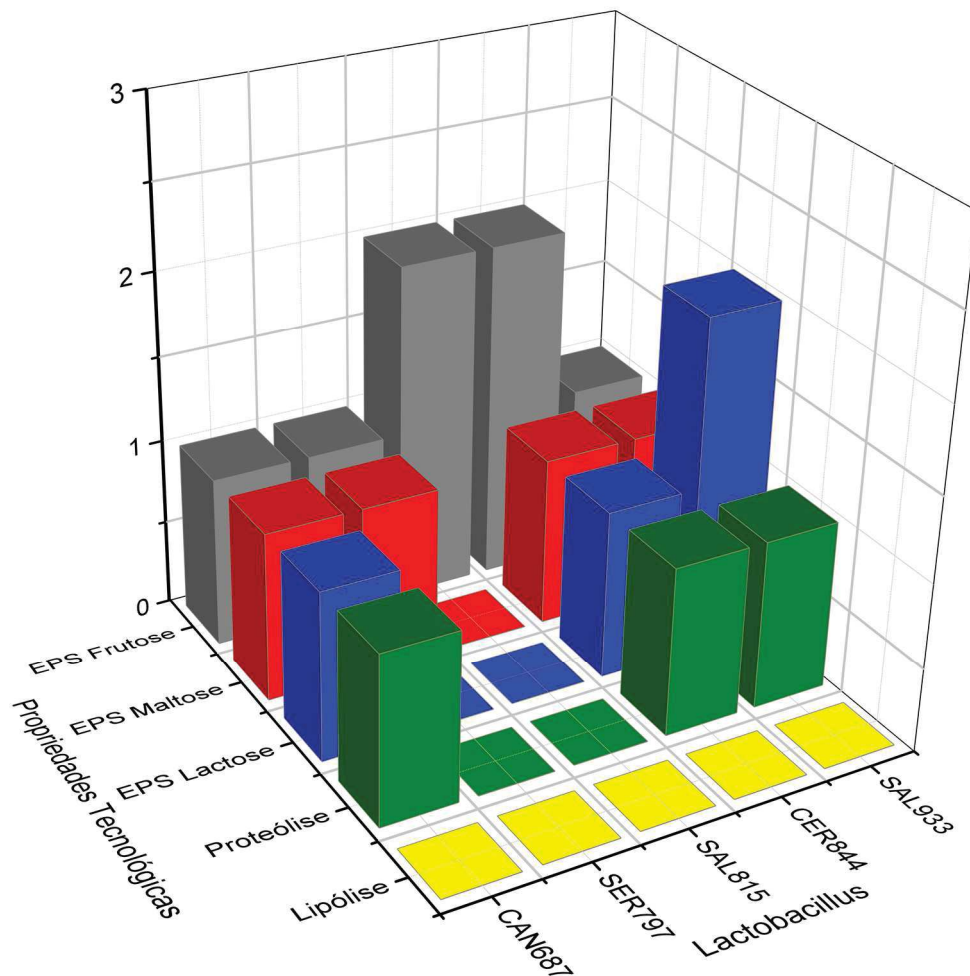
Figura 5. Análise de agrupamento dos perfis moleculares obtidos de cinco *Lactobacillus* encontrados com baixa capacidade de acidificação.



3.4 Propriedades tecnológicas e antimicrobianas

Todos os cinco *Lactobacillus* selecionados foram capazes de produzir EPS a partir de ao menos uma fonte de carboidrato. Os isolados CER844 e SAL933 foram capazes de produzir EPS em todos os tratamentos, inclusive esse último isolado com produção destacada em relação às demais linhagens, a partir de lactose. Três isolados apresentaram capacidade proteolítica (CAN687, CER844 e SAL933) mas nenhum foi capaz de realizar lipólise (Figura 6).

Figura 6. Propriedades tecnológicas de cinco *Lactobacillus* spp. encontrados com baixa capacidade de acidificação.



Proteólise e lipólise: ausência (0) e presença (1). Produção de EPS: ausente (0), baixa (1), regular (2) e alta (3).

