

**BIANCA DE OLIVEIRA HOSKEN**

**BACTÉRIAS LÁTICAS DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS COM POTENCIAL  
BIOPROTETOR PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Guilherme Prado Martin

Coorientador: João Batista Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

H826b            Hosken, Bianca de Oliveira, 1995-  
2021            Bactérias lácticas de queijos minas artesanais com potencial  
                 bioprotetor para aplicação industrial / Bianca de Oliveira  
                 Hosken. – Viçosa, MG, 2021.  
                 95 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Guilherme Prado Martin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Queijo-de-minas - Microbiologia. 2. Bacteriocinas.  
3. Bactérias do ácido láctico. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação  
em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 637.35

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fatima Alves CRB6/2578

**BIANCA DE OLIVEIRA HOSKEN**

**BACTÉRIAS LÁTICAS DE QUEIJOS MINAS ARTESANAIS COM POTENCIAL  
BIOPROTETOR PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

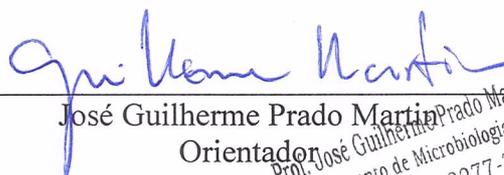
APROVADA: 31 de maio de 2021

Assentimento:



Bianca de Oliveira Hosken

Autora



José Guilherme Prado Martin

Orientador

Prof. José Guilherme Prado Martin  
Departamento de Microbiologia-UFV  
Matricula 12277-7

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho, guiar os meus passos e fazer com que sempre aconteça o melhor para o meu crescimento.

Aos meus pais Denise e Petrônio, e meu irmão Diogo, os responsáveis pela minha formação como pessoa. Por todo apoio, incentivo e amor.

Às ex e atuais companheiras de casa, Kemely, Aline, Sheila, Nash, Momoko e Pamela, por tornarem essa caminhada muito mais feliz.

À minha amiga Mísia, por sempre me ajudar de alguma forma.

Ao Thiago, por todo apoio e companheirismo durante essa caminhada.

Ao meu orientador Guilherme Martin, pela orientação e todo conhecimento compartilhado, contribuindo para meu crescimento acadêmico.

Ao meus coorientadores João Batista Ribeiro e Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira que foram imprescindíveis para a condução deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, Leandro, Gabriel, Leonardo, Deisy e Cleonice, pelos ensinamentos transmitidos e tornarem os dias de trabalho mais leve.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Produtos Fermentados, em especial à Suelen, pela valiosa ajuda.

À Embrapa Gado de Leite, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e apoio financeiro.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pelos conhecimentos compartilhados e ajudas.

Aos produtores de Queijos Minas Artesanais da Serra da Canastra e do Serro, que nos receberam em suas propriedades. Ao Prof. Jonas Guimarães (IFMG Bambuí), pela colaboração durante as coletas.

A todos que cruzaram meu caminho nesta etapa da vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

HOSKEN, Bianca de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Bactérias lácticas de Queijos Minas Artesanais com potencial bioprotetor para aplicação industrial.** Orientador: José Guilherme Prado Martin. Coorientador: João Batista Ribeiro.

No Brasil há uma grande diversidade de queijos artesanais (QA), com destaque para o Queijo Minas Artesanal (QMA), um dos mais antigos e tradicionais produzidos no país. Sua produção caracteriza-se pelo uso de leite cru e do pingo, rico em bactérias ácido lácticas (BAL) que desempenham um papel fundamental no perfil sensorial e segurança microbiológica do produto. O objetivo deste trabalho foi prospectar BAL de QMA visando à obtenção de cepas produtoras de bacteriocinas para controle de patógenos veiculados por alimentos. Foram coletadas amostras de QMA da Serra da Canastra e do Serro, a partir das quais foram isoladas BAL em ágar MRS e ágar M17. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente quanto à morfologia, coloração de Gram e teste da catalase, e molecularmente utilizando-se os *primers* LbLMA1-rev e R16-1, que amplificam um fragmento de DNA de 250 pb em genomas de *Lactobacillus* spp. Para descartar cepas geneticamente redundantes, foi realizada triagem molecular utilizando-se rep-PCR (GTG)<sup>5</sup>. A partir de cepas geneticamente distintas, avaliou-se a atividade antagonista dos isolados, bem como seu espectro de ação frente a patógenos, pela técnica *Spot on the lawn*. Para avaliar o caráter peptídico das substâncias antagonistas, foi realizado ensaio com proteinase K. Foram obtidos 500 isolados, sendo 380 (76%) cocos ou bacilos gram-positivos e catalase negativos. De 225 isolados caracterizados como bacilos e de 115 caracterizados como cocobacilos, 172 (76,44%) e 34 (29,57%), respectivamente, apresentaram o fragmento de DNA de 250 pb específico do gênero *Lactobacillus* e foram considerados pertencentes a este gênero. Do total de 380 isolados, 180 foram considerados geneticamente não redundantes, dos quais 100 exemplares foram escolhidos com base nas características fisiológicas distintas e de propriedade de origem dos QMA para análise da atividade antagonista. Dos isolados selecionados, 9 apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, 7 contra *Listeria innocua*, 10 contra *Escherichia coli* e 7 contra *Salmonella* Enteritidis. BAL isoladas de QMA mostraram-se candidatas a novos estudos para avaliação do seu potencial de atividade antagonista decorrente da produção de bacteriocinas.

**Palavras-chave:** Queijo Artesanal (QA). Diversidade microbiana. Microbiota láctica. *Lactobacillus*. Bacteriocinas.

## ABSTRACT

HOSKEN, Bianca de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Lactic acid bacteria from Minas Artisanal Cheese with bioprotective potential for industrial application.** Advisor: José Guilherme Prado Martin. Co-advisor: João Batista Ribeiro.

In Brazil there is a great diversity of artisanal cheeses, with emphasis on Minas Artisanal Cheese (MAC), the oldest and most traditional cheese produced in the country. It is produced with of raw milk and pingo, rich in lactic acid bacteria (LAB). This group plays a fundamental role in MAC, providing sensory characteristics and microbiological safety. The objective of this work was to prospect LAB from MAC in order to obtain strains that produce bacteriocins to application as preservatives by the food industry. From the cheeses collected at Serra da Canastra and Serro regions, LAB was isolated on MRS agar and M17 agar and characterized phenotypically (morphology, Gram staining and catalase test) and molecularly using the *primers* LbLMA1-rev and R16-1. These *primers* amplify a 250 bp DNA fragment in *Lactobacillus* spp. genome. To discard genetically redundant strains, molecular screening was performed using rep-PCR (GTG)5. From the genetically distinct strains, the antagonistic activity was evaluated, as well as the spectrum of action using the Spot on the lawn technique. To evaluate the peptide character of the antagonist substances produced, an assay was carried out with the proteinase K enzyme. 500 isolates were obtained, 380 (76%) were Gram-positive cocci or bacilli and catalase negative. Considering 225 isolates characterized as bacilli, 172 (76.44%) amplified the 250 bp fragment (positive for *Lactobacillus* genus). The 115 isolates characterized as cocobacilli were also analyzed and 34 (29.57%) were identified as *Lactobacillus*. In addition, 180 isolates were considered genetically non-redundant; 100 were selected based on the distinct physiological characteristics and origin MAC property to analyze the antagonistic activity against pathogens. Of the selected isolates, 9 showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, 7 against *Listeria innocua*, 10 against *Escherichia coli* and 7 against *Salmonella* Enteritidis. BAL isolates from QMA showed candidates for further studies to assess their potential for antagonistic activity due to the bacteriocins production.

**Keywords:** Artisanal Cheese (AC). Microbial diversity. Lactic microbiota. *Lactobacillus*. Bacteriocins.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	8
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
Objetivo Geral: .....	10
Objetivos Específicos: .....	10
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS BRASILEIROS</b> .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. PRODUÇÃO DE QUEIJOS NO BRASIL.....	12
3. CARACTERIZAÇÃO DOS QUEIJOS ARTESANAIS DO BRASIL.....	15
3.1. Região Norte.....	15
3.1.1. Queijo Marajó.....	15
3.2. Região Nordeste .....	16
3.2.1. Queijo de Manteiga .....	16
3.2.2. Queijo Coalho.....	17
3.3. Região Centro-Oeste.....	18
3.3.1. Queijo Caipira .....	18
3.4. Região Sudeste .....	18
3.4.1. Queijo Minas artesanal (QMA) .....	18
3.5. Região Sul .....	19
3.5.1. Queijo Colonial .....	19
3.5.2. Queijo Serrano .....	20
4. DIVERSIDADE BACTERIANA DOS QA BRASILEIROS .....	20
4.1. Bactérias láticas em QA brasileiros.....	22
4.1. Microrganismos indesejáveis em QA do Brasil .....	25
5. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BAL ISOLADAS DE QA BRASILEIROS.....	29
5.1. Bacteriocinas .....	32
6. CONCLUSÕES .....	35
REFERÊNCIAS .....	36
<b>CAPÍTULO 2. PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS GENETICAMENTE DINSTINTAS DE QMA DA SERRA DA CANASTRA E DO SERRO PARA CONSTRUÇÃO DE COLEÇÃO COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA</b> .....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1. Coleta de amostras de QMA.....	50
2.3. Avaliação de BAL quanto à redundância genética.....	52
2.4. Identificação molecular de bacilos e cocobacilos para enquadramento ao gênero Lactobacillus.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
3.1. Características fenotípicas dos isolados .....	54
3.2 Identificação e caracterização moleculares dos isolados de BAL.....	60
4. CONCLUSÕES .....	65
REFERÊNCIAS .....	66
<b>CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BAL ISOLADAS DE QMA CONTRA PATÓGENOS DE RELEVÂNCIA PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS .....</b>	<b>72</b>
1. INTRODUÇÃO.....	73
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1. Condições de cultivo e enumeração dos microrganismos .....	75
2.2. Avaliação da atividade antagonista de BAL contra L. lactis ATCC 19435 .....	75
2.3. Determinação de fatores de interferência na atividade antagonista dos isolados.....	76
2.4. Determinação do caráter peptídico das substâncias antagonistas.....	76
2.5. Atividade antagonista contra patógenos de importância alimentar .....	77
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
4. CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS .....	84
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>89</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

O queijo é um produto elaborado a partir da coagulação da caseína do leite pela ação de enzimas (renina e outras) em meio ácido (ácido lático) ou pela ação de ácidos orgânicos de grau alimentício. Tratamentos posteriores à coagulação como calor, pressão, salga e maturação podem, eventualmente, ocorrer (AMARANTE, 2015). Queijo Artesanal (QA) é aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação (BRASIL, 2019).

Dentre os QA brasileiros, o Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais, sendo responsável pela geração de renda de um grande número de produtores rurais familiares. Sua produção caracteriza-se pelo uso de leite cru e pela etapa final de maturação. Não são utilizadas culturas iniciadoras comerciais, sendo este papel desempenhado pela microbiota láctica proveniente do ambiente, do leite cru e do fermento endógeno, tradicionalmente conhecido como “pingo”, coletado do dessoramento dos queijos da última produção do dia anterior (AMARANTE, 2015; DORES; FERREIRA, 2012).

O grupo das bactérias do ácido lático (BAL) compreende gêneros que apresentam forma de cocos ou bacilos Gram-positivos, catalase negativos e não esporulados (MOZZI, 2015). A principal característica do grupo é a capacidade de fermentar carboidratos com consequente produção de ácido lático, o que contribui para as características de sabor, aroma e textura do produto final. Além disso, promovem a conservação associada à diminuição do pH e à produção de agentes antimicrobianos, como bacteriocinas. Desta forma, BAL contribuem para a qualidade sensorial e microbiológica dos queijos artesanais (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2011; CAVICCHIOLI et al., 2017; COOLBEAR; WEIMER; WILKINSON, 2011).

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente, capazes de exercer atividade bactericida ou bacteriostática sobre os microrganismos da mesma espécie ou de espécies filogeneticamente relacionadas (CHIKINDAS et al., 2018; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018). Devido a esta propriedade, têm sido alvo de pesquisas, uma vez que constituem potencial alternativa terapêutica em substituição e/ou complementação aos antibióticos (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Além disso, têm sido utilizadas como bioconservantes pela indústria de alimentos, visando ao controle de microrganismos indesejáveis, sejam estes deterioradores ou patogênicos, o que confere maior tempo de vida útil aos produtos e desperta a atenção de consumidores que desejam adquirir produtos livres de conservantes sintéticos (JOHNSON; JUNG; JIN, 2017; KUNİYOSHI et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi isolar BAL de QMA coletados em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, bem como avaliar o potencial de uso dos isolados para prospecção de compostos bioprotetores de interesse industrial.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

Prospectar BAL de QMA visando à obtenção de cepas produtoras de bacteriocinas com potencial de aplicação para controle de patógenos pela indústria de alimentos.

### Objetivos Específicos:

- I. Isolar e caracterizar morfológicamente BAL de amostras de QMA de diferentes regiões de Minas Gerais;
- II. Realizar triagem molecular de BAL para selecionar somente cepas geneticamente não-redundantes
- III. Identificar molecularmente BAL para enquadramento no gênero *Lactobacillus*.
- IV. Avaliar a atividade antagonista de linhagens de BAL geneticamente não redundantes sobre bactérias patogênicas de importância para a indústria de alimentos;
- V. Confirmar a natureza química e determinar o espectro de ação de moléculas com atividade antimicrobiana mais promissoras contra patógenos de relevância para a indústria de alimentos.

## CAPÍTULO 1. REVISÃO: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS BRASILEIROS

### Resumo

Os queijos artesanais (QA) brasileiros são mundialmente conhecidos por características sensoriais únicas, resultado de modificações decorrentes do processo fermentativo por bactérias ácido lácticas (BAL) e relacionadas a atributos como sabor, aroma e textura dos queijos. Além disso, compostos com atividade antimicrobiana também são produzidos por BAL, contribuindo para a segurança microbiológica do produto final. Neste contexto, o objetivo desta revisão foi elencar os potenciais biotecnológicos já estudados em BAL de QA do Brasil, com foco na atividade antimicrobiana de bacteriocinas. Os principais QA produzidos nas diferentes regiões do país são Marajó, Coalho, Manteiga, Caipira, QMA, Colonial e Serrano. A produção desses queijos envolve diferenças da matéria-prima, ingredientes, utensílios utilizados e condições de maturação, que resultam em produtos com características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais distintas. Dentre os microrganismos encontrados em QA brasileiros, destacam-se diferentes gêneros de BAL com potencial biotecnológico comprovado, conforme os dados de pesquisas na área demonstrados nesta revisão.

### 1. INTRODUÇÃO

QA produzidos em diferentes regiões do Brasil são conhecidos e apreciados mundialmente pelas características sensoriais únicas. Sua produção segue técnicas tradicionais da propriedade de origem, sem adição de culturas *starter*. A fermentação é espontânea e realizada por BAL, grupo de microrganismos predominante no leite e no ambiente de produção (BLAYA et al., 2018; MENG et al., 2018). A predominância de BAL nos QA está relacionada ao seu metabolismo durante o processo fermentativo, que envolve a síntese de compostos com atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, CO<sub>2</sub> e bacteriocinas (CAVICCHIOLI et al., 2017). Além disso, os produtos do metabolismo de algumas espécies de BAL são responsáveis pelo sabor, aroma e textura. Sendo assim, BAL impactam significativamente na qualidade microbiológica e sensorial dos QA.

Sua importância para os QA faz com que estes sejam reconhecidos como fonte natural para isolamento de bactérias com potencial biotecnológico. BAL frequentemente associadas a queijos artesanais pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Weisella*,

*Pediococcus* e *Leuconostoc* (DOMINGOS-LOPES et al., 2017; MARGALHO et al., 2021). No entanto, a diversidade pode variar de acordo com o tipo de queijo, técnicas de produção inter-regionais, variações na matéria-prima e características climáticas do local de produção e maturação (KAMIMURA et al., 2019b).

A diversidade de BAL dos QA resulta em diferentes aplicações biotecnológicas, comprovadas a partir de estudos acerca da atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos deterioradores e patogênicos, capacidade probiótica, produção de diacetil, de exopolissacarídeos e atividade proteolítica e lipolítica (BORGES et al., 2020; CARNEIRO et al., 2020; CAVICCHIOLI et al., 2017; MARGALHO et al., 2020; MARGALHO et al., 2021). Desta forma, essa revisão pretende relacionar os potenciais biotecnológicos já observados em BAL isoladas de QA do Brasil, com foco na atividade antimicrobiana decorrente da produção de bacteriocinas.

## **2. PRODUÇÃO DE QUEIJOS NO BRASIL**

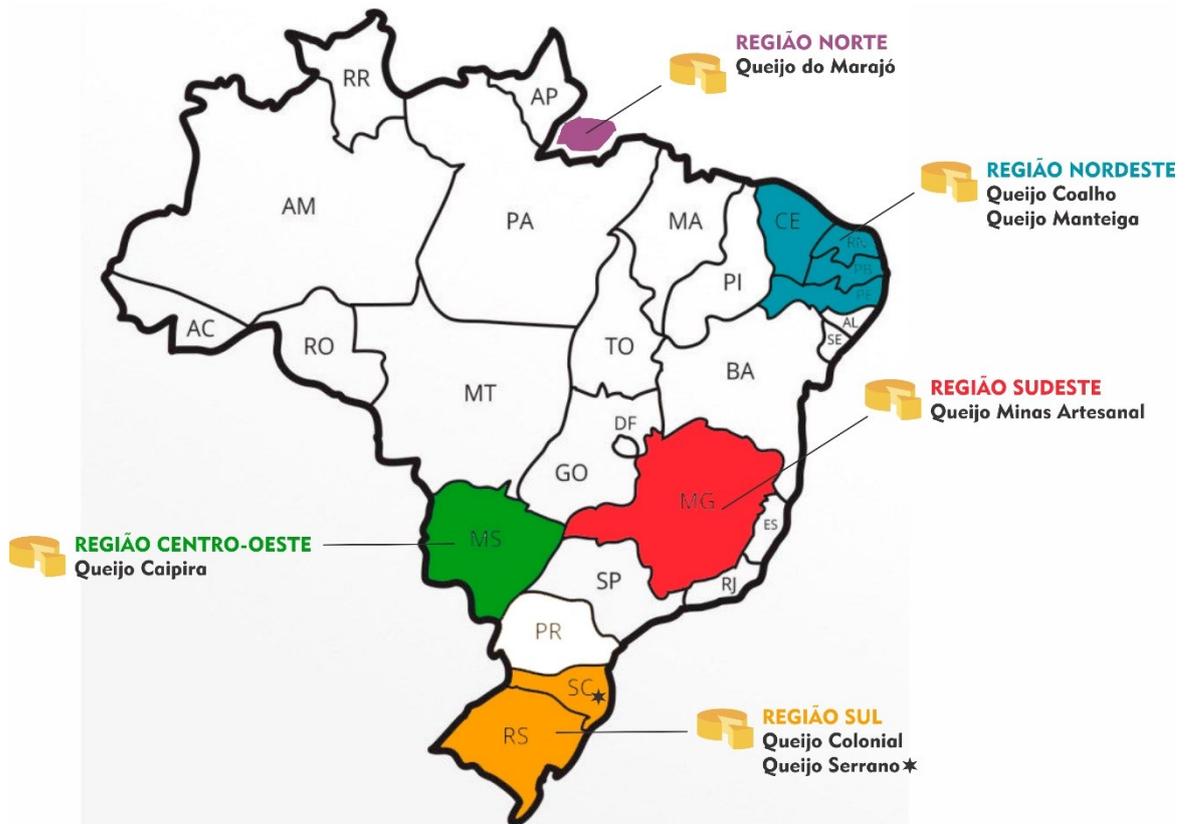
O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo e dentre os derivados lácteos produzidos, os queijos vêm ganhando destaque devido às maiores taxa de crescimento do consumo (EMBRAPA, 2019; FAO, 2020). Entre 2005 e 2016, o volume de venda de queijos expandiu-se 124%; isto se deve, em parte, ao fato de no Brasil existir uma grande diversidade de queijos, atendendo a diferentes perfis de consumidores. Além disso, os queijos atendem às novas tendências de consumo de alimentos nutritivos e práticos, de alto valor agregado (EMBRAPA, 2019).

A Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 (BRASIL, 1996), define por queijo o produto fresco ou maturado proveniente da separação parcial do soro, obtido pela ação física do coalho, enzimas, bactérias ou ácidos orgânicos específicos, obtendo-se um alimento com qualidade aceitável que pode conter substâncias aromatizantes e aplicações de corantes.

Dentre os queijos produzidos no país, os artesanais se destacam e se diferenciam dos industriais devido à sua importância histórica, socioeconômica e cultural, tradição secular de fabricação, pequena escala de produção, ausência de aditivos químicos e características sensoriais únicas, resultado de uma microbiota endógena característica de cada região produtoras (MONTEIRO; MATTA, 2018; ROLDAN; REVILLION, 2019). Estas variedades diferem quanto à composição do leite cru, às etapas envolvidas no processo, ao tempo de maturação, e às características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas (AMARANTE, 2015; KAMIMURA et al., 2019b).

A região Norte é representada pelo queijo Marajó, produzido na ilha de Marajó, Pará. No Nordeste são produzidos os queijos Coalho e Manteiga; na região Central, o queijo Caipira; no Sudeste, destaca-se o QMA; e no Sul, produzem-se os queijos Colonial e Serrano (Figura 1) (BRASIL, 2001; DA CRUZ; MENASCHE, 2014; FERREIRA et al., 2017; FUNCK et al., 2015; LIMA et al., 2020).

Figura 1 – Regiões reconhecidamente produtoras de QA no Brasil e seus respectivos queijos.



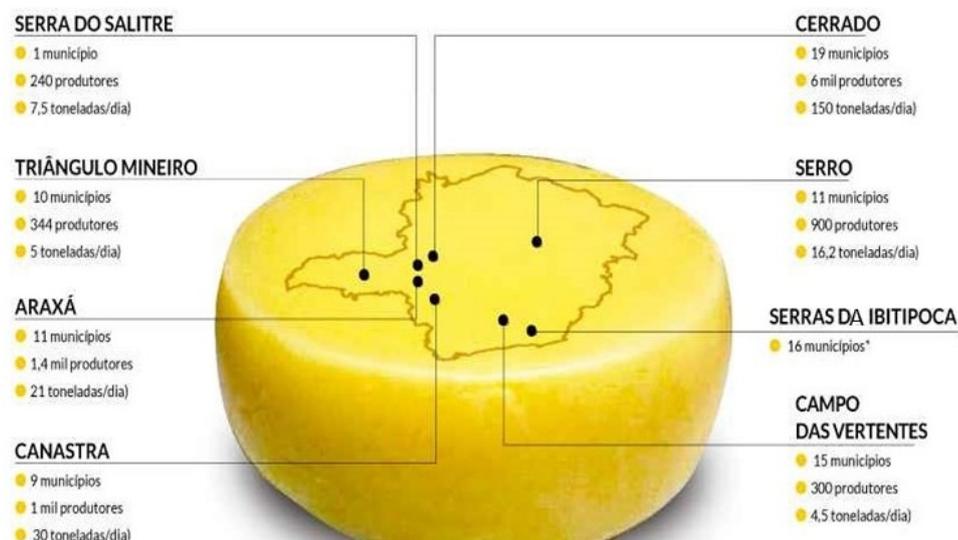
\*O Queijo Serrano é produzido somente em Santa Catarina

A elaboração e a comercialização de QA no Brasil são regulamentadas pela Lei n° 13.860 de 18 de julho de 2019 (BRASIL, 2019). Alguns estados têm, ainda, diretrizes específicas que regulam a produção, identidade e qualidade dos QA. A produção do queijo Marajó é regulamentada pela Portaria n° 418 de 26 de fevereiro de 2013; do queijo Coalho, pela Portaria n° 7 de 4 de janeiro de 2018; do queijo Caipira, pela Lei n° 2.820 de 4 de maio de 2004; do QMA, pela Portaria n° 818 de 28 dezembro de 2006 e Portaria n° 1.837 de 5 de julho de 2018; do queijo Colonial, pela Portaria n° 32 de 7 de novembro de 2018; do queijo Serrano, pela Lei n° 14.973 de 29 de dezembro de 2016. Essas diretrizes definem os procedimentos a serem

seguidos durante a produção, bem como os parâmetros de qualidade físico-química e microbiológica (ADEPARA, 2013; ADAGRO 2018; MATO GROSSO DO SUL, 2004; IMA, 2006; IMA, 2018; SANTA CATARINA, 2018; RIO GRANDE DO SUL, 2016).

Dentre as regiões produtoras, Minas Gerais se destaca, sendo responsável por 40% da produção nacional (LUIZ et al., 2017; SANT'ANNA et al., 2019; WILKINSON; CERDAN; DORIGON, 2017). Da variedade de queijos produzidos no estado, destaca-se o Queijo Minas Artesanal (QMA), cujo método de produção foi reconhecido em 2008 como Patrimônio Imaterial Brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Além deste reconhecimento, as regiões da Canastra e do Serro possuem selo de Indicação Geográfica (IG), o que fortalece a imagem do QMA como uma iguaria nacional (CRUZ; HESPANHOL, 2018; IPHAN, 2008; MEDEIROS; HORODYSKI; PASSADOR, 2017). Atualmente, estima-se que cerca de 30 mil produtores estejam envolvidos na produção de QMA. Nas regiões tradicionalmente caracterizadas e reconhecidas, são cerca de 9 mil produtores, distribuídos entre as microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro e, mais recentemente, Serras da Ibitipoca (Figura 2) (EMBRAPA, 2019; IMA, 2019, 2020).

Figura 2 – Regiões tradicionalmente caracterizadas e reconhecidas como produtoras de QMA.



Fonte: Estado de Minas (2019)

### **3. CARACTERIZAÇÃO DOS QUEIJOS ARTESANAIS DO BRASIL**

Segundo a Lei nº 13.860, QA é aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação (BRASIL, 2019). No Brasil, há uma grande diversidade de QA, que em geral recebem os nomes da região ou estado de produção, levando em consideração a conotação histórica e relevância econômica (KAMIMURA et al., 2019b). Para uma região ser reconhecida como produtora, levantamentos históricos, agroecológicos e climáticos são realizados a fim de caracterizar e delimitar as regiões que possuem uma tradição histórica e cultural do “modo de fazer” do QA (EMBRAPA, 2019).

A produção de QA no Brasil emprega métodos tradicionais, desenvolvidos com base em aspectos sociais e culturais de cada região. Isto significa que além de produzidos em ambientes diferentes, os queijos de cada região apresentam diferenças no processo produtivo, como matéria-prima, ingredientes, utensílios utilizados e condições de maturação, que resultam em queijos com diferentes características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais (AMARANTE, 2015; KAMIMURA et al., 2020; MATERA et al., 2018).

Esta diversidade não é verificada apenas de uma região para a outra, mas também entre propriedades de uma mesma região, que apesar de seguirem os mesmos protocolos, obtêm, ao final do processo, produtos com características diferenciadas (KAMIMURA et al., 2019b). Essas características são devido principalmente à microbiota do leite cru, que não é só responsável pelas características sensoriais, mas também pelo potencial biotecnológico e funcional a ser explorado, despertando a atenção de pesquisadores e consumidores em todo o mundo (ACURCIO et al., 2017; CAVICCHIOLI et al., 2017; MARGALHO et al., 2021; SEIXAS et al., 2014; ROLDAN; REVILLION, 2019; SUÁREZ et al., 2020). A seguir, serão descritos os principais queijos artesanais produzidos no Brasil, suas características e particularidades quanto ao modo tradicional de produção.

#### **3.1. Região Norte**

##### **3.1.1. Queijo Marajó**

A ilha do Marajó, localizada no Pará, possui o maior rebanho bubalino do Brasil, cujo leite obtido é em parte utilizado na produção de queijos (SEIXAS et al., 2015). O queijo Marajó

– o mais representativo da região – é produzido de modo artesanal, utilizando-se leite de búfala acrescido ou não de 40% de leite bovino, desnatado, não pasteurizado e não prensado. A massa é cozida, não há processo de maturação, não há uso de coagulantes e nem adição de cultura *starter*, sendo a fermentação decorrente apenas da atividade da microbiota endógena do leite cru, bem como do ambiente de produção (FERREIRA et al., 2017; SIMÕES et al., 2014).

Há duas variedades do queijo Marajó, que se diferenciam quanto aos níveis de gordura, textura, produtividade e umidade: tipo creme e tipo manteiga. Quando o cozimento da massa é feito adicionando-se creme obtido do desnate, obtém-se o tipo creme, que possui cerca de 50% de umidade (queijo de alta umidade) e 22% de GES (queijo magro). Quando o cozimento é feito com adição de manteiga, obtém-se o tipo manteiga, que possui 35% de umidade (queijo de baixa umidade) e 42% de GES (queijo semi-gordo) (CRUZ et al., 2020; FIGUEIREDO et al., 2011).

A produção desses dois tipos é semelhante e envolve as etapas de ordenha, repouso do leite à temperatura ambiente por 24 horas para que ocorra a fermentação espontânea (adiciona-se soro obtido da quebra da coalhada do dia anterior para aumentar a população de bactérias lácticas) e coagulação, quebra da coalhada, dessoragem com dessorador de fibra sintética e coleta de soro para uso na produção do dia seguinte, prensagem com saco de algodão, aquecimento da massa com água e leite (bubalino de preferência) para redução da acidez até que se atinja o ponto desejado, prensagem novamente para retirar o excesso de soro, trituração da massa e adição de sal, adição de creme (retirado no desnate feito logo após ordenha) ou manteiga (feita com a nata retirada após coagulação) e envase (AMARANTE, 2015; CRUZ et al., 2020).

As características de ambos os tipos de queijo Marajó produzidos na região Norte incluem consistência semidura, fatiável, textura compacta, lisa, sem olhaduras, cor branco-palha, livre de odores estranhos ao produto, sabor levemente ácido e salgado, cilíndrico ou retangular (ADEPARA, 2013).

## **3.2. Região Nordeste**

### **3.2.1. Queijo de Manteiga**

O queijo Manteiga (ou queijo do Sertão) é um queijo de massa cozida muito popular e consumido na região Nordeste, principalmente no Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (ALEXANDRE; AQUINO; FROEHLICH, 2016). Seu processamento consiste na coagulação do leite de vaca integral ou desnatado com emprego de ácidos orgânicos de grau alimentício

(cítrico, acético, láctico), dessoragem da coalhada obtida, lavagem da massa com água e/ ou leite quentes, salga, derretimento da massa com acréscimo de manteiga de garrafa ou manteiga da terra e, finalmente, a moldagem do queijo (LEITE et al., 2019; BRASIL, 2001).

Segundo seu regulamento técnico de identidade e qualidade, o queijo Manteiga deve apresentar teor de gordura variando entre 25% e 55% (semigordo a gordo) e um teor máximo de umidade de 54,9 % (média umidade). As características sensoriais que devem ser apresentadas são: consistência macia tendendo à untuosa, textura fechada, semifriável, com pequenos orifícios contendo gordura líquida em seu interior, cor amarelo-palha, sabor pouco acentuado lembrando manteiga, levemente ácido, podendo ser salgado, com odor pouco pronunciado lembrando manteiga, crosta fina e sem trincas (BRASIL, 2001).

### 3.2.2. Queijo Coalho

O Queijo Coalho é um dos queijos mais consumidos e comercializados no Brasil; assim como o queijo manteiga, também é importante para o desenvolvimento socioeconômico da região Nordeste. É produzido principalmente no Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba, sendo Pernambuco responsável por 40% da produção nacional. Sua produção envolve a coagulação do leite cru de vaca por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes, com auxílio ou não de bactérias lácteas selecionadas; seu pH deve ser relativamente alto (6,3-6,5) para evitar a desmineralização da massa. A coagulação geralmente ocorre a 35°C durante 35-45 minutos; depois de coagulada, a massa é cortada, cozida e o soro, drenado. Adiciona-se sal, molda-se o queijo, faz-se a prensagem e a maturação a 10-12°C durante 10 dias, para então ser embalado e comercializado; observa-se também a comercialização do produto fresco (BRASIL, 2001; FONTENELE et al., 2017).

Em termos legais, o queijo coalho deve apresentar de média a alta umidade, massa semi-cozida ou cozida e teor de GES variável entre 35,0% e 60,0%, sendo as principais características deste queijo seu sabor ligeiramente salgado e ácido, textura de borracha, aparência úmida e resistência ao calor (BRASIL, 2001; SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2017).

### **3.3. Região Centro-Oeste**

#### **3.3.1. Queijo Caipira**

O queijo Caipira é produzido mais especificamente no Mato Grosso do Sul, seguindo tradição histórica e cultural do Estado. A matéria-prima é o leite bovino cru, que é processado na fazenda de origem. O queijo apresenta consistência firme, sabor típico, massa uniforme com ou sem olhaduras mecânicas. Não há uso de corantes e conservantes durante a fabricação (KAMIMURA et al., 2019b; MARGALHO et al., 2020a). As etapas do processo de produção envolvem a filtração do leite recém ordenhado, uso de cultura endógena natural (neste caso, corresponde ao pingão) e coalho, corte da coalhada, moagem, drenagem do soro, moldagem, prensagem manual, salga seca e maturação durante 22 dias (MATO GROSSO DO SUL, 2004).

### **3.4. Região Sudeste**

#### **3.4.1. Queijo Minas artesanal (QMA)**

Minas Gerais é referência quando se trata de queijo artesanal de leite cru, sendo o QMA o mais conhecido e apreciado pelos brasileiros. A produção é feita em pequenas propriedades rurais localizadas em oito diferentes regiões do estado, reconhecidas como produtoras por estudos que avaliam o processo de fabricação e as características peculiares do local de origem, como a história, a economia, a cultura e o clima. O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) reconhece como produtoras de QMA as regiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serro, Serra do Salitre, Triângulo Mineiro e Serras da Ibitipoca, esta última a mais recentemente reconhecida (IMA, 2020).

A atividade queijeira de Minas Gerais é uma fonte de renda para as famílias dos agricultores e envolve as etapas de ordenha, filtração do leite, adição do coalho e pingão, coagulação, corte da coalhada, dessoragem, moldagem, prensagem, salga seca e maturação (CHAVES; MONTEIRO; MACHADO, 2013). Embora todas as regiões sigam praticamente as mesmas etapas, as características finais dos produtos são distintas devido ao desenvolvimento de uma microbiota específica relacionada principalmente ao clima de cada região. Esta microbiota é decorrente do processamento do leite, do queijo e da maturação, que também se diferem entre as regiões (PERIN et al., 2017).

A principal diferença quanto ao processamento consiste na etapa de prensagem. Enquanto os queijos fabricados na região do Serro são prensados manualmente, os fabricados nas demais regiões são prensados com auxílio de um tecido tipo “voal” (IPHAN, 2014). Essa diferença impacta no tempo de maturação dos queijos. Nos queijos do Serro, por serem prensados manualmente, a retenção de soro é desuniforme, o que interfere na quantidade de lactose eliminada no soro. Desta forma, há maior concentração de lactose, que é fonte de energia para as BAL realizarem a fermentação. Portanto, a prensagem manual favorece o processo fermentativo realizado pelas BAL, aumentando o teor de ácidos produzidos e, conseqüentemente, reduzindo o pH do queijo. O aumento da acidez dificulta o crescimento de microrganismos patogênicos, possibilitando uma maturação mais curta, de 17 dias. Por outro lado, os queijos produzidos nas demais regiões em que se realiza a prensagem com auxílio de tecido apresentam um período mínimo de maturação de 22 dias (COSTA JÚNIOR et al., 2014; DORES; FERREIRA, 2012; RESENDE, 2010).

Alguns produtores, para inocular o fermento endógeno na produção do dia, acabam por utilizar, pontualmente, queijo ralado produzido anteriormente na propriedade. Esta prática, conhecida como “rala”, teria sido utilizada em situações de problemas com o pingo, seja pela detecção de contaminações ou por inconsistências observadas no produto final; em algumas propriedades, no entanto, esta prática tem sido empregada com relativa frequência, especialmente na região do Serro (ABREU, 2015; PINTO, 2004). Há, ainda, relatos do emprego da rala na produção de queijos no Campo das Vertentes (OLIVEIRA, 2014), bem como em algumas propriedades da Serra da Canastra (SILVA, 2007).

As diferenças no processamento e maturação do QMA entre as regiões, somadas às características distintas de solo, temperatura, pastagens, genética do gado, origem do coalho e cultura endógena resultam em queijos com diferentes características de consistência, textura, coloração, formatos, pesos, composição físico-química e microbiológica (KAMIMURA et al., 2019b; SILVA, 2016).

### **3.5. Região Sul**

#### **3.5.1. Queijo Colonial**

O queijo Colonial, produzido a partir de leite cru ou pasteurizado de vacas europeias, é o principal queijo produzido pelas famílias rurais de agricultores da região Sul do Brasil, sobretudo nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sua produção foi introduzida no

Brasil por imigrantes alemães e italianos no século 20 (AUSANI et al., 2019; WILKINSON; CERDAN; DORIGON, 2017). O processo de fabricação consiste na filtração do leite, adição de sal (no leite ou na massa), adição de coalho industrial, coagulação, corte da coalhada, aquecimento, drenagem do soro, moldagem, prensagem mecânica e maturação por 30 a 75 dias. Como características, o queijo Colonial possui uma crosta dura ou semidura, massa compacta com olhaduras, coloração amarela, consistência macia e cremosa, semigordo, de média umidade e sabor ligeiramente aromático e picante (KAMIMURA et al., 2019b).

### 3.5.2. Queijo Serrano

O Queijo Serrano é um produto maturado, fabricado em microqueijaria localizada na propriedade de origem do leite, a partir de leite cru integral bovino recém-ordenhado de animais saudáveis, que se obtém pela coagulação enzimática do leite com utilização de coalho. Este queijo é produzido exclusivamente por pequenos pecuaristas familiares da Serra Catarinense (SC) e da região dos Campos de Cima da Serra (RS), com tradição na produção de queijo Serrano há mais de 200 anos. O processo de produção consiste na filtração do leite, coagulação por 45-60 minutos, quebra da coalhada que é, então, coada e espremida para retirada do soro, adição de sal (no leite ou na massa), enformagem, prensagem, e maturação mínima de 22 dias. O queijo Serrano é um queijo semigordo de média umidade, com ou sem olhaduras, de textura compacta e macia, consistência elástica e crosta amarelada ou amarelo palha (RIO GRANDE DO SUL, 2016).

## 4. DIVERSIDADE BACTERIANA DOS QA BRASILEIROS

Os QA mais populares do Brasil são fabricados com leite cru. Como o leite não é submetido à pasteurização, tem um alto valor nutricional, pH próximo da neutralidade e elevada atividade de água; isto favorece o desenvolvimento, na matéria-prima, de uma microbiota diversificada. Esta é constituída principalmente de bactérias, que conferem atributos interessantes ao produto final e, conseqüentemente, para o consumidor. Porém, dependendo do grupo e da abundância de microrganismos, a microbiota pode impactar negativamente na qualidade dos queijos, representando um risco para a saúde pública (CERVA et al., 2014; CLAEYS et al., 2013; MARGALHO et al., 2021; MELINI, 2017).

Assim, é imprescindível que o QA apresente qualidade físico-química e microbiológica, garantindo a segurança do produto final (DORES; FERREIRA, 2012; JOHNSON, 2017). Leite de boa qualidade microbiológica para produção de queijos é aquele livre de agentes etiológicos de zoonoses e de doenças de origem alimentar. Além do risco à saúde, leite cru de má qualidade também pode impactar nas características de sabor, aroma e textura do produto final. Como principais fontes de contaminação por microrganismos indesejáveis, destacam-se a ocorrência de zoonoses no rebanho (brucelose e tuberculose), bem como da mastite, ambiente de ordenha e produção em condições insatisfatórias de higiene (SOBRAL et al., 2017; VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ et al., 2019).