Em relação à capacidade antimicrobiana, todos isolados testados foram capazes de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 no teste realizado em meio MRS, tendo se destacado o isolado SER797 que exibiu o maior halo de inibição em relação aos apresentados pelos demais. No teste realizado em meio TSAYE sem glicose, apenas os isolados SAL933 e SER797 apresentaram halos de inibição, sendo que apenas esse último apresentou retração no halo (forma de “meia-lua”) na região onde a enzima proteinase-K foi aplicada (Tabela 1).

Tabela 1. Capacidade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de cinco *Lactobacillus* spp. encontrados com baixa capacidade de acidificação.

BAL	MRS	TSAYE sem glicose		
	halo (mm)	controle	proteínase-K	Pepsina
CAN687	14,55	-	-	-
SER797	25,45	+	+	-
SAL815	11,95	-	-	-
CER844	15,55	-	-	-
SAL933	10,70	+	-	-

Controle: teste de difusão em ágar sem a presença de enzimas proteolíticas. Resultados: positivo (+) e negativo (-).

4. Discussão

No presente estudo foi estabelecida uma coleção de BAL autóctones isoladas a partir de QMA, que servirá como um banco de recursos genéticos para futuras utilizações tecnológicas. Foi avaliada a similaridade genética de *Lactobacillus* spp. autóctones e testados seu potencial tecnológico e de biocontrole para futura utilização como CAS na indústria de alimentos fermentados. Pela primeira vez em um mesmo estudo foram analisadas amostras de todas as oito regiões reconhecidas por lei como produtoras de QMA, e também pela primeira vez foram prospectadas e avaliadas linhagens de BAL provenientes de amostras de QMA da região das Serras de Ibitipoca. A prospecção de linhagens selvagens de BAL tem se intensificado nos últimos anos buscando microrganismos adaptados às condições de produção de queijos e outros alimentos fermentados, e os QMA se apresentam como rica fonte de BAL com grande variabilidade genética e alto potencial funcional e biotecnológico, inclusive para utilização em queijos com denominação de origem controlada (MARGALHO, 2020).

Em leite cru e queijos produzidos com essa matéria prima, são comumente encontradas BAL em forma de cocos e bacilos, sendo que muitas vezes a quantidade de cocos é maior. Porém, a diversidade de BAL encontrada depende da metodologia utilizada e do material de onde as bactérias são prospectadas (CABRAL *et al.*, 2016; CASTRO *et al.*, 2016). Nesse estudo, a maioria das BAL isoladas apresentou forma de bacilos (55,5%), sendo desse total 78,3% pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Luiz *et al.* (2017) também identificaram a maioria das BAL isoladas de QMA como pertencentes a esse gênero (72%). O isolamento majoritário de *Lactobacillus* spp. em nosso estudo pode ser explicado pelo fato de que foram utilizados métodos de isolamento dependentes de cultivo e amostras de QMA maturadas como fonte de BAL. Em queijos desse tipo, é esperado que a população das NSLAB, grupo no qual o gênero *Lactobacillus* spp. é mais frequente, seja dominante já que o crescimento das NSLAB ocorre em maior velocidade após o decréscimo populacional das linhagens iniciadoras, após o processo fermentativo inicial (BANCALARI *et al.*, 2020). Existem diversos meios de cultura que podem ser usados para o isolamento de BAL, mas os mais usados em produtos lácteos são o ágar M17 para isolar BAL em forma de cocos e o ágar MRS para bacilos (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001). Nesse estudo foram usados os dois meios de cultura citados para isolamento de BAL. A maioria dos bacilos

(74,5%) foi isolada no meio MRS, enquanto a maior parte dos cocos (55,3%) foi isolada no meio M17. Ainda que a tendência de isolamento da maioria dos bacilos em meio MRS e cocos em meio M17 tenha sido observada, ressalta-se um considerável número de bacilos isolados em meio M17 e um número ainda mais expressivo de cocos foi isolado em meio MRS. Apesar de o meio MRS ter sido desenvolvido para o cultivo de *Lactobacillus* e o meio M17 para *Streptococcus*, é sabido que esses meios de cultura não são absolutamente seletivos para esses gêneros e que diversas espécies de BAL e outras bactérias podem crescer satisfatoriamente nesses meios de cultura (LUIZ *et al.*, 2017; POTES; MARINHO, 2007). De qualquer forma, fica clara a importância de proceder o isolamento de BAL utilizando tanto o meio MRS quanto o meio M17 quando o objetivo for a obtenção do maior número possível de BAL. Não é incomum encontrar trabalhos de isolamento e identificação de BAL em que apenas o meio MRS foi utilizado (ALBAYRAK; DURAN, 2021; NERO *et al.*, 2021). Porém, a percepção da importância de utilizar os dois meios de cultura citados no isolamento de BAL, inclusive no isolamento de *Lactobacillus* spp., fica ainda mais reforçada quando são relacionados a identificação molecular dos bacilos e seus perfis moleculares com os meios de cultura onde esses isolados foram encontrados. Nesse estudo foi observado que algumas linhagens de *Lactobacillus* puderam ser isoladas tanto em meio MRS quanto em meio M17 (n=6). Porém, 10 linhagens geneticamente distintas de *Lactobacillus* foram isoladas exclusivamente no meio M17. Pode-se concluir que, para esse estudo, a utilização do meio M17 proporcionou o isolamento de linhagens de *Lactobacillus* que não teriam sido encontradas caso tivesse sido usado apenas o meio MRS.

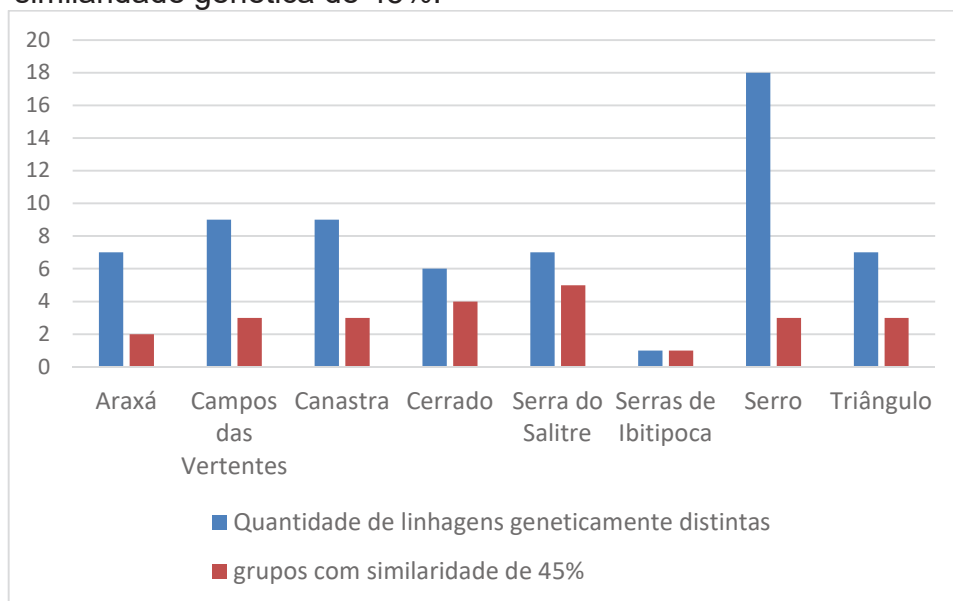
A utilização de ferramentas moleculares para a identificação de BAL a nível de gêneros, espécies e linhagens intraespecíficas tem se difundido nos últimos anos e se apresenta como prática necessária para a realização de um estudo confiável e preciso sobre a diversidade genética da microbiota dos produtos fermentados (VASIEE *et al.*, 2018). Dentre essas ferramentas, a técnica de Rep-PCR utilizando o primer GTG₅ tem se mostrado uma técnica eficiente para a diferenciação de linhagens intra-específicas, fornecendo dados confiáveis para a obtenção de perfis moleculares e realização de comparações de similaridade genética (KAUR *et al.*, 2017). A análise de similaridade dos perfis moleculares obtidos nesse estudo permitiu identificar 64 linhagens geneticamente distintas de *Lactobacillus*. Todos os perfis idênticos pertencem a isolados provenientes de uma mesma região, indicando a existência de