O leite também conta com uma microbiota endógena composta basicamente por BAL (PELLEGRINO et al., 2019; VANNIYASINGAM; KAPILAN; VASANTHARUBA, 2019). Este grupo não só está presente no leite cru como também pode ser adicionado no processo de fabricação do QA a partir de fermento endógeno. A diversidade de BAL adquirida a partir da adição do fermento endógeno é influenciada pelo ambiente de ordenha e produção, localização geográfica da fazenda produtora, condições climáticas e alguns aspectos do processo produtivo (CAMPAGNOLLO et al., 2018a; CARNEIRO et al., 2020; PERIN et al., 2017).

Além da matéria-prima utilizada e do fermento endógeno, a microbiota do QA pode ser advinda também do processo produtivo e do ambiente de produção e maturação (J. D'AMICO; DONNELLY, 2017; PINTO et al., 2017; SANT'ANNA et al., 2019). Alguns fatores podem estar relacionados com o desenvolvimento de diferentes grupos de bactérias no queijo, contribuindo, assim, para a segurança microbiológica. Por exemplo: cultura *starter* utilizada, bactérias lácticas incorporadas ao longo do processamento, acidificação, cozimento da coalhada, adição de sal, condições de maturação e alterações físico-químicas decorrentes da maturação (COGAN, 2011; D'AMICO; DONNELLY, 2017).

BAL realizam a fermentação dos carboidratos do leite, gerando principalmente ácido láctico, bem como outras substâncias orgânicas relacionadas aos atributos sensoriais do queijo (sabor, aroma e textura) e com atividade antimicrobiana (BACHMANN et al., 2011; DJADOUNI; KIHAL, 2012; GOBBETTI et al., 2018). Logo, contribuem para o sabor único do QA, bem como para a segurança microbiológica do produto final. Em contrapartida, a presença de microrganismos indesejáveis pode causar intoxicações e infecções alimentares, além de prejudicar suas características sensoriais (ANTONIO e BORELLI, 2020).

Um fator que impacta na segurança microbiológica do QA é a etapa de maturação, fenômeno complexo que envolve alterações físicas, químicas e microbiológicas. No período de maturação, algumas variáveis são importantes para direcionar o desenvolvimento da microbiota

desejável e favorecer uma fermentação adequada, dentre elas a temperatura, o potencial de oxirredução, a atividade de água e os valores de pH (RAFAEL, 2017). Durante a maturação podem ocorrer, ainda, processos de lipólise e proteólise, que compreendem reações enzimáticas responsáveis pelas características de sabor e textura do QA (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2011; LIU et al., 2014). Para o desenvolvimento adequado da maturação, há legislações baseadas em estudos que indicam o tempo mínimo exigido, bem como condições adequadas de temperatura e umidade das salas de maturação (BRASIL, 2011; DAS DORES; DA NOBREGA; FERREIRA, 2013; MARTINS et al., 2015; MINAS GERAIS, 2008).

#### 4.1. Bactérias lácticas em QA brasileiros

O grupo das BAL compreende bactérias Gram-positivas, cocos ou bacilos, não formadoras de esporos, catalase negativas, desprovidas de motilidade e anaeróbias facultativas. O ácido láctico é o principal produto da fermentação, produzido por meio de duas vias fermentativas. A homofermentativa é baseada na via Embden – Meyerhof – Parnas e produz praticamente apenas ácido láctico como produto final. A via heterofermentativa (ou heterolática) produz não só ácido láctico como produto final, mas também CO<sub>2</sub>, etanol ou acetato (LIU et al., 2014).

A maioria das BAL são consideradas microrganismos inócuos e algumas espécies recebem a denominação de GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Os gêneros mais frequentemente associados ao QA são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Weissella* (CAMPAGNOLLO et al., 2018; LUIZ et al., 2017; MARTINS et al., 2018; PAULA et al., 2012; KAMIMURA et al., 2019a). Cabe salientar que os nomes das espécies de *Lactobacillus* aqui mencionadas foram atualizadas segundo a reorganização proposta por Zheng et al. (2020), a partir da qual o gênero foi reclassificado em 23 novos gêneros considerando-se aspectos genotípicos, fenotípicos e ecológicos. Na Tabela 1 estão listadas BAL encontradas em QA brasileiros por trabalhos realizados nos últimos anos. Não foram encontrados dados referentes a BAL isoladas do queijo Serrano; além disso, pouco se sabe a respeito da diversidade da microbiota láctica dos queijos Marajó e Caipira.

Tabela 1 – BAL isoladas de QA das principais regiões produtoras do Brasil.

Queijo Artesanal	BAL	Referências
<b>Marajó</b>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus durans</i>	Figueiredo et al. (2016)
<b>Manteiga</b>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> , <i>Enterococcus italicus</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus infantarius</i> , subsp. <i>infantarius</i> , <i>Streptococcus lutetiensis</i> , <i>Streptococcus macedonicus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Streptococcus waiu</i> , <i>Weissella paramesenteroides</i>	Bruno et al. (2017) Medeiros et al. (2017)
<b>Coalho</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Lactococcus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>	Delamare et al. (2012) Rosa et al. (2008)
<b>Caipira</b>	<i>Lactococcus</i> , <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lacticaseibacillus casei</i> .	Kamimura et al. (2019b)
<b>Minas</b>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> , <i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Ligilactobacillus acidiphiscis</i> , <i>Lentilactobacillus hilgardii</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Lentilactobacillus buchneri</i> subsp. <i>buchneri</i> , <i>Lentilactobacillus parabuchneri</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterococcus rivorum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>Enterococcus hermannienseis</i> , <i>Enterococcus gilvus</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Enterococcus raffinosus</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	Camargo et al. (2020) Margalho et al. (2020) Luiz et al. (2017) Perin et al. (2017) Castro et al. (2016) Sant'Anna et al. (2016) Lima et al. (2009) Resende et al. (2011)
<b>Colonial</b>	<i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	Kamimura et al. (2019b)

Fonte: Adaptado de Kamimura et al. (2019a)

A predominância de BAL em QA deve-se ao tipo de metabolismo no processo fermentativo, que é capaz de sintetizar compostos atribuídos aos aspectos sensoriais do QA e à segurança microbiológica (DJADOUNI; KIHALL, 2012; MARGALHO et al., 2020b). O grupo é fundamental para o desenvolvimento de textura e sabor típicos (WILKINSON; LAPOINTE, 2020), decorrentes da produção de enzimas intracelulares (peptidases, lipases, e enzimas do

catabolismo de aminoácidos) que atuam por diferentes rotas enzimáticas, principalmente no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios constituintes do leite. O ácido láctico resultante, assim como os aminoácidos e ácidos graxos predominantes, juntamente com o citrato, tornam-se o substrato para o metabolismo posterior de muitos compostos aromáticos que conferem ao QA o *flavor* característico (CASTRO et al., 2016; COOLBEAR; WEIMER; WILKINSON, 2011; HUERTAS, 2010; MATERA et al., 2018).

BAL não iniciadoras, conhecidas como NSLAB (do inglês *Non Starter Lactic Acid Bacteria*) correspondem às BAL com aumento expressivo durante a maturação, que podem ser diversas, mas geralmente predominam as espécies de lactobacilos heterofermentativos facultativos, seguido de *Pediococcus pentosaceus* (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2011). As NSLAB, assim como as BAL iniciadoras, podem impactar no sabor e textura final dos queijos devido à produção de compostos resultantes do catabolismo de aminoácidos, principalmente de metionina, aminoácidos aromáticos e aminoácidos de cadeia ramificada, além de exopolissacarídeos (EPS) (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018; BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2011; GOBBETTI et al., 2018; MARGALHO et al., 2020b). Além dos ácidos orgânicos produzidos (láctico, acético e propiônico), que reduzem o pH da massa do queijo, outros compostos antimicrobianos, tais como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, diacetil e CO<sub>2</sub>, atuam inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis (CAMPAGNOLLO et al., 2018b; CAVICCHIOLI et al., 2017; MARGALHO et al., 2021; MELINI, 2017).

Os EPS produzido pelas NSLAB se ligam a moléculas de água presentes na complexa estrutura da rede de caseína, interagindo com proteínas e micelas e fortalecendo a estrutura da coalhada, reduzindo a sinérese durante a primeira etapa de acidificação e coagulação. Isso faz com que o EPS contribua para as características reológicas e de textura, além de ser um mecanismo de defesa contra condições estressantes, como a dessecação e o ataque de bacteriófagos (o EPS impede que seja feita a ligação do bacteriófago com a membrana de BAL) (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; MARGALHO et al., 2020b; ZHANG et al., 2015).

Indiretamente, alguns fatores influenciam no sabor, textura e segurança microbiológica dos queijos, como atividade de água, pH, condições climáticas e temperatura das salas de maturação. Isto acontece, pois de acordo com estes fatores a microbiota presente nos queijos pode variar, favorecendo ou não o crescimento de microrganismos indesejáveis. Além disso, a atividade e especificidade de peptidases também varia de acordo com estes fatores, resultando em diferentes compostos capazes de gerar o aroma, sabor e textura (CARNEIRO et al., 2020; FONTENELE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017). Considerando-se, portanto, os efeitos

benéficos de BAL no QA, tanto em relação aos atributos de sabor quanto aos de segurança, o grupo e seus respectivos metabólitos têm sido alvo de pesquisas com foco no potencial biotecnológico de aplicação em diferentes áreas.

#### **4.1. Microrganismos indesejáveis em QA do Brasil**

Diante dos riscos de contaminação em todo o processo de fabricação dos QA, bem como dos prejuízos que essa condição pode causar, a Lei nº 13.860, que dispõe sobre a elaboração e comercialização de queijos artesanais, determinou algumas exigências a fim de se prevenirem altas contagens de microrganismos deterioradores e/ou a presença de microrganismos patogênicos. De acordo com esta lei, os queijos devem ser fabricados apenas por estabelecimento rural certificado como livre de tuberculose e brucelose ou controlado para brucelose e tuberculose por órgão estadual de defesa sanitária animal, que o estabelecimento participe de programa de controle de mastite, que implante programa de boas práticas agropecuárias na produção leiteira, controle e monitore a potabilidade da água utilizada no processo produtivo dos QA e que este seja realizado segundo as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) – conjunto de normas empregadas em produtos, processos e edificações que visam à promoção e à certificação da qualidade e segurança do alimento (BRASIL, 2019; BRASIL, 1997).

Microrganismos deterioradores e/ou patogênicos encontrados em QA produzidos no Brasil estão listados na Tabela 2. Tais microrganismos podem estar relacionados à qualidade sanitária do rebanho, qualidade da matéria-prima, condições higiênico-sanitárias durante a fabricação, incluindo a maturação e estocagem, além das condições ambientais.

Tabela 2 – Microrganismos indesejáveis isolados de QA das principais regiões produtoras do Brasil.

<b>Queijo Artesanal</b>	<b>Microrganismos indesejáveis</b>	<b>Referências</b>
<b>Marajó</b>	Coliformes, <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , fungos e leveduras	Seixas et al. (2015) Simões et al. (2014)
<b>Manteiga</b>	<i>Listeria</i> spp., <i>Salmonella</i> sp., <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva, <i>E. coli</i> , coliformes termotolerantes, coliformes totais, fungos e leveduras	Alexandre et al. (2016) Feitosa et al. (2003) Viana et al. (2009)
<b>Coalho</b>	Coliformes totais e termotolerantes, <i>E. coli</i> , <i>Listeria</i> spp., <i>Salmonella</i> sp., <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva, <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Staphylococcus cohnii cohnii</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>hominis</i> , <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>Aeromonas veronii</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , fungos e leveduras	Medeiros et al. (2017) Cezar et al. (2015) Evêncio-Luz et al. (2012) Meneses et al. (2012) Andrade et al. (2011) Feitosa et al. (2003)

Continuação Tabela 2 – Microrganismos indesejáveis isolados de QA das principais regiões produtoras do Brasil.

<b>Queijo Artesanal</b>	<b>Microrganismos indesejáveis</b>	<b>Referências</b>
<b>Serrano</b>	Coliformes totais e termotolerantes, <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Listeria</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>	Pontarolo et al. (2017) Melo et al. (2013) Delamare et al. (2012) Rosa et al. (2008)
<b>Caipira</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> sp.,	Kamimura et al. (2019)
<b>Queijo Minas Artesanal</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E. coli</i> , coliformes totais e termotolerantes, <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Coxiella burnetti</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Salmonella</i> spp.	Camargo et al. (2020) Castro et al. (2020) Rozental et al. (2020) Andretta et al. (2019) Perin et al. (2017) Santos et al. (2017) Garcia et al. (2016) Mata et al. (2016) Nasser et al. (2015) Souza et al. (2015) Galinari et al. (2014) Fernandes et al. (2011) Borelli et al. (2006) Pinto et al. (2009)
<b>Colonial</b>	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva, <i>Salmonella</i> sp., coliformes totais e termotolerantes, <i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria seeligeri</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Ausani et al. (2019) Kamimura et al. (2019) Silva et al. (2015) Zaffari et al. (2007)

Fonte: Adaptada de Kamimura et al., 2019a

A ocorrência de microrganismos deterioradores impacta a qualidade do produto final de diversas maneiras. Bactérias psicrotróficas e *Bacillus* spp., por exemplo, são capazes de produzir enzimas extracelulares ou intracelulares (proteases, lipases e fosfolipases), que afetam a qualidade do leite e impactam no sabor, coagulação indesejável de proteínas e aumentam a concentração de ácidos graxos livres e aminoácidos. A alta concentração de aminoácidos e

ácidos graxos livres, em decorrência do aumento de proteinases e lipases, respectivamente, alteram o tempo de coagulação e a qualidade da coalhada obtida, que se torna frágil e menos compacta. Além disso, queijos maturados podem apresentar sabor rançoso indesejável quando há altas concentrações de ácidos graxos livres na massa do queijo (BACHMANN et al., 2011; MURPHY et al., 2016; VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ et al., 2019).

Na ocorrência de altas contagens de coliformes, que fermentam a lactose com produção intensa de gás, pode-se observar o fenômeno conhecido como estufamento precoce. Neste processo são formadas olhaduras indesejáveis nos queijos, comprometendo sua aparência, bem como acidificação excessiva, comprometendo o sabor do produto final. Na ocorrência de bactérias do gênero *Clostridium* spp., observa-se o fenômeno de estufamento tardio, uma vez que o gênero é capaz de fermentar o lactato e a glicose gerando ácido butírico, ácido acético, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, etanol, butanol e acetona. Tais compostos resultam em trincas internas nos queijos, além de sabor e odor desagradáveis, que diminuem a aceitação do produto pelo consumidor. Além disso, altas contagens de coliformes termotolerantes (gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) geralmente estão relacionados à potencial presença de microrganismos patogênicos (SOBRAL et al., 2017).

Patógenos em QA representam um risco à saúde do consumidor. A presença de microrganismos como *Salmonella* spp., *Listeria* sp., *Mycobacterium bovis* e *Coxiella burnetii* podem causar infecções alimentares e zoonoses, além da possibilidade de carregarem genes de resistência a antimicrobianos (ALEXANDRE, A. P. S.; AQUINO; LYRA, D. G.; FROEHLICH, 2016; EVANGELISTA BARRETO et al., 2016; MEHLI et al., 2017). Porém, o problema mais frequentemente relacionado à qualidade microbiológica do leite é a mastite, doença inflamatória das glândulas mamárias que leva ao aumento da contagem de células somáticas (CCS). Este aumento tem sido associado à diminuição de caseína presente nos queijos, diminuindo o rendimento da produção de QA, além de impactar no sabor (JAMALI et al., 2018; MURPHY et al., 2016; SOBRAL et al., 2017).

O microrganismo mais comumente relacionado à mastite é *Staphylococcus aureus*, mas também podem ser associados a esta doença *Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*, dentre outros. Há situações da mastite em que se opta pelo tratamento convencional, que consiste no uso de antibióticos. Neste período o leite ordenhado deve ser descartado, devido à possibilidade de conter resíduos. Outro problema relacionado ao uso de antibióticos no tratamento de animais consiste na emergência de patógenos resistentes. Uma vez veiculados pela matéria-prima, patógenos resistentes podem causar sérios riscos à saúde dos consumidores (COGAN, 2011; DE MEDEIROS et al., 2017; FRAZILIO et al., 2018;

KULKARNI; KALIWAL, 2013; ONICIUC et al., 2017; SÁ et al., 2018; TAPONEN et al., 2017).

Além de frequentemente associados a casos de mastite bovina, bactérias do gênero *Staphylococcus* também podem ser indesejadas nos queijos devido à expressão de fatores de virulência, principalmente enterotoxinas estafilocócicas e Toxina-1 relacionada à síndrome do choque tóxico, atividade hemolítica, formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos de importância clínica. Em estudo realizado no Campo das Vertentes por Castro et al. (2020), foi investigada a presença de genes que codificam a produção de enterotoxinas em isolados de *S. aureus* (n=76) provenientes do leite cru (n=14), da cultura *starter* (n=5), do queijo (n=42) e das mãos dos produtores (n=15). Dos 76 isolados de *S. aureus* investigados, 26 (34,21%) apresentaram pelo menos um dos genes para produção de toxinas. Nesse estudo foi ainda avaliada a atividade hemolítica, o potencial de formação de biofilme e a resistência à antibióticos dos isolados de *S. aureus*. Dos 76 isolados avaliados, 43 (56,58%) apresentaram atividade hemolítica; 53 (69,73%) potencial para formação de biofilme; 51 (67,11%) foram considerados resistentes à penicilina G e 21 isolados (27,63%) à tetraciclina. Ferreira e colaboradores (2016) também detectaram genes que codificam a produção de enterotoxinas em *S. aureus* isolados de QA do Brasil. Estes trabalhos demonstram a importância de se prevenirem altas populações de *S. aureus* produtores de toxinas no produto.

O uso inadequado de antibióticos também pode impactar na microbiota láctica do leite e do fermento endógeno, prejudicando o processo fermentativo em diferentes pontos, como falta de acidificação necessária para textura e consistência adequada do queijo, retenção de soro na massa, pH elevado (o que contribui para o crescimento de microrganismos indesejáveis), risco de formação de gás por coliformes resistentes, maturação inadequada, resultando em queijos úmidos e sabor pouco pronunciado (SOBRAL et al., 2017).

## **5. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BAL ISOLADAS DE QA BRASILEIROS**

A crescente demanda por produtos que atendam ao conceito *clean label* levou à busca por microrganismos de fontes naturais, como os alimentos naturalmente fermentados, capazes de se manterem ativos nas formulações por longos períodos de processamento e estocagem dos produtos. Desta forma, os QA são considerados uma fonte potencial para isolar microrganismos para esta finalidade (MARGALHO et al., 2021). Dentre estes, BAL se destacam pelo longo histórico de uso na indústria de alimentos, especialmente para fermentação e conservação. Essa característica se deve aos produtos do seu metabolismo, que podem melhorar as características

nutricionais e sensoriais dos alimentos, bem como a produção de compostos antimicrobianos que contribuem para a conservação. Além da indústria de alimentos, outros setores também fazem uso de BAL, como bioquímico, de cosméticos e de itens farmacêuticos (PENG et al., 2020).

Ainda que BAL e seus metabólitos venham sendo pesquisados nos últimos anos, novos estudos de prospecção são necessários para a descoberta de isolados com características diferenciadas, aumentando o potencial de exploração tecnológico. Na Tabela 3 estão apresentados os potenciais biotecnológicos de BAL, isoladas de QA brasileiros, e alguns de seus compostos resultantes do metabolismo.

Tabela 3 – Potenciais biotecnológicos de BAL, provenientes de QA brasileiros, e metabólitos.