linhagens específicas de *Lactobacillus* para cada local de produção. A variabilidade genética da microbiota presente nos QMA pode ser influenciada pelas condições de produção e ambientais de cada local, inclusive variando de acordo com as estações do ano. Essas condições singulares podem explicar a especificidade dos perfis moleculares encontrados no presente estudo (LUIZ *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2017). Teixeira *et al.* (2021) demonstraram que a Rep-PCR obteve perfis moleculares visualmente mais diversos e em maior quantidade quando comparada com técnica de *pulsed field gel eletrophoresis* (PFGE) na análise de BAL do gênero *Weissella* isoladas em queijos artesanais. Em seu estudo, a utilização da técnica de Rep-PCR permitiu uma análise de agrupamento mais detalhada e a identificação de perfis moleculares idênticos encontrados em amostras diferentes. O presente estudo também identificou dois perfis moleculares idênticos em amostras diferentes, o que comprova a eficácia da técnica de Rep-PCR com o *primer* GTG₅ de fornecer dados que permitem identificar clones nesses casos.

A análise de agrupamento e a construção de um dendrograma com todos os 83 *Lactobacillus* permitiu observar que eles se dividiram em 8 grupos com índice de similaridade de 45%. Esse considerável número de grupos atesta a grande diversidade genotípica de *Lactobacillus* spp. isolados nesse estudo. Porém, dentre esses grupos, podemos notar a existência de um grande agrupamento contendo mais da metade das linhagens analisadas (34 isolados) e onde se concentram também 89,7% dos isolados da região do Serro. Essa observação indica que a maior parte de *Lactobacillus* isolados nesse estudo possuem relativa similaridade genética, especialmente os da região do Serro, ainda que as outras 30 linhagens isoladas nas diversas regiões se distribuam aleatoriamente pelos outros sete agrupamentos formados. Já a análise dos dendrogramas construídos para cada região separadamente mostra a similaridade genotípica entre suas linhagens específicas. Ainda considerando a similaridade genotípica de 45%, pode ser observado que a região do Serro, apresenta apenas 3 agrupamentos de perfis moleculares, mesmo tendo sido a região onde foi obtida a maior quantidade de perfis moleculares distintos (18 isolados). Por outro lado, temos regiões como o Cerrado (6 linhagens em 4 grupos) e Serra do Salitre (7 linhagens em 5 grupos) que apresentaram as maiores variações de perfis moleculares. Esses resultados demonstram que quantidade de isolados em uma determinada região pode não ter relação direta com a variabilidade genética da microbiota láctica encontrada nesses locais, podendo existir um expressivo número de

linhagens de BAL em uma região, mas com reduzida variabilidade genotípica entre elas (Figura 7). A diversidade genotípica encontrada pode ser influenciada pelas condições ambientais e de produção específicas para cada local, além do tempo de maturação dos queijos, que também pode influenciar nesses resultados. Queijos mais maturados apresentam condições menos favoráveis para a sobrevivência de algumas linhagens menos resistentes à baixa atividade de água, por exemplo.

Figura 7. Relação entre número de linhagens de *Lactobacillus* genotipicamente distintas e quantidade de agrupamentos com similaridade genética de 45%.