<b>Queijo Artesanal</b>	<b>Potencial Biotecnológico</b>	<b>Referência</b>
Marajó	Produção de diacetil	Figueiredo et al. (2016)
Manteiga	Probiótico	Margalho et al. (2021)
Coalho	Probiótico, atividade lipolítica, inibição de <i>Listeria</i> sp., <i>B. cereus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Dias et al. (2019) Margalho et al. (2021) Margalho et al. (2020) Lima et al. (2020)
Serrano	Atividade lipolítica, atividade proteolítica, probiótico, inibição de <i>L. monocytogenes</i>	Margalho et al. (2021) Margalho et al. (2020)
Caipira	Atividade proteolítica, probiótico	Margalho et al. (2021) Margalho et al. (2020)
QMA	Produção de diacetil, produção de EPS, atividade lipolítica, atividade proteolítica, probiótico, inibição de <i>Listeria</i> sp., inibição de <i>Enterococcus</i> sp., <i>S. aureus</i> e <i>S. Typhimurium</i>	Campagnollo et al. (2017) Margalho et al. (2020) Margalho et al. (2021) Sant’Anna et al. (2017) Tulini; Winkelströter; de Martinis, (2013) Andrade et al. (2014) Todorov; Holzapfel; Nero, (2020) Costa et al. (2013) Acurcio et al. (2017) Valente et al. (2019)
Colonial	Probiótico, inibição de <i>L. monocytogenes</i>	Margalho et al. (2021) Margalho et al. (2020)

Nesse contexto, estudos recentes têm explorado alguns aspectos em particular, como a produção de diacetil e EPS por BAL, bem como a atividade enzimática, voltados especificamente a potenciais melhorias nas características sensoriais dos alimentos. O diacetil (2,3-butanodiona) produzido por BAL é responsável pelo aroma e sabor amanteigado em diferentes tipos de produtos fermentados (HERNANDEZ-VALDES; SOLOPOVA; KUIPERS, 2020; MARGALHO et al., 2020b). Assim, BAL isoladas de QA que comprovadamente

produzem este composto podem ter sua capacidade explorada pela indústria alimentícia. Da mesma forma, a produção de EPS, importante para as características reológicas e de textura do produto, tem sido alvo de estudos, voltados à exploração destas bactérias para obtenção de agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016; LYNCH et al., 2018). Além disso, a produção de EPS tem sido associada à ação prebiótica, propriedade que também tem sido amplamente estudada em BAL isoladas de QA (Tabela 3).

Quanto às atividades proteolíticas e lipolíticas, estas se referem à capacidade das BAL de sintetizarem enzimas extracelulares envolvidas nos processos de proteólise e lipólise, importantes para alguns tipos de QA maturados (BACHMANN et al., 2011; COOLBEAR; WEIMER; WILKINSON, 2011; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Sendo assim, tais enzimas possuem aplicabilidade pela indústria de alimentos, como agentes proteolíticos e lipolíticos utilizados principalmente pela indústria de laticínios (WORSZTYNOWICZ et al., 2019).

Além das aplicações mencionadas anteriormente, a questão de estirpes probióticas tem sido cada vez mais relevante, tanto no âmbito das indústrias de alimentos, quanto de nutrição e saúde. Para BAL serem consideradas probióticas, devem ser capazes de resistir às condições ácidas do trato gastrointestinal, terem capacidade de aderir à mucosa intestinal e, portanto, se estabelecerem no cólon, não apresentarem fatores de virulência, capacidade de prevenir a multiplicação de patógenos, capacidade de resistir ao estresse durante o processamento dos alimentos, serem devidamente identificadas, caracterizadas e qualificadas (ANDRADE et al., 2014; LIMA et al., 2019; MARGALHO et al., 2021). Trata-se, portanto, de mais um exemplo de aplicação de estirpes do grupo das BAL.

Apesar da já reconhecida capacidade de BAL de prevenir a multiplicação de patógenos devido à produção de diversos compostos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e CO<sub>2</sub>, a descoberta da colicina V em 1925 e, posteriormente, da nisina em 1969 deu início a uma série de pesquisas com peptídeos bioativos, mais especificamente as bacteriocinas. Sua aplicabilidade pela indústria de alimentos e médica, em alternativa ao uso de aditivos químicos e antibióticos, tem despertado o interesse por novas pesquisas na área (COELHO et al, 2014; MONTEL et al., 2014 BALCIUNAS et al., 2013; MAYO et al, 2010).

## **5.1. Bacteriocinas**

Bacteriocinas são proteínas ou peptídeos sintetizados ribossomicamente por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, diferindo-se em tamanho, alvo microbiano, modo de ação,

liberação e mecanismos de imunidade (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Tais moléculas são capazes de exercer diferentes tipos de bioatividade, principalmente antimicrobiana, cujos efeitos compreendem desde bacteriostático, bactericida até bacteriolítico, sobre microrganismos taxonomicamente relacionados ou não (GONTIJO et al., 2020; PEREZ et al., 2018; SILVA et al., 2018). As bacteriocinas podem ser de amplo espectro, inibindo uma grande variedade de bactérias, ou de espectro estrito, inibindo bactérias taxonomicamente próximas (SILVA et al., 2018; MILLS et al., 2011). De um modo geral, são catiônicas e exibem propriedades anfipáticas, sendo a membrana celular, na maioria das vezes, o alvo de sua atividade (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

A aplicação de bacteriocinas é de amplo interesse, pois apresentam atividade contra diferentes patógenos deterioradores de alimentos, estabilidade a diferentes faixas de pH e temperaturas; produção, em sua maioria, por BAL, grupo de microrganismos reconhecidos como GRAS; possibilidade de uso como conservantes naturais em alimentos; não são ativas ou tóxicas às células eucarióticas; são inativadas por proteases digestivas, exercendo pouca influência sob a microbiota gastrointestinal; não selecionam linhagens resistentes à antibióticos; e, por fim, possuem determinante genético usualmente codificado por plasmídeos, o que permite manipulação genética facilitada (HEREDIA-CASTRO et al., 2017; GALVÉZ et al., 2007).

A única bacteriocina aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como conservante em muitos alimentos é a nisina, comercialmente disponível como Nisaplin (YANG et al., 2014). Além das vantagens já mencionadas, estas moléculas também são aplicáveis na prática veterinária, inclusive para o tratamento da mastite como uso alternativo em relação aos antibióticos convencionais (GODOY-SANTOS et al., 2019; AHMAD et al., 2017; GUAN et al., 2017; YANG et al., 2014; GUILHELMELLI et al., 2013). No entanto, a baixa estabilidade e solubilidade da nisina em pH neutro, a natureza hidrofóbica e a seleção de bactérias resistentes fazem com que a busca por outras bacteriocinas se justifique por meio de pesquisas científicas (IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020; GODOY-SANTOS et al., 2019).

Neste contexto, os QA representam potenciais fonte de bacteriocinas, pela significativa diversidade de sua microbiota, sobretudo de BAL (MARGALHO et al., 2020). Muitos estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de BAL isoladas de QMA frente a patógenos de importância na indústria de alimentos, como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, entre outros (CAMPAGNOLLO et al., 2018; FIALHO et al., 2018; ACURCIO et al., 2017; SANT'ANNA et al., 2017; ANDRADE et al., 2014). Gontijo et al. (2020), ao estudarem a distribuição filogenética do repertório de bacteriocinas de BAL associadas a queijos

artesanais, relataram supostas bacteriocinas que ainda não foram caracterizadas, o que confirma que os QA são potenciais fontes deste antimicrobiano; os autores reforçam, ainda, que novos estudos *in vitro* visando à descoberta e caracterização de novas bacteriocinas se fazem necessários.

## 6. CONCLUSÕES

Os QA do Brasil possuem particularidades em sua produção que influenciam na população de BAL neles presentes. Por este motivo, estes queijos representam uma rica fonte de BAL e seus metabólitos com propriedades biotecnológicas promissoras à aplicabilidade em áreas médica, bioquímica e setor alimentício. Apesar de já existirem trabalhos que demonstram essas propriedades biotecnológicas, ainda há espaço para novos estudos de prospecção de BAL de QA do Brasil e suas aplicações. Observou-se, ainda, que a microbiota láctica de alguns tipos de QA ainda é pouco explorada e que as possibilidades biotecnológicas de aplicação das BAL isoladas dessa matriz alimentar são diversas.

## REFERÊNCIAS

- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infections. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579–588, 2017.
- ADAGRO. (2018). Agency for Agricultural Defense and Inspection. Law n. 16312, January 11th, 2018. Provides information about the production of artisanal cheese. Retrieved from <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=355402>> Accessed May 2021.
- ADEPARÁ. (2013). State Agency for Agricultural Defense of Pará State. Ordinance n. 418, February 26th, 2013. Approves the technical regulation for production of Marajo Cheese and provides other measures. Retrieved from <<http://www.adepara.pa.gov.br/sites/default/files/PORTARIA%20N%C2%BA%20418-2013%20-%20Queijo%20do%20Maraj%C3%B3.pdf>> Accessed May 2021.
- AHMAD, V.; KHAN, M.S; JAMAL, Q.M.S.; ALZOHAIRY, M.A.; KARAAWI, M.A.A.; SIDDIQUI, M.U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation.
- ALEXANDRE, A. P. S.; AQUINO, A. B. .; LYRA, D. G.; FROEHLICH, A. Queijo manteiga - contaminação microbiológica e risco à saúde do consumidor. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 2, p. 121–124, 2016.
- AMARANTE, J. O. A. (2015). Cheeses of Brazil and the world: For beginners and lovers (4th ed.). São Paulo: Mescla. 2015
- ANDRADE, C. R. G. et al. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. Isolated from minas artisanal cheese from serra da Canastra - MG | Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014.
- ANTONIO, M,B. de; BORELLI, B.M. A importância de bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020.
- BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. V.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. **Food Control**. v.32, n.1, p.134-142, 2013.
- BACHMANN, H. P. et al. Cheese: Raw Milk Cheeses. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 652–660, 2011.
- BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment 1. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611–3629, 2018.
- BRAZIL. (1996). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Technical Regulations

of Identity and Quality of Dairy Products. Ordinance n. 146, March 7th, 1996. Union Official Diary, Brasília, DF, 11 Mar. 1996, Section 1, p.3977, 1996. Retrieved from <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>.

BRAZIL. (2001). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction n. 30, June 26th, 2001. Technical Regulation of Identity and Quality of “Manteiga da Terra” or “Manteiga de Garrafa”, Curd Cheese and Butter Cheese. Union Official Diary, Brasília, DF, 16 Jul. 2001. Retrieved from <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2001,1039.html>

BRAZIL. (2011). Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply. Normative Instruction n. 57, December 15th, 2011. Union Official Diary, Brasília, DF, n. 241, Section 1, p.23. Retrieved from [http://www.lex.com.br/legis\\_24684623\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_30\\_DE\\_7\\_DE\\_AGOSTO\\_DE\\_2013.aspx](http://www.lex.com.br/legis_24684623_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_30_DE_7_DE_AGOSTO_DE_2013.aspx)

BROADBENT, J. R.; BUDINICH, M. F.; STEELE, J. L. Cheese: Non-Starter Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 639–644, 2011.

BORGES, L. et al. Protective effects of milk fermented by *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in BALB / c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 33, n. 2017, p. 436–445, 2020.

CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria : from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiol. Biotechnol.** 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, 2018a.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**, v. 92, p. 370–379, 2018b.

CARLOS GONÇALVES COSTA JÚNIOR, L. et al. Maturação Do Queijo Minas Artesanal Da Microrregião Campo Das Vertentes E Os Efeitos Dos Períodos Seco E Chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111, 2014.

CARNEIRO, J. DE O. et al. Artisan minas cheese of Serro: proteolysis during ripening. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04446, 2020.

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, p. 6086–6096, 2016.

CASTRO, R. D. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2098–2110, 2020.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2526–2535, 2017.

CERVA, C. et al. Food safety in raw milk production: Risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 5, p. 877–882, 2014.

CHAVES, A. C. S. D.; MONTEIRO, R. P.; MACHADO, R. L. P. Capítulo 4 - Processo de Produção do Queijo Minas Artesanal. p. 55–70, 2013

CHIKINDAS, M. L. et al. ScienceDirect Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

COELHO, M. C.; SILVA, C. C. G.; RIBEIRO, S. C.; DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; ROSA, H. J. D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53-59, 2014.

COGAN, T. M. Cheese: Public Health Aspects. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 645–651, 2011.

COOLBEAR, T.; WEIMER, B.; WILKINSON, M. G. Lactic Acid Bacteria: Lactic Acid Bacteria in Flavor Development. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 160–165, 2011.

COSTA JÚNIOR, L.C.G. et al. Maturação do queijo minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. Rev. Instituto Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.69, n.2, p.111-120, 2014.

CRUZ, B. E. V. DA et al. Redes sociais e preservação dos modos de produção de queijos artesanais da Ilha do Marajó, PA. **Redes**, v. 25, n. 2, p. 506–526, 2020.

CRUZ, B. E. V. DA; HESPANHOL, R. A. Indicação geográfica e queijos artesanais: marco legal e desafios a uma política para este segmento no Brasil. **Confins. Revue franco-brésilienne de géographie / Revista franco-brasileira de geografia**, n. 37, p. 1–16, 2018.

DA CRUZ, F. T.; MENASCHE, R. Tradition and diversity jeopardised by food safety regulations? The Serrano Cheese case, Campos de Cima da Serra region, Brazil. **Food Policy**, v. 45, p. 116–124, 2014.

DAS DORES, M. T.; DA NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. DE L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

DE CAMPOS AUSANI, T. et al. Microbiological quality of colonial cheese sold in Porto Alegre-RS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 639–650, 2019.

DE FILIPPIS, F. et al. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–11, 2016.

DE MEDEIROS, N. C. et al. Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 4, p. 1955–1962, 2017.

DJADOUNI, F.; KIHAL, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 3, p. 435–444, 2012.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. e9–e10, 2017.

DORES, M. T. DAS; FERREIRA, C. L. DE L. F. Queijo Minas Artesanal, Tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, p. 26–34, 2012.

EMBRAPA GADO DE LEITE. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Anuário do Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite**, n. 35 art, p. 104, 2019.

EVANGELISTA BARRETO, N. et al. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 55–67, 2016.

FERREIRA, A. A. et al. Tracking Amazonian cheese microbial diversity: Development of an original, sustainable, and robust starter by freeze drying/spray drying. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 9, p. 6997–7006, 2017.

FIGUEIREDO, E. L. et al. Queijo Do Marajó Tipo Creme: Parâmetros Físico-Químicos E Sensoriais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 26–33, 2011.

FIGUEIREDO, S. P. et al. Características do leite cru e do queijo Minas artesanal do Serro em diferentes meses. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, n. 1, p. 68–82, 2015.

FONTENELE, M. A. et al. Peptide profile of Coalho cheese: A contribution for Protected Designation of Origin (PDO). **Food Chemistry**, v. 219, p. 382–390, 2017.

FRAZILIO, A. et al. Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* from some artisanal Brazilian dairies. **International Dairy Journal**, 2018.

FUNCK, G. D.; HERMANN, G.; VICENZI, R.; SCHMIDT, J. T.; RICHARDS, N. S. P. S.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 3, p. 247–257, 2015.

GODOY-SANTOS, F., PINTO, M.S., BARBOSA, A.A.T. *et al.* Efficacy of a Ruminant Bacteriocin Against Pure and Mixed Cultures of Bovine Mastitis Pathogens. **Indian Journal Microbiology**. v. 59, p.304–312 2019.

GALVÉZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GOBBETTI, M. *et al.* Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. **Trends in Food Science & Technology**, 2018.

GONTIJO, M. T. P.; SILVA DE S. J.; VIDIGAL, M. P.; MARTIN, J.G. P. Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food Research International**, 2019.

GUAN, R.; WU, J.; XU, W.; SU, X.; HU, S. Efficacy of vaccination and nisin Z treatments to eliminate intramammary *Staphylococcus aureus* infection in lactating cows. **Biomed and Biotechnology**. v.18, n.4, p. 360-364, 2017.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, DA L.S.; SILVA-PEREIRA, S.; KYAW, C.M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers Microbiology**. v.4, 2013.

HEREDIA-CASTRO, P. Y.; HÉRNÁNDEZ-MENDOZA, A.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. **Interciencia**, v. 42, n. 6, p. 340-346, 2017.

HERNANDEZ-VALDES, J. A.; SOLOPOVA, A.; KUIPERS, O. P. Development of *Lactococcus lactis* Biosensors for Detection of Diacetyl. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2020.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A. *et al.* Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2041–2052, 2020.

IMA. (2006). Agricultural Institute of Minas Gerais. Ordinance n. 818, December 12th, 2006. Technical regulation for Minas artisanal cheese production and other measures. Retrieved from <[http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/338-portaria-no-818-de-12-de-dezembro-de-2006](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/338-portaria-no-818-de-12-de-dezembro-de-2006)>. Accessed May 2021.

IMA. (2018). Agricultural Institute of Minas Gerais. Ordinance n. 1837, July 9th, 2018. Provides physicochemical and microbiological parameters and standards for food of animal origin and water supply and revokes the IMA Ordinance N. 1651 of August 29th, 2016 and IMA Ordinance N. 1670 of October 29th, 2016. Retrieved from <[http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/3704-portaria-no-1837](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/3704-portaria-no-1837)>. Accessed May 2021.

IMA. (2020). INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Ordinance nº 2016. November 26th, 2020. Identifies the Serras da Ibitipoca Region as Producer of Minas Artesanal Cheese and Revokes IMA Ordinance No. 1834, of July 4, 2018. Retrieved from <

<http://www.ima.mg.gov.br/institucional/portarias#ano-2020>> Accessed May 2021.

INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL – IPHAN. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. **Certidão do Registro do modo artesanal de fazer queijo de Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre**. Data do Registro: 13 jun. 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2 p., 2008.

J. D'AMICO, D.; DONNELLY, C. W. **Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese**. Fourth Ed. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 1

JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4729–4746, 2018.

JOHNSON, E. M.; JUNG, Y.; JIN, Y. Bacteriocins as food preservatives : Challenges and emerging horizons. v. 8398, n. September, 2017.

JOHNSON, M. E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9952–9965, 2017.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019a.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, n. December 2018, p. 40–49, 2019b.

KAMIMURA, B. A. et al. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, n. November 2019, p. 103453, 2020.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. B. REVIEW ARTICLE BOVINE MASTITIS: A REVIEW. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 4, p. 543–548, 2013.

KUNİYOSHI, M. et al. Antimicrobials for food and feed ; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Microbiology**, p. 160–167, 2020.

LEITE, A. I. N. et al. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for the rapid detection of adulterations in butter cheeses. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 109, n. April, p. 63–69, 2019.

LIMA, C.P de. et al. Queijo coalho como fonte de bactérias ácido lácticas probióticas. **Research, Society and Development**, v.9, n.8, 2020.

LIMA, R. DE S. Queijo Minas artesanal: impasses e trajetórias vivenciadas pelos produtores rurais para manter uma cultura tradicional. In REUNIÃO BRASILEIRA DE ANTROPOLOGIA, 29, 2014, NATAL. Disponível em <[http://www.29rba.abant.org.br/resources/anais/1/1401979833\\_ARQUIVO\\_QUEIJOMINASARTESANALIMPASSESETRAJETORIASVIVENCIADASPELOSPRODUTORESURAISSPARAMANTERUMACULTURATRADICIONAL.pdf](http://www.29rba.abant.org.br/resources/anais/1/1401979833_ARQUIVO_QUEIJOMINASARTESANALIMPASSESETRAJETORIASVIVENCIADASPELOSPRODUTORESURAISSPARAMANTERUMACULTURATRADICIONAL.pdf)>.

LUIZ, L. M. P. et al. Aislamiento e identificación de las bacterias ácido-lácticas del queso brasileño Minas artesanal. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125–128, 2017.

LYNCH, K. M. et al. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages : Isolation , Properties , Characterization , and Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.9, p. 155-76. 2018.

MARGALHO, L. P. et al. *Enterococcus* spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. **Food Control**, v. 118, p. 107425, 2020a.

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. **The Lancet**, 2020b.

MARGALHO, L. P. et al. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. **Microbiological Research**, v. 242, n. 20, 2021.

MARTINS, J. M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219–230, 2015.

MARTINS, M. C. DE F. et al. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295–300, 2018.

MATERA, J. et al. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Research International**, v. 108, n. March, p. 18–26, 2018.

MATO GROSSO DO SUL. (2004). Law n. 2820, May 4th, 2004. Provides information about the production process of artisanal Caipira cheese. Retrieved from [http://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-2820-2004-ms\\_136596.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-2820-2004-ms_136596.html)

MEDEIROS, M. DE L.; HORODYSKI, G. S.; PASSADOR, J. L. Souvenirs gastronômicos na percepção do turista: o caso do queijo minas artesanal do serro. **Revista Brasileira de Pesquisa em Turismo**, v. 11, n. 2, p. 347–364, 2017.

MAYO, B., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., FERNÁNDEZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZMARTÍN, P., BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. **Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications**. p 3-33, 2010.

MEDEIROS, R. S. et al. Identificación de bacterias lácticas aislado de queso Coalho artesanal producidos en el Nordeste Brasileño. **CYTA - Journal of Food**, v. 14, n. 4, p. 613–620, 2016.

MEHLI, L. et al. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **International Dairy Journal**, v. 65, p. 20–27, 2017.

MELINI, F. Raw and Heat-Treated Milk : From Public Health Risks to Nutritional Quality.

**Beverages**, p. 1–33, 2017.

MENG, Z. et al. Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, p. 1–10, 2018.

MONTEL, M. C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; PAUS-DELBES, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIRES, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits, **International Journal of Food Microbiology**. v. 177, p. 136- 154, 2014.

MONTEIRO, R. P.; MATTA, V. M. DA. **Queijo Minas Artesanal: Valorizando a agroindústria familiar**. 2018. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199625/1/Livro-Queijo-Minas-Artesanal-Ainfo.pdf>>

MOZZI, F. Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 501–508, 2015.

MURPHY, S. C. et al. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 10128–10149, 2016.

MINAS GERAIS. (2008). Law n. 44864, August 1<sup>st</sup>, 2008. Changes the Regulation of the Law n. 14185, January 31<sup>st</sup>, 2002, which provides information about the production process of Minas artisanal cheese. Retrieved from [http://www.normasbrasil.com.br/norma/decreto-44864-2008-mg\\_141137.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/decreto-44864-2008-mg_141137.html)

NAZARÉ COSTA SEIXAS, V. et al. Caracterização Do Queijo Do Marajó Tipo Creme Em Duas Estações Do Ano: Aspectos Físico-Químicos E Microbiológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 89, 2014a.

NAZARÉ COSTA SEIXAS, V. et al. Diagnóstico Socioeconômico Dos Produtores De Queijos Do Marajó. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 309, 2014b.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

OLIVEIRA, A. L. et al. Caracterização do Queijo Minas Artesanal do Cerrado mineiro da região do Alto Paranaíba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences** - v. 03, p. 824–828, 2017.

OLIVEIRA, L.G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. 2014. Dissertação (mestrado em Ciência Animal – Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

ONICIUC, E. A. et al. Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. **Trends in Food Science and Technology**, v. 61, p. 49–59, 2017.

PARRA HUERTAS, R. Review. Bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos.

**Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA**, v. 8, n. 1, p. 93–105, 2010.

PELLEGRINO, M. S. et al. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.11, p. 74–84, 2019.

PENG, K. et al. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, n. July, p. 109544, 2020.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications and prospects. **Frontiers in Microbiology**. v.9, n.2085, 2018.

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.

PINTO, M.S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológico do queijo minas artesanal do Serro**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

PINTO, M. S. et al. Segurança Alimentar Do Queijo Minas Artesanal Do Serro , Minas Gerais, Em Função Da. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009.

PINTO, M. S. et al. Características Físico-Químicas E Microbiológicas Do Queijo Artesanal Produzido Na Microrregião De Montes Claros – Mg. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 43, 2017.

RAFAEL, V. da C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo minas artesanal da serra da Canastra**. 2017. 138f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

RESENDE, M<sup>a</sup>. F. S. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIO GRANDE DO SUL. (2016). Law n. 14.973 of December 29th, 2016. Provides on the production and commercialization of artisanal cheese, in the State of Rio Grande do Sul. Union Official Diary, Brasília, DF, 30 Dec 2016. Retrieved from <<http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/LEI%2014.973.pdf>>. Accessed May 2021.

ROLDAN, B. B.; REVILLION, J. P. P. Convenções de qualidade em queijos artesanais no Brasil, Espanha e Itália. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 74, n. 2, p. 108–122, 2019.

SÁ, J. P. N. DE et al. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista brasileira de Gestão Ambiental**, v. 12, n.

1, p. 1–13, 2018.

SANTA CATARINA. (2018). Santa Catarina State Department of Agriculture and Fisheries - SAR. Ordinance n. 32, November 7th, 2018. Approves the Internal Regulation about Colonial Cheese in the State of Santa Catarina. Retrieved from <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=369194>>. Accessed May 2021.

SANT'ANNA, F. M. et al. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v. 82, n. February, p. 349–362, 2019.

SEIXAS, V. N. C. et al. Caracterização do Queijo do Marajó tipo manteiga produzido em duas estações do ano. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 4, p. 730–736, 2015.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691–697, 2010.

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, n. April, 2018.

SILVA, J.G. **Características físicas, físico-químicas e sensoriais do Queijo Minas Artesanal da Canastra**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

SILVA, J.G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. 2016. Pós-graduação em Ciência Animal - Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SILVA, R. A. et al. Can artisanal “coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1533–1538, 2012.

SIMÕES, M. G. et al. Seasonal variations affect the physicochemical composition of buffalo milk and artisanal cheeses produced in Marajó Island (Pa, Brazil). **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 81–91, 2014.

SOARES, E. K. B. et al. What are the cultural effects on consumers' perceptions? A case study covering coalho cheese in the Brazilian northeast and southeast area using word association. **Food Research International**, v. 102, n. August, p. 553–558, 2017.

SOBRAL, D. et al. Principais Defeitos Em Queijo Minas Artesanal: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108–120, 2017.

SUÁREZ, N. et al. Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 335, p. 108894, 2020.

TAPONEN, S. et al. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 100,

n. 1, p. 493–503, 2017.

UN-FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Dairy market review, March 2020. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, n. March, p. 1–15, 2020.

VANNIYASINGAM, J. , KAPILAN, R. AND VASANTHARUBA, S. Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from cow milk and milk products. **AGRIEAST**, v. 13, n. 1, p. 32–43, 2019.

VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ, V. et al. Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. **Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time**, 2019.

WEJUN LIU, HUILI PANG, HEPING ZHANG and YIMIN CAI. Biodiversity of lactic acid bacteria. **Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice**, c.2, p. 1-535, 2014.

WILKINSON, J.; CERDAN, C.; DORIGON, C. Geographical Indications and “Origin” Products in Brazil – The Interplay of Institutions and Networks. **World Development**, v. 98, p. 82–92, 2017.

WILKINSON, M. G.; LAPOINTE, G. Invited review: Starter lactic acid bacteria survival in cheese: New perspectives on cheese microbiology. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 10963–10985, 2020.

WORSZTYNOWICZ, P. et al. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry. **The Journal of the Polish Biochemical Society and of the Polish Academy of Sciences**, v. 66, n. 1, p. 61–69, 2019.

YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–10, 2014.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, 2782–2858, 2020.

## CAPÍTULO 2. PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS GENETICAMENTE DINSTINTAS DE QMA DA SERRA DA CANASTRA E DO SERRO PARA CONSTRUÇÃO DE COLEÇÃO COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

### Resumo

O QMA é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, destacando-se como regiões produtoras a Serra da Canastra e o Serro. Alguns fatores contribuem para o reconhecimento e autenticidade destes queijos, dentre eles a diversidade de BAL provenientes majoritariamente do leite cru e do pingo. Este grupo produz compostos que conferem características sensoriais e microbiológicas desejáveis aos QMA. Diante da diversidade de BAL em QMA, bem como da produção de compostos promissores do ponto de vista industrial por elas produzidos, o objetivo deste estudo foi prospectar BAL geneticamente não redundantes de QMA da Serra da Canastra e do Serro. Para tal, foram coletadas, de forma aleatória, amostras de QMA de ambas as regiões, a partir das quais fez-se o isolamento de BAL em ágar MRS e ágar M17. Os isolados foram caracterizados fenotipicamente (morfologia, coloração de Gram e teste da catalase) e molecularmente por rep-PCR (GTG)<sup>5</sup>. Isolados em forma de bacilos e cocobacilos foram avaliados por PCR (*primers* LbLMA1-rev e R16-1) quanto à presença de um fragmento de DNA de 250 pb específico do gênero *Lactobacillus*. Um total de 500 microrganismos foram isolados, sendo 380 (76%) identificados presuntivamente como BAL. Destes, 40 são cocos (37,5% isolados no ágar MRS e 62,5% no ágar M17), 225 bacilos (70,2% isolados no ágar MRS e 29,7% no ágar M17) e 115 cocobacilos (47,8% isolados no ágar MRS e 52,2% no ágar M17), gram-positivos e catalase negativos. De 225 exemplares caracterizados como bacilos e de 115 em forma de cocobacilos, 172 (76,44%) e 34 (29,57%), respectivamente, foram identificados por PCR gênero específico como *Lactobacillus* spp.. A partir de análises de impressões digitais de DNA dos isolados utilizando o software Bionumerics, 180 cepas geneticamente distintas foram identificadas (106 bacilos, 52 cocobacilos e 22 cocos; 103 *Lactobacillus*). Os resultados evidenciaram a diversidade genética de BAL isoladas de QMA, mesmo entre cepas as identificadas como *Lactobacillus*. Estas constituirão uma coleção de culturas de BAL para exploração biotecnológica, com foco na viabilização do uso dessas culturas diretamente no ambiente produtivo em indústrias alimentícias, ou até mesmo como biofábricas de moléculas bioativas.

## 1. INTRODUÇÃO

Os Queijos Minas Artesanais (QMA) são classificados como queijos de massa prensada, não cozida e casca natural, e são produzidos em diferentes regiões do estado de Minas Gerais de acordo com tradições culturais e históricas da região de origem (AMARANTE, 2015). Dentre as regiões reconhecidas como produtoras de QMA, destacam-se a Serra da Canastra e o Serro, uma vez que possuem o modo artesanal de fazer queijo Minas registrado no “Livro de Registro de Saberes” pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), além do selo de Indicação Geográfica (IG) (CRUZ; HESPANHOL, 2018; IPHAN, 2008).

Alguns fatores contribuem para a autenticidade desses QMA, como clima ameno, altitude elevada, pastos nativos, águas serranas, leite integral de vaca fresco e cru e uso do pingo (fermento endógeno obtido do dessoramento dos queijos fabricados no dia anterior). As BAL presente no leite cru e no pingo constituem a microbiota dos QMA e também contribuem para a autenticidade desses queijos. A diversidade microbiana do produto depende das condições edafoclimáticas, que variam entre cada região produtora (AMARANTE, 2015; CASTRO et al., 2016; PERIN et al., 2017; SANT’ANNA et al., 2019).

O grupo das BAL é heterogêneo e inclui gêneros de bactérias filogeneticamente próximas e que compartilham algumas características fisiológicas, principalmente a fermentação homo ou heterofermentativa de açúcares, sendo o ácido láctico o principal produto resultante. Este grupo é formado por bactérias Gram-positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos, baixo conteúdo G-C, ácido-tolerantes, anaeróbias facultativas e, geralmente, não possuem motilidade (com exceção de algumas espécies de *Lactobacillus*). A heterogeneidade do grupo pode ser observada na diversidade morfológica, podendo se apresentar na forma de cocos ou bacilos; células isoladas, organizadas em cadeias curtas ou longas, aos pares ou em tétrades. Seu habitat natural consiste em ambientes ricos em nutrientes, devido à deficiência de vias biossintéticas, bem como à necessidade de ricas fontes de carbono e nitrogênio (BROADBENT; BUDINICH; STEELE, 2011; FIGUEIREDO et al., 2016; MOZZI, 2015; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). A elevada exigência nutricional faz com que as BAL estejam associadas principalmente a matérias-primas animais e vegetais, com destaque para os produtos lácteos, especialmente queijos (DOMINGOS-LOPES et al., 2017; SZUTOWSKA, 2020; YU; LEVEAU; MARCO, 2020).

A diversidade de BAL de QMA da Serra da Canastra e do Serro tem sido objeto de estudos, os quais destacam os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* (ARCURI et al., 2013; KAMIMURA et al., 2019a, 2019b, 2020; MARGALHO

et al., 2020b; PERIN et al., 2017). Ao fermentarem os carboidratos da matriz, a microbiota do QMA produz uma série de compostos com atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem inibir microrganismos deterioradores, bem como bactérias patogênicas; podem, ainda, apresentar um potencial efeito probiótico (CASTRO et al., 2016; KAMIMURA et al., 2019a; MARGALHO et al., 2020b). Dessa forma, BAL apresentam diferentes possibilidades quanto à sua exploração biotecnológica (MOZZI, 2015; PENG et al., 2020; SANLIBABA; ÇAKMAK, 2016).

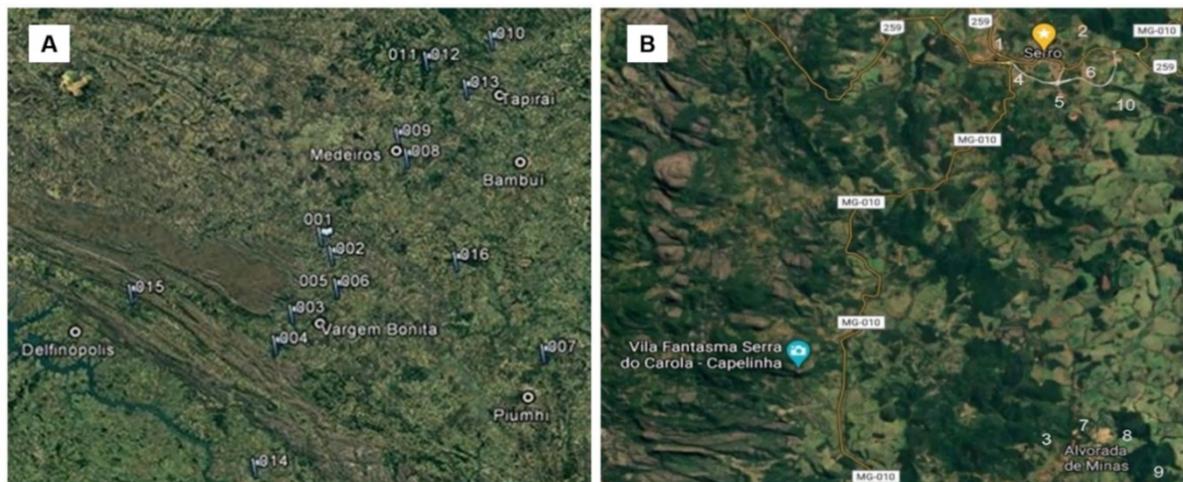
Diante da diversidade de BAL em QMA, bem como da produção de compostos promissores do ponto de vista industrial, o presente estudo objetivou prospectar BAL geneticamente não redundantes de QMA da Serra da Canastra e do Serro. Os isolados obtidos constituirão uma coleção de culturas de BAL visando à futura exploração biotecnológica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta de amostras de QMA

Em outubro de 2019, foram coletadas, de forma aleatória, amostras de QMA recém-produzidos em 16 propriedades da Serra da Canastra, Minas Gerais, conforme indicações na Figura 1A; em janeiro de 2020, foram coletadas amostras provenientes de 10 diferentes propriedades da região do Serro, Minas Gerais, indicadas na Figura 1B . As coletas foram realizadas de forma asséptica e apenas 1 amostra por propriedade foi coletada (Tabela 1). Os queijos foram mantidos sob refrigeração durante todo o transporte para o laboratório, onde também foram mantidos sob refrigeração até o início das análises.

Figura 1 – Mapa em satélite dos locais de coleta na Serra da Canastra (A) e Serro (B).



Fonte: Google Maps

Tabela 1 – Informações sobre as propriedades produtoras de QMA (Serra da Canastra e Serro) onde as coletas foram realizadas.

<b>Propriedade</b>	<b>Município</b>	<b>Cadastro junto ao IMA?</b>
<b>Serra da Canastra</b>		
1	São Roque de Minas	Sim
2	São Roque de Minas	Sim
3	Vargem Bonita	Não
4	Vargem Bonita	Não
5	São Roque de Minas	Não
6	São Roque de Minas	Sim
7	Piumhi	Não
8	Medeiros	Sim
9	Medeiros	Sim
10	Córrego D'Anta	Não
11	Tapiraí	Sim
12	Medeiros	Sim
13	Tapiraí	Sim
14	Bambuí	Sim
15	São João Batista do Glória	Em andamento
16	Delfinópolis	Sim
<b>Serro</b>		
17	Serro	Sim
18	Serro	Sim
19	Alvorada de Minas	Sim
20	Serro	Sim
21	Serro	Sim
22	Serro	Sim
23	Alvorada de Minas	Sim
24	Alvorada de Minas	Sim
25	Alvorada de Minas	Sim
26	Serro	Sim

## 2.2. Isolamento de BAL das amostras de QMA

Inicialmente, porções de 10 g de diferentes partes do QMA, recém transportados ao laboratório, foram assepticamente retiradas e homogeneizadas junto a 90 ml de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) em homogeneizador tipo Stomacher durante 5 minutos. A essa mistura, que corresponde à diluição  $10^{-1}$ , foi acrescentado glicerol 30% v/v, sendo mantida a 4°C até a

realização das demais diluições. Diluições seriadas foram, então, preparadas, seguido de plaqueamento em profundidade em ágar MRS e incubação a 37°C por 48 horas em microaerofilia, e em ágar M17, com incubação a 30°C por 48 horas em microaerofilia. Após incubação, foram consideradas, para o isolamento, as maiores diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ), das quais foram selecionadas 10 colônias de cada amostra em cada um dos dois meios utilizados, baseando-se nas diferenças de morfologia das colônias (as de BAL são brancas, pequenas, arredondadas ou ovaladas, bordas regulares, aspecto cremoso). Estas foram inoculadas em tubos contendo caldo MRS para enriquecimento, incubados a 37°C por 24-48 horas, em condições de microaerofilia. Posteriormente, foi realizada coloração de Gram, para observação da forma, arranjo celular e avaliação de pureza genética aparente. Para as culturas com características esperadas, mas apresentando mais de um tipo morfológico, foi realizado re-isolamento por estria composta, e novo procedimento de coloração de Gram para as colônias selecionadas. Havendo apenas um tipo morfológico, foi realizado teste da catalase; no caso de resultado negativo, os isolados foram estocados em caldo MRS acrescido de glicerol 30% (v/v) a -20°C até o momento das análises posteriores.

### 2.3. Avaliação de BAL quanto à redundância genética

A fim de se evitar o uso de linhagens geneticamente redundantes, foi feita uma triagem molecular com as BAL isoladas utilizando-se rep-PCR (GTG)<sub>5</sub>, de acordo com Almeida (2014), com adaptações. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 2 mM de cada iniciador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,06 U/µL de *Taq* DNA Polimerase (Promega) e o DNA molde foi obtido de células bacterianas de uma colônia isolada de BAL cultivada em ágar MRS conforme indicado no item 2.2. Os produtos de amplificação foram obtidos da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguida por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 40°C por 1 min, extensão a 65°C por 8 min, e uma etapa de extensão final de 10 min a 65°C. Após amplificados, 7 µL da reação foram aplicados em gel de agarose 0,8% e submetidos à eletroforese por aproximadamente 2 horas em 60 volts para ser gerado um *fingerprint*. O gel foi corado com brometo de etídio (0,01%) por 10 minutos e fotodocumentado sob luz ultravioleta. Em seguida, as imagens dos géis foram capturadas e armazenadas para análise e construção de dendrogramas utilizando o software Bionumerics V. 6.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) para análise por comparação dos *fingerprints* gerados. Os valores de similaridade genética são calculados pelo coeficiente

de Pearson e estes foram utilizados para gerar um dendrograma de similaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). A partir da análise de Pearson, foi estabelecido um limite mínimo de 90% de similaridade ( $\geq 90\%$ ), para que as amostras clusterizadas a partir desta porcentagem fossem consideradas de mesma linhagem.