De um total de 15 BAL isolado nas amostras de QMA da região das Serras de Ibitipoca, apenas 3 isolados possuem forma de bacilo e apenas 1 perfil genético distinto de *Lactobacillus* spp. foi identificado. Esse é um número baixo se comparado com os obtidos nas demais regiões reconhecidas a mais tempo como produtoras de QMA. Ainda que a região das Serras de Ibitipoca seja tradicional na produção de QMA, o processo de reconhecimento exige uma série de adequações das instalações, utensílios e boas práticas de produção do leite e de fabricação do QMA que provocam transformações e modificações nos processos e ambientes de produção, com a construção de novas queijarias e aquisição de novos utensílios, por exemplo. Como as NSLAB são bactérias presentes no ambiente de produção e que contaminam o leite e os QMA durante o processo de fabricação (BRIGGILER-MARCÓ *et al.*, 2007), essas modificações podem ter causado a perda de algumas linhagens ou a redução

das suas populações momentaneamente, dificultando sua prospecção. Essas circunstâncias poderiam explicar o baixo número de *Lactobacillus* encontrado. Por outro lado, nessa região obtivemos o isolamento de 12 BAL em forma de cocos. Já foi demonstrado por outros estudos que alguns queijos artesanais brasileiros possuem uma microbiota lática predominantemente em forma de cocos (CABRAL *et al.*, 2016; KAMIMURA *et al.*, 2019), e essa pode ser a característica da microbiota lática das Serras de Ibitipoca. Assim, estudos mais aprofundados devem ser realizados para caracterizar a diversidade genética da microbiota dos QMA dessa região.

Estudos demonstraram que a utilização de linhagens autóctones de *Lactobacillus* como CAS na fabricação de queijos melhoraram o sabor desses alimentos, intensificando sabores e aromas e reduzindo o aparecimento de defeitos de sabor como amargor e rancidez, impactando positivamente na qualidade do produto final (BANCALARI *et al.*, 2020; BRIGGILER-MARCÓ *et al.*, 2007; PERALTA *et al.*, 2020). Possuir capacidade de acidificação reduzida é uma característica fundamental para uma CAS, já que, dessa forma, o teor de acidez do queijo não será aumentado significativamente pela ação dessas culturas durante a maturação, alterando o sabor e a aceitação do produto final pelo consumidor (FRANCIOSI *et al.*, 2008). Para atender esse critério de triagem, todas as linhagens de *Lactobacillus* identificadas nesse estudo passaram por teste de acidificação em leite desnatado reconstituído. Foram encontradas 5 linhagens de *Lactobacillus* com reduzida capacidade acidificante. A utilização das CAS se justifica com o objetivo de impactar positivamente os aspectos sensoriais dos queijos e a capacidade desses microrganismos realizarem proteólise e lipólise é uma característica interessante nesse sentido (NIETO-ARRIBAS *et al.*, 2009). Nesse estudo, 3 dos 5 isolados testados (CAN687, CER844 e SAL933) foram capazes de hidrolisar as proteínas do leite, enquanto nenhum isolado apresentou capacidade lipolítica. A produção de enzimas que hidrolisam as proteínas do leite permite o metabolismo dos aminoácidos por essas bactérias e a consequente liberação de alguns compostos voláteis. Com a proteólise, as BAL também contribuem com os processos de maturação dos queijos, acelerando a secagem e causando transformações desejáveis na sua textura. A ausência atividade lipolítica entre os 5 isolados testados não é um resultado surpreendente já que, de maneira geral, tal atividade é menos frequente nas BAL (GARCIA-CANO *et al.*, 2019; MOTTA; GOMES, 2015). De qualquer forma, esses

resultados demonstram o potencial dos isolados CAN687, CER844 e SAL933 para contribuir com os aspectos sensoriais dos alimentos fermentados.

Mais uma característica importante para a seleção de culturas adjuntas é a capacidade de produzir EPS a partir de fontes diversas de açúcares. Os EPS produzidos pelas BAL contribuem significativamente com a textura, consistência e outros aspectos reológicos dos alimentos lácteos fermentados. Esses compostos interagem com as micelas de caseína presentes no leite, melhorando a estrutura da coalhada e reduzindo a sinérese nos queijos. Os EPS têm também uma grande diversidade de utilizações na indústria como espessantes, emulsificantes, estabilizantes e adoçantes, por exemplo (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002; WELMAN; MADDOX, 2003). Todos os cinco *Lactobacillus* com baixa capacidade acidificante testados no presente estudo foram capazes de produzir EPS a partir de ao menos uma fonte primária de carboidrato. Os EPS são secretados para fora das células, conferindo às colônias aspecto viscoso e brilhante, e a avaliação desse fenótipo é um método bastante difundido na literatura no que diz respeito à triagem de microrganismos produtores de EPS (RUAS-MADIEDO; REYES-GAVILÁN, 2005). Novamente podem ser destacados os isolados CAN687, CER844 e SAL933 que foram capazes de produzir EPS a partir de todas as fontes de açúcar testadas, inclusive lactose. Através dessa caracterização preliminar, é possível afirmar que todos os cinco isolados testados apresentam potencial para serem usadas como culturas adjuntas na produção de queijos e também como culturas produtoras de EPS para a indústria de biopolímeros. Os isolados que produziram EPS a partir de lactose, destacadamente o isolado SAL933, podem ser usados sozinhos ou combinados com culturas iniciadoras na produção de alimentos lácteos fermentados. Porém, estudos adicionais são necessários para confirmação desses potenciais, bem como para comprovar a inocuidade desses microrganismos (MARGALHO *et al.*, 2020).

Além da preocupação de produzir queijos que atendam às demandas do consumidor nos aspectos sensoriais, também é preocupação da indústria a produção de queijos seguros, com maior vida de prateleira, reduzindo ou eliminando a adição de conservantes artificiais (BANCALARI *et al.*, 2020). Assim, outra característica importante para uma CAS é a capacidade antimicrobiana. Essa capacidade se dá pela ação de diversos subprodutos do metabolismo das BAL, bem como pela produção de bacteriocinas (MOKOENA, 2017). Deficiências nas técnicas de produção, utensílios e instalações inadequadas, ou ainda baixa higiene podem afetar negativamente a

qualidade microbiológica dos produtos lácteos. No caso dos queijos artesanais, a utilização do leite cru pode potencializar esses riscos. Uma importante doença causada pela ingestão de alimentos é a listeriose, que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*. A listeriose pode se apresentar de maneira severa e com alta taxa de mortalidade (20 % a 30 %), principalmente para pessoas mais susceptíveis como gestantes, recém-nascidos, idosos e indivíduos com sistema imunológico deprimido. Estudos para a determinação da prevalência de *L. monocytogenes* em leite cru e queijos artesanais no Brasil apresentam metodologia e resultados bastante variados. Em queijos artesanais, por exemplo, a prevalência desse patógeno pode variar de zero a 2,3 % (BORGES *et al.*, 2009). De qualquer forma, devido aos riscos à saúde causados pela presença dessa bactéria patogênica nos alimentos, a legislação brasileira estabelece a obrigatoriedade de ausência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos (BRASIL, 2001). Na busca por uma possível solução para esses desafios, o presente estudo demonstrou que todas as 5 linhagens geneticamente distintas de *Lactobacillus* testadas apresentaram capacidade antagonista contra *L. monocytogenes*. Esse resultado indica o grande potencial de bioproteção das linhagens avaliadas, mas não está necessariamente relacionado à produção de bacteriocinas já que apenas um isolado apresentou resultado positivo para a produção de substância antimicrobiana de natureza proteica. No presente estudo, essa diferenciação pôde ser demonstrada pela realização de dois testes de antagonismo diferentes ao mesmo tempo. Quando foi realizado o teste de antagonismo utilizando como base o meio MRS, todas as linhagens testadas foram capazes de inibir o crescimento do patógeno indicador. Nesse caso, como a fonte de carboidrato primária é glicose, é natural que os *Lactobacillus* sp. tenham produzido ácidos orgânicos que, ao se difundirem, reduziram o pH do meio de cultura, inibindo o crescimento da *L. monocytogenes*. Considerando a possibilidade da influência da produção de ácidos pelas BAL, um segundo ensaio de antagonismo foi utilizado como base o meio TSAYE sem glicose, com o objetivo de minimizar esse possível efeito e atestar a capacidade antagonista pela ação de bacteriocinas ou outra substância não acidificante. Nesse ensaio, apenas dois isolados foram capazes de inibir o crescimento do patógeno indicador. Esses resultados estão de acordo com os apresentados por outros estudos que demonstraram que ocorre a redução ou ausência de atividade antagonista quando é feita a neutralização do pH durante a análise (ARENA *et al.*, 2016; OLDAK *et al.*, 2017). A atividade antimicrobiana