#### **2.4. Identificação molecular de bacilos e cocobacilos para enquadramento ao gênero *Lactobacillus***

Para enquadramento de bacilos e cocobacilos no gênero *Lactobacillus*, foi realizado o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônias, para a amplificação de uma sequência espaçadora de 250 pb conservada entre os genes rRNA 16S e 23S de cepas de diferentes espécies de *Lactobacillus* (DUBERNET, DESMASURES, GUÉGUEN, 2002). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') e R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3'). A amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems modelo Veriti) e a mistura de reação (25  $\mu$ l) continha 25 pmol de cada iniciador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (Promega), tampão de PCR 1  $\times$  sem MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Promega) e o DNA molde foi obtido de células bacterianas de uma colônia isolada de BAL cultivada em ágar MRS, com as condições descritas no item 2.2. Como controle positivo foi utilizado *Lactocaseibacillus casei* e como controle negativo, a reação acrescida de 1  $\mu$ l de água miliq. Fragmentos de DNA foram amplificados da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 20 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s, e uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos foram armazenados a -20°C até o momento da corrida eletroforética. Alíquotas (10  $\mu$ l) dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1% (grau de eletroforese, Invitrogen) (120 V, 2 horas) em tampão TBE 1X (90 mM Tris base, 90 mM ácido bórico e 0.1 mM EDTA, pH 8,3). Os géis foram corados com brometo de etídio (5  $\mu$ gml<sup>-1</sup>) e visualizados sob luz ultravioleta e suas imagens registradas utilizando fotodocumentador LPIX-EX (Loccus Biotecnologia, Brasil).

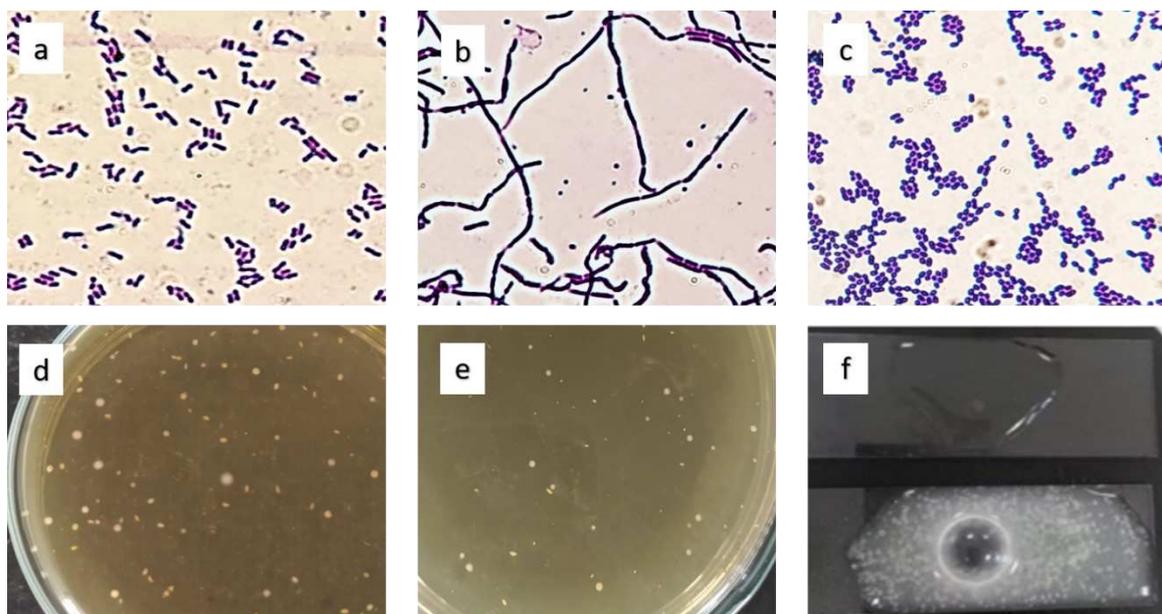
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Características fenotípicas dos isolados

O QMA é considerado uma matriz alimentar rica em BAL, cuja microbiota é influenciada pelo ambiente de ordenha e produção, localização geográfica da fazenda produtora, condições climáticas, além de aspectos do processo produtivo. Estes incluem o uso do pingo, o cozimento da coalhada, a adição de sal e a maturação, que podem favorecer o crescimento de alguns gêneros de BAL em detrimento de outros (SANT'ANNA, 2019; KAMIMURA et al., 2019a). Tal fenômeno se deve às diferentes condições de estresse, tais como estresse osmótico, térmico, ácido, hídrico e até mesmo nutricional, no decorrer da produção e maturação, além da competição com outros grupos de microrganismos. Desta forma, ocorre a sucessão microbiana e, então, alguns gêneros de BAL podem estar mais presentes nos QMA e, conseqüentemente, ser mais facilmente isolados que outros (ANTÔNIO; BORELLI, 2020; MAYO et al., 2021).

Para isolamento e cultivo de BAL, os meios ágar MRS e ágar M17 são os mais comumente utilizados. Neste trabalho, características fenotípicas foram utilizadas na seleção de BAL a partir dos isolados, incluindo formas, arranjos e teste da catalase (Figura 2).

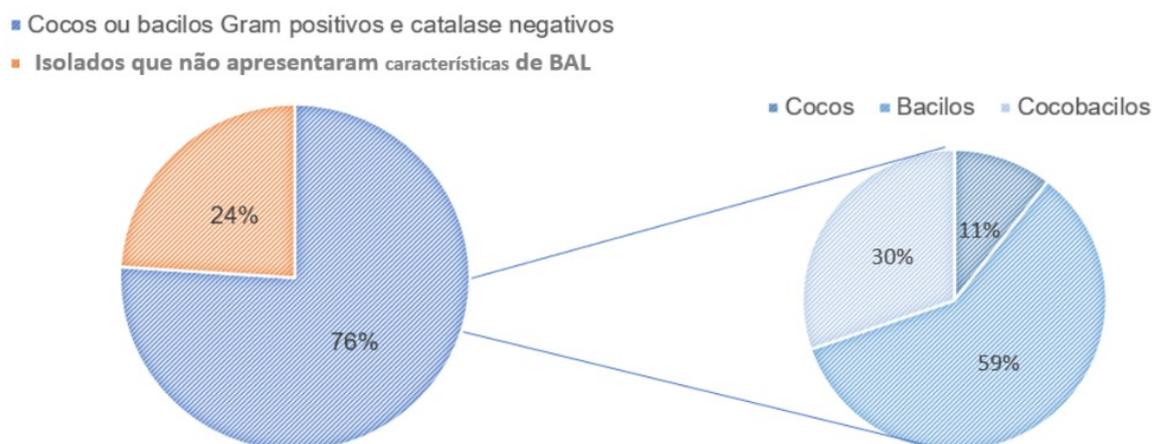
Figura 2 – Características fenotípicas observadas de isolados de BAL de QMA.



Legenda: a, b e c) Lâminas com arranjos celulares Gram-positivas, com forma de cocobacilos, bacilos e cocos (da esquerda para a direita); d) colônias isoladas em ágar MRS; e) colônias isoladas em ágar M17; f) teste da catalase: negativo (lâmina superior) e positivo (lâmina inferior).

Dentre os 500 isolados obtidos do cultivo em ágar MRS e M17 (250 em cada meio), 380 (76 %) apresentaram-se como cocos, cocobacilos ou bacilos gram-positivos e catalase negativos, características do grupo das BAL; 120 (24 %) isolados apresentaram características morfológicas atípicas (Figura 3). Dos 380 isolados com as características apropriadas, 225 (59,21 %) se apresentaram na forma de bacilos, 115 (30,26 %) na forma de cocobacilos (bacilos curtos) e 40 (10,53 %) na forma de cocos (Figura 3). Os isolados identificados como bacilos e cocobacilos podem pertencer aos gêneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium* ou *Weissella*. Já os isolados identificados como cocos podem pertencer aos demais gêneros de BAL (*Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*), incluindo *Weissella*, que pode também se apresentar na forma de cocos (MOTTA, GOMES, 2015; MOZZI, 2015).

Figura 3 – Proporção dos microrganismos isolados em ágar MRS e M17 considerando-se suas características morfológicas.

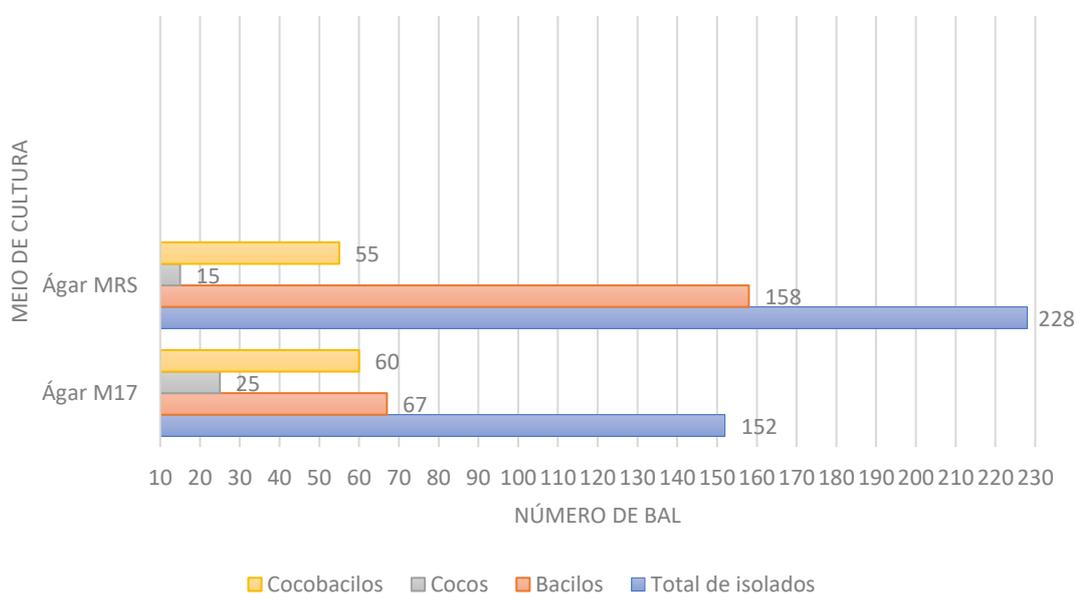


Dos 380 isolados com características de BAL, 228 foram obtidos do cultivo em ágar MRS e 152 em ágar M17 (Figura 4). Tal dado demonstra uma perda de 20 % dos isolados quando o isolamento é realizado em ágar M17. Os meios MRS e M17 são indicados para isolamento e cultivo de *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* / *Lactobacillus* / *Streptococcus* spp., respectivamente. No entanto, é possível isolar diferentes gêneros de BAL em ágar MRS e M17, uma vez que são meios ricos em uma diversidade de nutrientes (HIMEDIA LABORATORIES, 2019a, 2019b). Sendo assim, acredita-se que, de forma geral, o isolamento de BAL pode ser feito em apenas um dos meios, a fim de otimizar custos e tempo. Mas para confirmar isso,

estudos relacionados à seletividade dos meios devem ser realizados. Quando o isolamento de BAL tiver como objetivo obter cepas de *Streptococcus thermophilus*, indica-se o uso do ágar M17 devido à alta concentração de di-sódio-glicerofosfato, que atua como agente tamponante, mantendo o pH acima de 5,7, o que é requerido para o isolamento dos mesmos (HIMEDIA LABORATORIES, 2019b).

Os bacilos obtidos nesse trabalho foram em sua maioria isolados em ágar MRS (70,2 %) e os cocos em ágar M17 (62,5 %) (Figura 4). Resende et al (2011), ao isolarem BAL da Serra da Canastra em ágar MRS e ágar M17, obtiveram padrão de resultados semelhante, uma vez que os gêneros *Lactobacillus* e *Weissella* que apresentam forma de bacilo foram isolados em ágar MRS, enquanto que *Enterococcus* e *Lactococcus* (cocoídes) foram isolados em ágar M17. Embora a quantidade de cocos com características de BAL isolados em ágar M17 seja significativa (62,5 %), a porcentagem de cocos isolados neste trabalho foi relativamente baixa (10,53%) ao ser comparada com a quantidade de bacilos (59,21%) e cocobacilos (30,26 %).

Figura 4 – Número e morfologia de BAL isoladas em ágar MRS e ágar M17.



BAL cocoídes que são frequentemente isoladas de QMA pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (KAMIMURA et al., 2019b). A baixa porcentagem de cocos isolados nesse trabalho pode estar atribuída a fatores como estresse osmótico e acidez. Por exemplo, BAL pertencentes ao gênero *Lactococcus* constituem parte da microbiota láctica

dos QMA considerada *starter*, pois acidificam o meio através da conversão da lactose em ácido láctico (RUVALCABA-GÓMEZ et al., 2021). Por crescerem em pH entre 6,0 e 6,5 e serem sensíveis ao sal, à medida que há acidificação do meio e a concentração de sal aumenta, acredita-se que os *Lactococcus* assumam o estado viável não cultivável (VNC). Desta forma, perdem a capacidade de crescerem e se multiplicarem em meios sintéticos, dificultando a detecção de cepas cultiváveis nos QMA analisados (ANTÔNIO; BORELLI, 2020; RUGGIRELLO; COCOLIN; DOLCI, 2016). Além disso, o ágar M17 apresenta alta eficiência para o isolamento de *Lactococcus* quando estes são abundantes e não estressados na matriz a ser analisada. No entanto, quando há abundância de *Lactobacillus*, estes prevalecem sob a população de *Lactococcus*, que sofrem estresse nutricional e têm dificuldade de crescer no ágar M17 (RUGGIRELLO; COCOLIN; DOLCI, 2016). Neste trabalho, a maioria das BAL isoladas possuem a forma de bacilos, podendo estas pertencerem ao gênero *Lactobacillus*, o que explicaria, em parte, a baixa prevalência de cocos isolados.

Os cocos isolados também podem pertencer ao gênero *Streptococcus* e *Enterococcus*, que diferentemente dos *Lactococcus*, toleram maiores quantidades de NaCl, de até 2,5 e 6 %, respectivamente (BRITO et al., 2020) Essa tolerância faz com estes microrganismos sejam capazes de permanecerem viáveis e cultiváveis quando submetidos às diferentes quantidades de sal, que podem estar presentes nos QMA (OLIVEIRA et al., 2017; SOARES, 2014). Apesar do gênero *Streptococcus* abranger mais de 50 espécies, apenas *Streptococcus thermophilus* é capaz de realizar fermentação. Esta também não é patogênica, possui resistência ao aquecimento, resistência a fagos e tem sido reportado que *Streptococcus* contribui para a fermentação da galactose, produção de aminoácidos essenciais e exopolissacarídeos. Portanto, dentre as BAL do gênero *Streptococcus*, essa é a espécie de interesse dos pesquisadores (ANTONIO, BORELLI, 2020; LIU et al., 2014; RUVALCABA-GOMÉZ et al., 2021).

O gênero *Enterococcus* é, por vezes, a BAL predominante no QMA (CASTRO et al., 2016; KAMIMURA et al., 2019a; KAMIMURA et al., 2020). Tal fato pode estar associado não só à tolerância ao sal, mas também à atividade antagonista contra patógenos presentes nos queijos, atividade proteolítica e lipolítica, produção de diacetil, produção de ácidos, tolerância à altas temperaturas, entre outros, o que permite que permaneçam viáveis e se multipliquem com maior facilidade em diferentes matrizes alimentar (CAVICCHIOLI et al., 2017; MARGALHO et al., 2020).

Devido às características de *Enterococcus* citadas anteriormente, estes também têm sido alvo de pesquisas, podendo ser utilizados como cultura *starter*, bioconservantes, probióticos e culturas adjuntas para desenvolvimento de características organolépticas (ANTÔNIO e

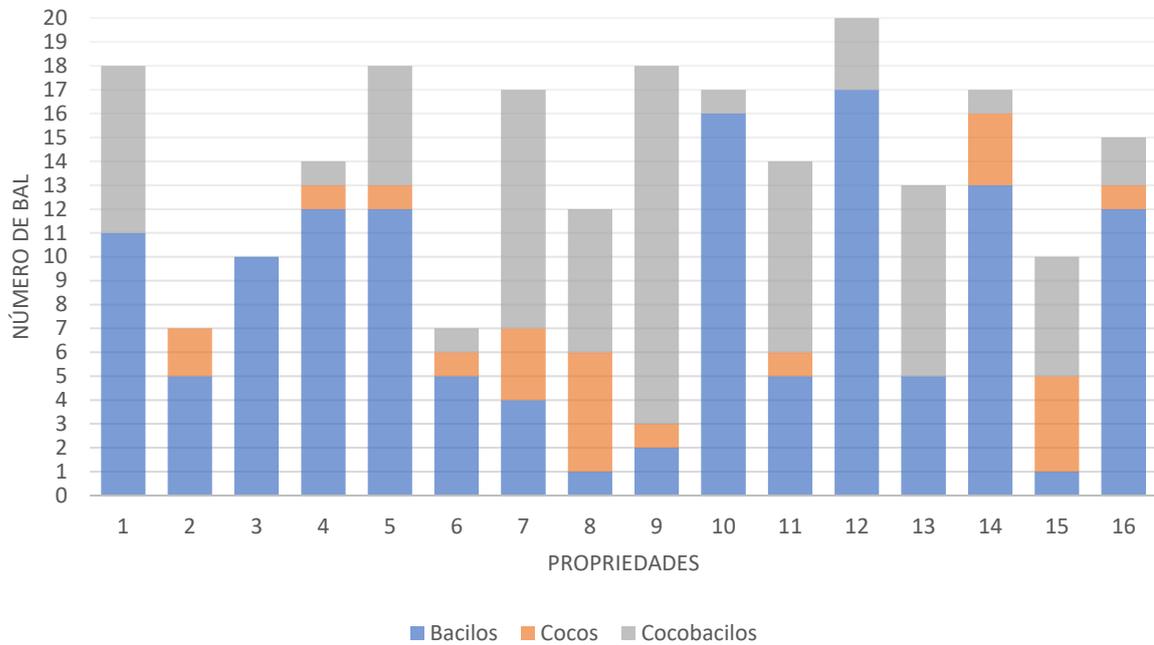
BORELLI, 2020; KUNIYOSHI et al., 2020; SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; SOUSA et al., 2020; VELÁSQUEZ- ORDOÑEZ et al., 2019). Porém, o uso de *Enterococcus* na indústria de alimentos é controverso, devido principalmente à resistência a diferentes antibióticos e à presença de genes que codificam fatores de virulência (BINTSIS, 2018; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018; WORSZTYNOWICZ, 2019).

Por outro lado, BAL em forma de bacilo mais frequentemente isoladas a partir de QMA pertencem ao gênero *Lactobacillus* (ALMEIDA et al., 2020; CASTRO et al., 2016; LUIZ et al., 2017; PERIN et al., 2017; RESENDE et al., 2011). Esta predominância pode estar relacionada à resistência ao sal e tolerância ao meio ácido (ANTONIO, BORELLI, 2020; RUVALCABA-GOMÉZ et al., 2021). Geralmente, os lactobacilos são divididos em três grupos, de acordo com o produto final da fermentação. O primeiro é formado por BAL homofermentadoras, como *L. delbrueckii* subespécies *lactis* e *bulgaricus*, e *L. helveticus*. O segundo inclui BAL heterofermentadoras facultativas, como *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. plantarum* subsp. *plantarum*. No terceiro estão as BAL heterofermentadoras obrigatórias, que são as responsáveis por produzir gás e compostos que resultam em sabores indesejáveis no queijo, durante a maturação; no entanto, esses lactobacilos ocorrem em menor frequência (ANTÔNIO, BORELLI, 2020).