apresentada pelos isolados SER707 e SAL933 nesse último ensaio pode ter ocorrido em função da competição por nutrientes, pela produção de outros metabólitos como peróxido de hidrogênio ou ainda pela ação de bacteriocinas (MOKOENA, 2017). A natureza proteica das substâncias antimicrobianas foi confirmada para o *Lactobacillus* SER797, isolado em QMA da região do Serro. Todos os isolados que de alguma maneira apresentaram capacidade antimicrobiana apresentam potencial para serem usados como CAS em alimentos, inclusive nos queijos com denominação de origem controlada de onde foram prospectadas, já que se tratam de linhagens autóctones, podendo representar um fator favorável ao aumento da segurança microbiológica dos alimentos (MARGALHO *et al.*, 2020).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo é o primeiro a realizar prospecção de BAL em todas as regiões produtoras da QMA, incluindo de maneira inédita a região das Serras de Ibitipoca. O isolamento de um considerável número de BAL, permitiu a criação de um banco de material genético que servirá como fonte de recursos para futuros estudos e utilizações tecnológicas. A aplicação de ferramentas moleculares permitiu a identificação de 64 perfis moleculares distintos de *Lactobacillus* e a observação da grande variabilidade genética entre eles. Ficou reforçada a percepção de que a utilização da técnica de Rep-PCR para a separação de linhagens geneticamente distintas é simples e eficaz, inclusive entre amostras diferentes. A utilização exclusiva do meio MRS no isolamento de BAL do gênero *Lactobacillus* pode levar a perda de um número considerável de linhagens, sendo recomendada a utilização ao mesmo tempo do meio M17. Foram selecionadas 5 linhagens de *Lactobacillus* com potencial tecnológico e de biocontrole as quais serão avaliadas futuramente para utilização como CAS em alimentos ou ainda como culturas produtoras de EPS, enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos para utilização industrial. Porém, para que esses microrganismos ou as substâncias por eles produzidas possam ser utilizados, sua inocuidade precisa ser garantida. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados para que essas linhagens específicas possam ser consideradas seguras para a utilização em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAYRAK, C. B.; DURAN, M. Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 150, 2021.
- ALEGRIA, A. *et al.* Characterization of the technological behavior of mixtures of mesophilic lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses made of raw milk without added starters. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 4, 2016.
- ARENA, M. P. *et al.* Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against foodborne pathogenic microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 464, 2016.
- BANCALARI, E. *et al.* *Lactobacillus paracasei* 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta-type cheese. **Food Research International**, v. 135, 2020.
- BASSI, D.; PUGLISI, E.; COCCONCELLI, P. S. Comparing natural and selected starter cultures in meat and cheese fermentations. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 118–122, 2015.
- BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259–274, 2001.
- BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, 2018.
- BORGES, M. F. *et al.* **Listeria monocytogenes em Leite e Produtos Lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa N° 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>. Acesso em: 5 nov. 2021.
- BRIGGILER-MARCÓ, M. *et al.* Nonstarter *Lactobacillus* Strains as Adjunct Cultures for Cheese Making: In Vitro Characterization and Performance in Two Model Cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, 2007.
- BRUNO, L. M. *et al.* Wild *Lactobacillus* strains: Technological characterisation and design of Coalho cheese lactic culture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, 2017.