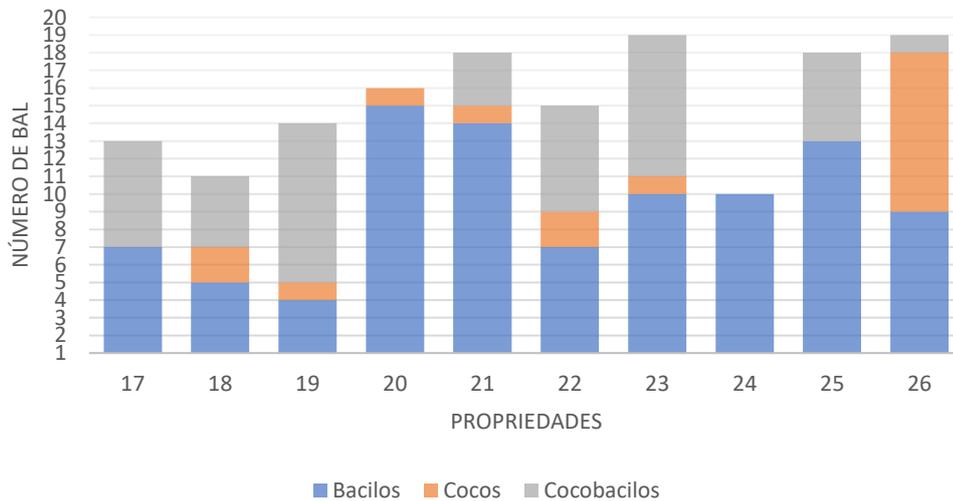
Ao analisar a morfologia dos microrganismos isolados de QMA da Serra da Canastra (Figura 5a) e do Serro (Figura 5b), observa-se que os bacilos e cocobacilos foram predominantes na maioria das propriedades. Sendo assim, pode-se supor que nos QMA analisados destas propriedades, somada às características de *Lactobacillus* e predominância desse gênero em trabalhos anteriores, há uma maior prevalência de BAL do gênero *Lactobacillus*. Apesar das BAL na forma de bacilos ou cocobacilos serem predominantes, há também ocorrência de cocos e a proporção de cada uma dessas formas varia entre cada propriedade, destacando a variabilidade da microbiota presente nos QMA entre as propriedades produtoras. A diversidade de BAL por propriedades de uma mesma região pode estar relacionada a diferentes aspectos, como peculiaridades do processo produtivo e maturação, fatores climáticos e ambientais (vegetação predominante, altitude, temperatura média, umidade relativa do ar) (KAMIMURA et al., 2019a, 2019b; PERIN et al., 2017). A interação da microbiota diversificada é que resulta em queijos com sabores, aromas e texturas únicas (BLAYA; BARZIDEH; LAPOINTE, 2018).

Figura 5 - Formas predominantes dos isolados de BAL de diferentes regiões do estado de Minas Gerais.

a) Região da Serra da Canastra



b) Região do Serro



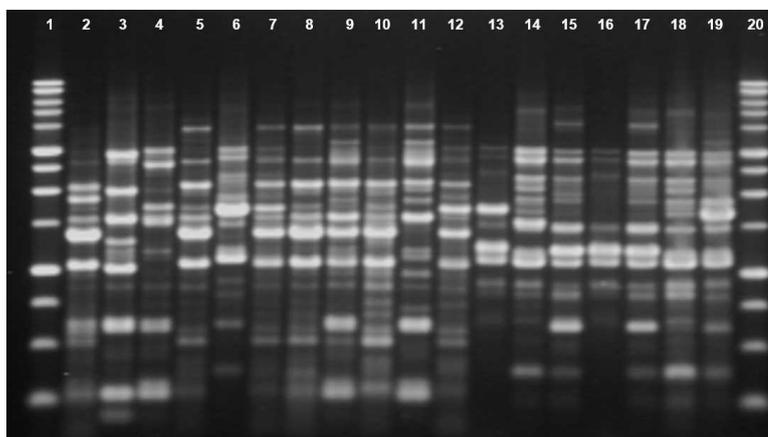
Além de BAL, outros grupos microbianos também foram isolados nos QMA avaliados (Figura 3). A característica predominante nos 120 isolados com características não típicas de BAL consistiu na produção de catalase, sendo 49 isolados (40,83%) positivos para este teste. Microrganismos catalase positivos frequentemente isolados de QMA da Serra da Canastra e do Serro correspondem principalmente a leveduras e bactérias do gênero *Staphylococcus* (ANDRADE, 2016; ANDRETTA et al., 2019; BORELLI et al., 2006, 2011; BRANT et al.,

2007; DAS DORES et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2015; KAMIMURA et al., 2019a, 2020; NOBREGA, 2007, 2012; OLIVEIRA, 2012; SANTOS, 2013). Estes são frequentemente isolados da pele e mucosas de animais e seres humanos, bem como de equipamentos e ambiente de ordenha e compreendem, portanto, um importante indicador de qualidade microbiológica (VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ et al., 2019). Quanto às leveduras, apesar de serem capazes de causar deterioração caracterizada pela produção de gás, alteração no sabor e aroma, descoloração e mudança de textura, podem contribuir para o desenvolvimento de sabor, aroma e textura dos queijos (NÓBREGA, 2008; SOBRAL et al., 2017).

### 3.2 Identificação e caracterização moleculares dos isolados de BAL

Os 380 isolados a partir dos meios MRS e M17 foram agrupados por meio da técnica de rep-PCR (Figura 6). A partir da análise dos perfis de DNA (*fingerprints*) obtidos, foi construído um dendrograma e os isolados foram clusterizados considerando-se 90% de similaridade ( $\geq 90\%$ ). Desta forma 180 padrões distintos foram encontrados (APÊNDICE I).

Figura 6 - Imagem representativa da triagem molecular dos isolados de BAL de QMA por rep-PCR (GTG)5.



Legenda: 1: marcador de peso molecular (1 kb, Promega); 2-19: isolados de BAL de QMA 460, 461, 462, 464, 465, 467, 468, 469, 470, 472, 473, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490; 20: marcador de peso molecular (1 kb, Promega).

Os dendrogramas identificam diferentes *clusters*, que fornecem informações a respeito da dinâmica e diversidade dos organismos inter e intraespécies (COCOLIN et al., 2011). Com a existência de 180 padrões de bandas distintos (106 bacilos, 52 cocobacilos e 22 cocos), é possível apontar a existência de uma importante diversidade clonal. Mesmo quando os isolados pertencem a uma mesma propriedade pode-se observar no dendrograma (APÊNDICE I) que

estes são agrupados em diferentes *clusters*, sendo possível inferir que há diversidade clonal dentre os isolados pertencentes a uma mesma propriedade.

Gevers, Huys e Swings (2001), ao construírem dendrogramas com os resultados obtidos de rep-PCR utilizando o primer (GTG)5 e DNA molde de BAL, procederam a diferenciação de espécies e subespécies a partir da distinção dos padrões de bandas gerados. Sendo assim, espera-se que os 180 padrões distintos gerados neste trabalho possam representar diferentes espécies e subespécies de BAL isoladas dos QMA avaliados. Pérez-Díaz et al. (2021), ao utilizarem rep-PCR também com o primer (GTG)5, obtiveram resultados de diversidade genética intraespécie. Assim, além da possibilidade de que os padrões de bandas distintos obtidos nesse trabalho representem espécies e subespécies distintas, ainda há a possibilidade de biodiversidade intraespecífica, evidenciando o amplo espectro de características biotecnológicas em potencial a serem exploradas futuramente na coleção de BAL constituída no presente trabalho.

Os 225 isolados presuntivamente identificados como BAL que apresentaram a forma de bastonete foram avaliados quanto ao enquadramento no gênero *Lactobacillus*. Essa identificação foi realizada diante da importância de *Lactobacillus* nas fermentações e na saúde de hospedeiros humanos e animais (SANDERS e LEBEER, 2020). O gênero *Lactobacillus*, de acordo com Zheng et al. (2020), é classificado no filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. Desta forma, estão inclusas nesse gênero 261 espécies bastante diversas nos níveis fenotípico, ecológico e genotípico. No geral, são microrganismos Gram-positivos, fermentativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Os representantes deste gênero são capazes de formar colônias em uma variedade de meios, incluindo o ágar MRS, cujas colônias apresentam-se brancas, geralmente mucoides (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015).

Dentre os 225 isolados, 172 (76,44%) amplificaram o fragmento de 250 pb, o que corresponde a um resultado positivo para a presença da região espaçadora conservada entre os genes rRNA 16S e 23S de diferentes espécies de *Lactobacillus*. Do total, 50 isolados (22,22%) não amplificaram o fragmento e, portanto, não foram identificados como *Lactobacillus*. Apenas 3 isolados (1,33%) apresentaram resultado inconclusivo. Os 115 cocobacilos também foram analisados e 34 (29,57%) foram identificados como *Lactobacillus*; 75 (65,22%) não corresponderam ao gênero e 6 (5,22%) apresentaram resultado inconclusivo. Do total de 380 isolados, portanto, 260 (68,42%) foram relacionados ao gênero *Lactobacillus* (Tabela 2). Uma imagem representativa dos resultados das ampliações está apresentada na Figura 7.

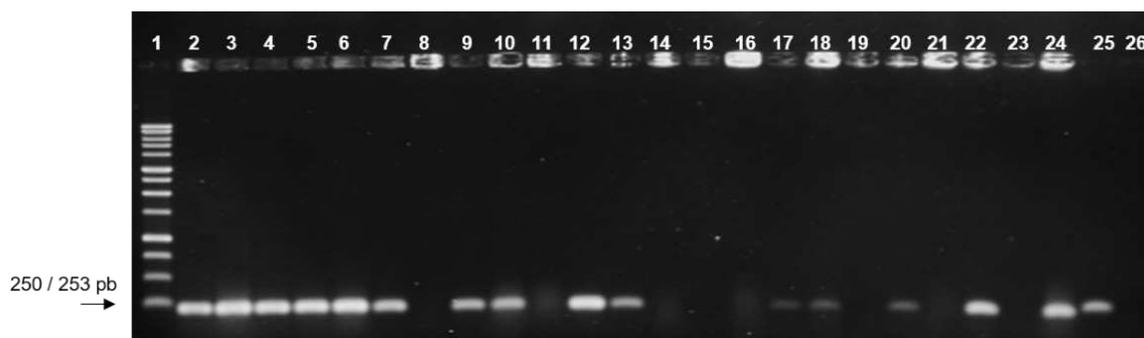
Tabela 2 – Resultado da PCR para identificação de isolados pertencentes ao gênero *Lactobacillus*.

Resultado da PCR	Morfologia dos isolados				Total
	Bacilos		Cocobacilos		
	Serra da Canastra	Serro	Serra da Canastra	Serro	
<i>Lactobacillus</i> +	95	77	21	13	206
<i>Lactobacillus</i> -	33	17	51	24	125
Inconclusivo	3	0	1	5	9
<b>Total</b>	131	94	73	42	340

Legenda: *Lactobacillus* +: Isolados a partir dos quais o fragmento de DNA de 250pb, específico do gênero *Lactobacillus*, foi amplificado;

*Lactobacillus* -: Isolados a partir dos quais o fragmento de 250pb, específico do gênero *Lactobacillus*, não foi amplificado.

Figura 7 – Identificação por PCR do gênero *Lactobacillus* spp. de BAL isoladas de QMA utilizando os primers LbLMA1-rev e R16-1. Imagem representativa.



Legenda das colunas: 1: marcador de peso molecular (1 kb ladder, Promega. De baixo para cima as bandas correspondem a fragmentos de DNA de 250/253, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 8.000 e 10.000pb); 2-24: culturas puras dos isolados de BAL de QMA (448, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 464, 465, 467, 468, 469, 470, 472, 473, 484); 25: Controle positivo da reação: 20 ng de DNA genômico de *Lactocaseibacillus casei*; 26: Controle negativo da reação. Reação de PCR acrescida de 1 µl de água miliq.

Dos 340 bacilos e cocobacilos, 206 (77,6%) foram identificados como *Lactobacillus*, sendo esse gênero predominante dentre os isolados da Serra da Canastra (56%) e do Serro (66,17%). Perin et al. (2017) analisaram QMA de diferentes regiões (Serro, Canastra, Serra do Salitre, Campo das Vertentes e Araxá) por métodos dependentes e independentes de cultivo e constataram que *Lactobacillus* foi o gênero predominante nos queijos. Kamimura et al. (2019a, 2019b) também demonstraram abundância de *Lactobacillus* entre QMA da Serra da Canastra; os autores atribuíram a isto a capacidade de bactérias desse gênero de crescer sob condições altamente seletivas observadas para esse tipo de produto, como baixo pH e concentrações elevadas de sal. Tais estudos sugerem que *Lactobacillus* não são apenas abundantes no QMA, mas também em queijos artesanais das demais regiões produtoras do Brasil. Almeida et al.

(2019) também demonstraram a predominância de *Lactobacillus* ao realizaram análise baseada nas características morfológicas de isolados obtidos do pingo e da “rala” utilizados na fabricação de QMA da região do Serro. Outros estudos também corroboram a predominância de *Lactobacillus* no QMA e até mesmo nos utensílios utilizados durante sua produção (GALINARI et al., 2014; NÓBREGA, 2012; RAFAEL, 2017; RESENDE et al., 2011).

Ao realizar a rep-PCR entre os isolados identificados como *Lactobacillus*, ainda há uma grande diversidade genética, visto que há 103 padrões distintos em clusters com similaridade  $\geq$  90%. A diversidade de padrões genéticos observada pode estar relacionada a fatores como as propriedades de origem dos QMA e às peculiaridades destes queijos, pois as BAL podem adquirir plasmídeos ou elementos genéticos móveis dependendo do ecossistema em que se encontram, resultando em diferentes características genéticas (CAVICCHIOLI, 2014; GUTIÉRREZ et al., 2010; MARTINS, 2018). Além disso, tem sido cada vez mais reconhecido que o gênero *Lactobacillus* exibe um nível de diversidade genética que excede em muito quando comparado a outros gêneros bacterianos e até mesmo em família de bactérias (ZHENG et al., 2020).

A diversidade genética existente entre os *Lactobacillus* culminou, recentemente, em um estudo de análises do genoma com abordagem polifásica, que resultou na dissolução de bactérias antes pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, em 25 gêneros, incluindo o gênero retificado *Lactobacillus*, que inclui organismos adaptados ao hospedeiro como o grupo *L. delbrueckii*; *Paralactobacillus* e 23 novos gêneros: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* ,e *Secundilactobacillus* (ZHENG et al., 2020).

Apesar da diversidade desse gênero observada em QMA da Serra da Canastra e do Serro, as espécies mais frequentemente encontradas correspondem a *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. brevis* e *L. paracasei* subsp. *paracasei* (BORELLI et al., 2006; PERIN et al., 2017; NOBREGA, 2012; RAFAEL, 2017; RESENDE et al., 2011). Dentre as NSLAB, o gênero é considerado um dos mais importantes em queijos, e desempenha papel importante na formação do aroma e sabor ao longo da maturação. A importância de *Lactobacillus* em QMA também tem sido atribuída ao potencial probiótico destas bactérias, pois são capazes de inibir *in vitro* bactérias de interesse em saúde pública, são tolerantes ao ácido gástrico e sais biliares e são sensíveis a antimicrobianos (ACURCIO et al., 2017

ANDRADE et al., 2014; BORGES et al., 2020 MARGALHO et al., 2021; VALENTE et al., 2019). Devido tais características, estudos têm sido realizados com foco nas aplicações biotecnológicas de estirpes de *Lactobacillus*, cujas principais vantagens compreendem a facilidade de isolamento a partir de diferentes produtos (incluindo-se o QMA), além de possuírem extensos registros de uso seguro, sendo geralmente reconhecidas como GRAS (CAMPAGNOLLO et al., 2018a).

Para que a aplicação biotecnológica dos *Lactobacillus* seja viável, deve-se realizar, ainda, a identificação em nível de espécie, bem como adequação da nomenclatura segundo a taxonomia proposta por Zheng et al. (2020). Feita a identificação, devem ser realizados também estudos de inocuidade a fim de garantir a ausência de fatores de virulência, tais como a presença de genes de resistência à antibióticos, genes de produção de toxinas, entre outros (TODOROV, HOLZAPFEL, NERO, 2020).

#### 4. CONCLUSÕES

A partir deste estudo, foram obtidos 380 isolados de BAL provenientes de QMA de diferentes propriedades da Serra da Canastra e do Serro, com predominância de *Lactobacillus* spp. Além disso, os padrões distintos de bandas com similaridade acima ou igual a 90% obtidos a partir da triagem molecular possibilitaram a observação da diversidade genética existente entre esses isolados. Portanto, os QMA são fonte de uma diversidade de BAL com potencial de exploração tecnológica e os isolados obtidos nesse trabalho serão utilizados para a formação de uma coleção de culturas de BAL visando à futura exploração biotecnológica, com foco na viabilização do uso dessas culturas diretamente no ambiente produtivo em indústrias alimentícias, ou até mesmo como biofábricas de moléculas bioativas.

## REFERÊNCIAS

- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infections. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579–588, 2017.
- ALMEIDA, R.C. de. Caracterização bioquímica e genética de bactérias lácticas isoladas de queijo serrano. 2014. 68f. Dissertação (Programa de Pós graduação em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.
- ALMEIDA, T. T. DE et al. The complex microbiota of artisanal cheeses interferes in the performance of enumeration protocols for lactic acid bacteria and staphylococci. **International Dairy Journal**, v. 109, p. 104791, 2020.
- ANDRADE, R.P. Isolamento de leveduras do processo de produção do queijo da Canastra e avaliação do potencial de fermentação do soro de leite. 2016. 50f. Dissertação (Programa de Pós graduação em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.
- ANTONIO, M.B. de; BORELLI, B.M. A importância de bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020.
- AMARANTE, J. O. A. (2015). *Cheeses of Brazil and the world: For beginners and lovers* (4th ed.). São Paulo: Mescla. 2015
- ANDRETTA, M. et al. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10790–10798, 2019.
- ARCURI, E. F. et al. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR-DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 2013.
- BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures : An update in their metabolism and genetics. v. 4, n. August, p. 665–684, 2018.
- BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Symposium review : Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment 1. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3611–3629, 2018.
- BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1115–1119, 2006.
- BORELLI, B. M. et al. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of a traditional Minas cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 481–487, 2011.
- BORGES, L. et al. Protective effects of milk fermented by *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* B7 from Brazilian artisanal cheese on a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

- infection in BALB / c mice. **Journal of Functional Foods**, v. 33, n. 2017, p. 436–445, 2020.
- BRITO, L.P. de., et al. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho do nordeste brasileiro na produção de laticínios: Uma triagem para aplicação tecnológica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.
- BROADBENT, J. R.; BUDINICH, M. F.; STEELE, J. L. Cheese: Non-Starter Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 639–644, 2011.
- 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.
- CAVICCHIOL, V.Q. **Diferenciação genética e potencial bacteriocinogênico de bactérias lácticas isoladas de leite de cabra**. 2014. 87f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- 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, p. 6086–6096, 2016.
- CASTRO, R. D. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production process of Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentes, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2098–2110, 2020.
- COCOLIN, L.; DOLCI, P.; RANTSIOU, K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. **Meat Science**, v. 89, n.3, p. 296–302, 2011.
- CRUZ, B. E. V. DA; HESPANHOL, R. A. Indicação geográfica e queijos artesanais: marco legal e desafios a uma política para este segmento no Brasil. **Confins. Revue franco-brésilienne de géographie / Revista franco-brasilera de geografia**, n. 37, p. 1–16, 2018.
- DAS DORES, M. T. et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 271–275, 2013.
- DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. e9–e10, 2017.
- FERREIRA, M. A. et al. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8589–8597, 2016.
- FIGUEIREDO, E. L. et al. Caracterização do Potencial Tecnológico e Identificação Genética de Bactérias Ácido Lácticas Isoladas de Queijo do Marajó, Tipo Creme, de Leite de Búfala. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 18, n. 3, p. 293–303, 2016.
- GALINARI, É. et al. Microbiological aspects of the biofilm on wooden utensils used to make a Brazilian artisanal cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 713–720, 2014.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, n. 1, p. 31–36, 2001.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. Suppl 2, p. S98–S107, 2015.