- CABRAL, M. L. B. *et al.* Queijos artesanais: Fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. **Journal of Bioenergy Food and Science**, v. 3, p. :207–215, 2016.
- CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288-297, 2018.
- CASTRO, R. D. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, 2016.
- DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 271-275, 2002.
- DURLU-OZCAYA, F. *et al.* Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 861-870, 2001.
- FRANCIOSI, E. *et al.* A Factory-Scale Application of Secondary Adjunct Cultures Selected from Lactic Acid Bacteria During Puzzone di Moena Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, n.91, p. 2981–2991, 2008.
- GARCIA-CANO, I. *et al.* Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n. 13, p. 5243–5257, 2019.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.
- 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, n.2, p. 167-178, 2015.
- JAOUANI, M. S. *et al.* Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 1089-1100, 2015.
- KAUR, J. *et al.* DNA profiling of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from fermented foods and farm produce in Korea by repetitive element PCR. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1667-1673, 2017.
- KAMIMURA, B. A. *et al.* Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 2019.

LEWUS, C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991.

LEWUS, C.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991.

LUIZ, L. M. P. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n.1, p. 125-128, 2017.

LYNCH, K. M. *et al.* Isolation and characterisation of exopolysaccharide-producing *Weissella* and *Lactobacillus* and their application as adjunct cultures in Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 125-134, 2014.

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, p. 7908–7926, 2020.

MENESES, José Newton Coelho. **Queijo artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil**. Belo Horizonte: IPHAN, 2006.

MINAS GERAIS. Lei nº 19492, de 13 de janeiro de 2011. Altera dispositivos da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**, 2011. Disponível em: <http://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=19492&comp=&ano=2011>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro De Agropecuária. Portaria nº 2016, de 26 de novembro de 2020. Identifica a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA nº 1834, de 04 de julho de 2018. **Diário Oficial do Estado de Minas Gerais**, 2020. Disponível em: <http://ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias/1965-portarias-ano-2020>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

MONTEIRO, R. P.; DA MATTA, V. M. **Queijo Minas Artesanal: valorizando a agroindústria familiar**. Brasília: Embrapa, 2018.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: a importância destes microrganismos para alimentos. **Revista do Instituto 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. **LWT - Food Science and Technology**, v. 148, 2021.

- NIETO-ARRIBAS, P. *et al.* Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v. 20, p. 1092–1098, 2009.
- OLDAK, A. *et al.* Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese. **BioMed Research International**, v. 2017, n. 6820369, 2017.
- PERALES-ADÁN, J. LAB Bacteriocins Controlling the Food Isolated (Drug-Resistant) Staphylococci. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 1143, 2018.
- PERALTA, G. H. *et al.* Performance of *Lactobacillus paracasei* 90 as an adjunct culture in soft cheese under cold chain interruption. **International Dairy Journal**, v. 109, 2020.
- PEREIRA, G. V. M. *et al.* A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. **Food Reviews International**, v. 36, n. 2, p.135–167, 2020.
- PERIN, L. M. *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160-169, 2017.
- POTES, M. E., MARINHO, A. A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p. 561-562, 2017.
- RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and Milk Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Cap. 47, p.483-493.
- RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163–171, 2002.
- RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C. G. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 843-856, 2005.
- SAHRAOUI, Y. *et al.* Antibacterial and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* KJ660075 strain selected for its inhibitory power against *Staphylococcus aureus* for cheese quality improving. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 7133-7142, 2015.
- SENAN, S.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Comparison of Specificity of Different Primer Pairs for The Development of Multiplex PCR Assays for Rapid Identification of Dairy *Lactobacilli*. **International Journal of Science & Technology**, v. 3, n. 2, p. 123-137, 2008.

- SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. New trends in technology and identity of traditional dairy and fermented meat production processes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 37, p. 51-58, 2014.
- SILVA, C. C. G., SILVA, S. P. M., RIBEIRO, S. C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 594, 2018.
- SKARIYACHAN, S.; GOVINDARAJAN, S. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 189–196, 2019.
- TEIXEIRA, C. G. *et al.* Biodiversity and technological features of *Weissella* isolates obtained from Brazilian artisanal cheese-producing regions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 147, 2021.
- VASIEE, A.R. *et al.* Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 1, p. 423-432, 2018.
- VENEGAS-ORTEGA, M. G. *et al.* Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.18, 2019.
- VERSALOVIC, J. *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- WELMAN, A. D.; MADDUX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **TRENDS in Biotechnology**, v. 21, n. 6, 2003.