GUTIÉRREZ, M.N. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 432–439, 2010.

HIMEDIA LABORATORIES. Technical Data: *Lactobacillus* MRS AGAR (MRS AGAR). 2019a.

HIMEDIA LABORATORIES. Technical Data: M17 Agar Base. p. 1–3, 2019b.

LUIZ, L. M. P. et al. Aislamiento e identificação de las bacterias ácido-lácticas del queso brasileño Minas artesanal. **CYTA - Journal of Food**, v. 15, n. 1, p. 125–128, 2017.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, n. December 2018, p. 40–49, 2019a.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019b.

KAMIMURA, B. A. et al. Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. **Food Microbiology**, v. 89, n. November 2019, p. 103453, 2020.

KUNIYOSHI, M. et al. Antimicrobials for food and feed ; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Microbiology**, p. 160–167, 2020.

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. **The Lancet**, 2020.

MAYO, B. et al. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. **Foods**, v. 10, p.602, 2021.

MARTINS, M.C.F. **Diversidade de bactérias lácticas e identificação molecular de *Lactococcus* isolados de ambientes lácteos e não lácteos**. 2018. 83f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

MOZZI, F. Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 501–508, 2015.

NÓBREGA, J.E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de

Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

NÓBREGA, J. E. Variações Na Microbiota Leveduriforme Do Fermento Endógeno Utilizado Na Produção Do Queijo Canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, n. 364, p. 14–18, 2008.

NÓBREGA, J. E. **Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais**. 2012. 82f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

OLIVEIRA, A.L. et al. Caracterização do queijo Minas artesanal do Cerrado mineiro da região do Alto Paranaíba. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v.3, n.6, p.824-828, 2017.

OLIVEIRA, D,L.S. **Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista *in vitro* frente a *Lactobacillus spp.*** 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

PENG, K. et al. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 137, n. July, p. 109544, 2020.

PÉREZ-DÍAZ, I. M. et al. Genotypic and phenotypic diversity among *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* and *Lactobacillus pentosus* isolated from industrial scale cucumber fermentations. **Food Microbiology**, v. 94, p. 103652, 2021.

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.

RAFAEL, V. da C. **Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo minas artesanal da serra da Canastra**. 2017. 138f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

RESENDE, M. F. S. et al. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: Influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011.

RUGGIRELLO, M. et al. Study of *Lactococcus lactis* during advanced ripening stages of model cheeses characterized by GC-MS. **Food Microbiology**, v. 74, p. 132–142, 2018.

RUGGIRELLO, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. **Food Microbiology**, v. 59, p. 112–118, 2016.

RUVALCABA-GÓMEZ, J.M. Bacterial Succession through the Artisanal Process and Seasonal Effects Defining Bacterial Communities of Raw-Milk Adobera Cheese Revealed by High Throughput DNA Sequencing. **Microorganisms**, v. 9, n. 24. 2021.

SANDERS, M.E.; LEBEER, S. New names for important probiotic *Lactobacillus* specie.

Disponível em <<https://isappscience.org/new-names-for-important-probiotic-lactobacillus-species/>>. Acesso em julho de 2021.

SANLIBABA, P.; ÇAKMAK, G. A. Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria **Applied Microbiology**, v. 2, n. 2, 2016.

SANT'ANNA, F.M. **Microbioma do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre ao longo do período de maturação**. 2019. 127f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

SANT'ANNA, F. M. et al. Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazil throughout ripening time. **Food Microbiology**, v. 82, n. February, p. 349–362, 2019.

SANTOS, K.R. **Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal produzida na Serra da Canastra-MG**. 2013. 59f. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

SÉGOLÉNE DUBERNET, NATHALIE DESMASURES, M. G. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**. v. 214, p. 271–275, 2002.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691–697, 2010.

SOARES, D.B. **Caracterização físico-química e microbiológica do queijo minas artesanal produzido em Uberlândia-MG**. 2014. 124f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinária – produção animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SOBRAL, D. et al. Principais Defeitos Em Queijo Minas Artesanal: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108–120, 2017.

SOUSA, M. A. DE et al. New enterococci isolated from cheese whey derived from different animal sources: High biotechnological potential as starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, p. 109808, 2020.

SZUTOWSKA, J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 3, p. 357–372, 2020.

TODOROV, S. D.; HOLZAPFEL, W.; NERO, L. A. Safety evaluation and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus acidilactici* strains isolated from artisanal cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, p. 110550, 2020.

VELÁZQUEZ-ORDÓÑEZ, V. et al. Microbial Contamination in Milk Quality and Health Risk of the Consumers of Raw Milk and Dairy Products. **Nutrition in Health and Disease - Our Challenges Now and Forthcoming Time**, 2019.

WORSZTYNOWICZ, P. et al. Identification and partial characterization of proteolytic activity

of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry. **The Journal of the Polish Biochemical Society and of the Polish Academy of Sciences**, v. 66, n. 1, p. 61–69, 2019.

YU, A. O.; LEVEAU, J. H. J.; MARCO, M. L. Minireview Abundance , diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, p. 16–29, 2020.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

### CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BAL ISOLADAS DE QMA CONTRA PATÓGENOS DE RELEVÂNCIA PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

#### Resumo

Bactérias ácido lácticas (BAL) produzem uma variedade de compostos capazes de conferir características sensoriais e de segurança microbiológica aos alimentos. Dentre esses compostos destacam-se as bacteriocinas, peptídeos bioativos que possuem atividade antagonista contra microrganismos intimamente relacionados (espectro estrito) ou uma gama diversificada de microrganismos (amplo espectro) estabilidade a diferentes faixas de pH e temperaturas, entre outras vantagens. Estudos acerca da distribuição filogenética do repertório de bacteriocinas de BAL associadas a queijos artesanais indicam a existência de bacteriocinas ainda não caracterizadas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade antagonista de BAL isoladas de QMA com foco na obtenção de cepas produtoras de bacteriocinas capazes de controlar o crescimento de microrganismos de importância para a indústria de alimentos. Para isso, inicialmente foi avaliada a atividade antagonista de BAL isoladas de QMA da Serra da Canastra e do Serro contra *Lactococcus lactis* ATCC 19435, estirpe sensível a bacteriocinas, pela técnica *Spot on the lawn*. Posteriormente, avaliou-se a presença de bacteriófagos e a produção de ácidos, visando à eliminação de possíveis fatores interferentes. Para avaliar o caráter peptídico das substâncias antagonistas, foi realizado ensaio com proteinase K. Por fim, testou-se a atividade inibitória dos isolados contra microrganismos patogênicos. De 100 isolados de BAL avaliados, 39 (39%) inibiram o crescimento de *Lactococcus lactis* ATCC 19435. Não foi detectada a ocorrência de bacteriófagos em nenhum dos testes com os isolados, tendo em vista a inexistência de placa de lise após o cultivo. Não se relacionou a atividade antagonista à produção de ácidos orgânicos, uma vez que o pH se mostrou constante dentro e fora das zonas de inibição. Quanto a sensibilidade à proteinase K, 12 isolados se apresentaram sensíveis a esta enzima, uma vez que perderam a capacidade de inibir o crescimento de *L. lactis*, conforme evidenciado pela alteração das zonas de inibição. Ainda, dos 12 isolados suscetíveis à proteinase K, 9 (75%) apresentaram atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus*, 7 (58,3%) contra *Listeria innocua*, 10 (83,3%) contra *Escherichia coli* e 7 (58,3%) contra *Salmonella* Enteritidis. Com esses resultados conclui-se que, embora sejam necessários estudos adicionais, os isolados de BAL obtidos no presente trabalho apresentam potencial para aplicação no setor industrial visando à segurança microbiológica de alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas (BAL) geram ácido láctico como principal produto da fermentação de açúcares. Além do ácido láctico, esses microrganismos produzem uma variedade de compostos capazes de conferir características sensoriais e de segurança microbiológica aos alimentos, como diacetil, acetoina, 2-3-butanodiol, derivados da utilização do citrato, compostos voláteis e peptídeos do catabolismo de aminoácidos. Dentre os peptídeos bioativos produzidos destacam-se as bacteriocinas, que desde a descoberta da colicina V em 1925 têm sido alvo de estudos em relação à sua aplicabilidade na indústria de alimentos e áreas médicas, como alternativa ao uso de aditivos químicos e antibióticos (BALCIUNAS et al., 2013; COELHO et al., 2014; DABA; ELKHATEEB, 2020; MONTEL et al., 2014).

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos estáveis ao calor sintetizados nos ribossomos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que se diferem entre si quanto a composição de aminoácidos, biossíntese, transporte e modo de ação (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014). Esses compostos antimicrobianos tem atividade antagonista contra microrganismos intimamente relacionados (espectro estrito) ou uma gama diversificada de microrganismos (amplo espectro). São frequentemente muito potentes, sendo ativas em concentrações nanomolares e exercem o seu efeito na membrana celular (KUNIYOSHI et al., 2020).

A aplicação de bacteriocinas desperta interesse pois apresentam atividade contra diferentes patógenos e deterioradores. Como características principais, destacam-se a estabilidade a diferentes faixas de pH e temperaturas; a origem em microrganismos com *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*); a possibilidade de uso como conservantes naturais em alimentos; o fato de não serem ativas ou tóxicas às células eucarióticas; serem inativadas por proteases digestivas, exercendo pouca ou nenhuma influência sob a microbiota gastrointestinal; não selecionarem linhagens resistentes à antibióticos; serem efetivas em baixas concentrações; e, por fim, possuírem determinante genético usualmente codificado por plasmídeos, o que permite manipulação genética facilitada (GÁLVEZ et al., 2007; HEREDIA-CASTRO et al., 2017; JOHNSON; JUNG; JIN, 2017; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018).

A única bacteriocina aprovada pela Food and Drug Administration (USFDA) para uso como conservante em alimentos é a nisina, comercialmente disponível como Nisaplin (CHIKINDAS et al., 2018; YANG et al., 2014). Além da potencial aplicação na indústria de alimentos, estas moléculas bioativas são também aplicáveis na prática veterinária, inclusive para o tratamento da mastite, em alternativa ao uso de antibióticos convencionais (AHMAD et

al., 2017; GODOY-SANTOS et al., 2019; GUAN et al., 2017; GUILHELMELLI et al., 2013; YANG et al., 2014). No entanto, a baixa estabilidade da nisina em pH neutro, sua interação com consequente perda de eficácia com componentes presentes em lácteos e a seleção de bactérias resistentes à nisina faz com que a busca por outras bacteriocinas se justifique por meio de novas pesquisas científicas (GODOY-SANTOS et al., 2019; IBARRA-SÁNCHEZ et al., 2020).

Neste contexto, os Queijos Minas Artesanais (QMAs) representam uma fonte promissora de bacteriocinas, uma vez que apresentam significativa biodiversidade de BAL (MARGALHO et al., 2020b). Muitos estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de BAL isoladas de QMA frente a patógenos de importância na indústria de alimento, como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, entre outros (ACURCIO et al., 2017; ANDRADE et al., 2014; CAMPAGNOLLO et al., 2018a; DE SANT'ANNA et al., 2017; FIALHO et al., 2018). Estudos acerca da distribuição filogenética do repertório de bacteriocinas de BAL associadas a queijos artesanais indicam a existência de bacteriocinas ainda não caracterizadas (GONTIJO et al., 2020), o que confirma a necessidade de pesquisas visando à caracterização destes antimicrobianos provenientes de BAL isoladas de QMA. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade antagonista de BAL isoladas de QMA com foco na obtenção de cepas produtoras de bacteriocinas capazes de controlar o crescimento de microrganismos de importância para a indústria de alimentos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Condições de cultivo e enumeração dos microrganismos

Para avaliação da atividade antagonista, foram escolhidas 100 BAL (61 identificadas como *Lactobacillus* e 39 BAL sem identificação) isoladas de QMA com características de origem por propriedade produtora de QMA, fenotípicas e genéticas distintas, mantidas a -20°C em caldo MRS acrescido de glicerol 30%. As culturas de BAL foram estriadas em ágar MRS e incubadas a 30°C, por 48 horas, sob condições de microaerofilia. Como microrganismo indicador, utilizou-se *Lactococcus lactis* ATCC 19435, estirpe sensível a bacteriocinas (MARTINS, 2012). Uma alíquota de 100 µL das culturas em fase estacionária foi transferida para 1,0 mL de caldo MRS e incubada a 30°C por 24 horas. Após, a densidade óptica (DO 600 nm) da cultura foi determinada e alíquotas de 100 µL foram plaqueadas em ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, em microaerofilia e a quantificação das células viáveis foi determinada pela média do número de colônias em cada faixa de diluição. Para ensaios posteriores, a contagem de células foi relacionada à DO 600 nm.

Para testar a atividade antagonista frente a microrganismos patogênicos, foram utilizados *S. aureus* ATCC 1934, *L. innocua* ATCC 33090, *S. Enteritidis* PT4 (578) e *E. coli* ATCC 29214. Uma alíquota de 100 µL da cultura em fase estacionária foi transferida para 1,0 mL de caldo BHI (para *S. aureus*, *L. innocua* e *S. Enteritidis*) e incubada nas condições de temperatura adequadas para o crescimento de cada microrganismo (37°C para *S. aureus* e *S. Enteritidis*; 30°C para *L. innocua*), por 24 horas. Para *E. coli*, foi transferida uma alíquota de 100 µL da cultura em fase estacionária para 1,0 mL de caldo LB e a incubação foi feita em temperatura de 37°C, por 24 horas. Após crescimento de cada microrganismo, foi realizada a quantificação das células viáveis para posterior correlação à DO 600 nm.

### 2.2. Avaliação da atividade antagonista de BAL contra *L. lactis* ATCC 19435

Para a avaliação da atividade antagonista das BAL selecionadas, foi utilizada a técnica *Spot on the lawn*, de acordo com De Martinis e Franco (1998). A técnica permite verificar a inibição de microrganismos cultivados em sobrecamada de ágar semi-sólido, através da formação de halos de inibição decorrentes da atividade de BAL. Os isolados foram inoculados pontualmente em placas de Petri contendo 10 mL de ágar MRS e incubados a 37°C por 24 horas, em condições de microaerofilia. Após, cerca de 6 mL de ágar MRS semi-sólido (0,75%)

previamente inoculado com  $10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> de *Lactococcus lactis* ATCC 19435 (microrganismo indicador) foi vertido sobre as placas previamente inoculadas com os isolados. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições de microaerofilia. A atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de halos de inibição do crescimento do microrganismo indicador em torno das colônias dos isolados avaliados.

### **2.3. Determinação de fatores de interferência na atividade antagonista dos isolados**

Para comprovar que a atividade antimicrobiana não estava relacionada a fatores interferentes, foram avaliadas a presença de bacteriófagos e a produção de ácidos. A presença de bacteriófagos foi analisada a partir da remoção de um fragmento de ágar (3 mm) do halo de inibição observado na atividade antagonista, macerado em solução salina (pH 7,2) e centrifugado (12.000 g) durante 20 minutos. Em seguida, uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para 3 mL de cultura contendo o microrganismo indicador (*L. lactis* ATCC 19435). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente para permitir a adsorção viral, uma alíquota de 200 µL foi adicionada a 3,5 mL de MRS semi-sólido (0,75 %), imediatamente vertido sobre uma camada prévia de MRS sólido. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas em microaerofilia para crescimento do microrganismo indicador. Posteriormente, as placas foram avaliadas quanto à presença de zonas líticas, indicativas da presença de bacteriófagos (SABINO et al., 2019).

Para excluir a possibilidade de o pH ácido ser o responsável pela inibição das estirpes avaliadas, após a realização do teste de antagonismo, o pH dentro e fora das zonas de inibição do crescimento do microrganismo indicador, bem como o pH do meio de cultura não inoculado, foram determinados por meio de fitas indicadoras de pH (SABINO et al., 2019).

### **2.4. Determinação do caráter peptídico das substâncias antagonistas**

Para confirmar o caráter peptídico das substâncias antagonistas produzidas pelos isolados selecionados, foram realizados ensaios com a enzima proteinase K, em soluções com concentração final de 5 mg/mL. Primeiramente, as BAL foram inoculadas pontualmente em placas contendo 10 mL de ágar MRS e incubadas a 37°C por 24 horas em condições de microaerofilia. Após incubação, uma alíquota de 5 µL de solução da enzima foi adicionada ao lado de cada colônia (região onde se observa a formação do halo de inibição do microrganismo indicador). Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C por 3 horas, permitindo que

ocorresse a absorção e difusão da enzima. Após esse período, verteu-se uma sobrecamada de MRS semi-sólido (0,75%) previamente inoculado com o microrganismo indicador e as placas foram re-incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo, 5 µL de água miliQ estéril foram adicionados em torno de uma das colônias. A atividade proteolítica das enzimas foi verificada pela alteração do halo de inibição original, isto é, pelo crescimento do microrganismo indicador no local onde a enzima foi aplicada (SABINO et al., 2019).

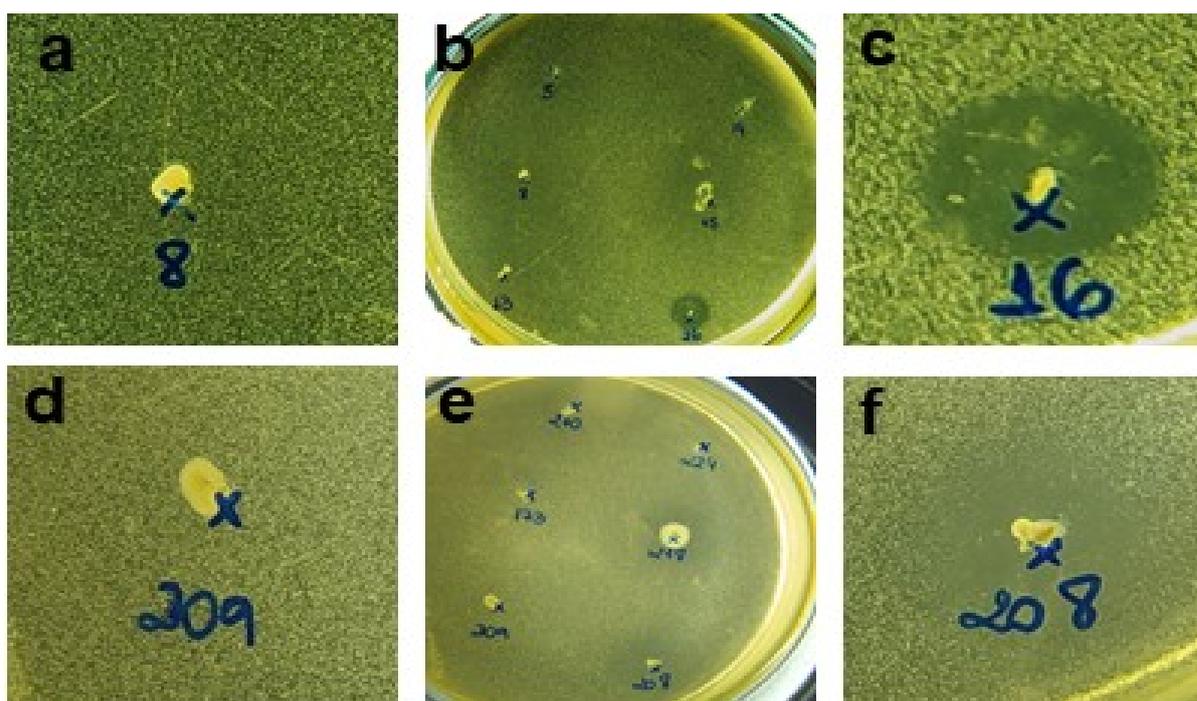
## **2.5. Atividade antagonista contra patógenos de importância alimentar**

Descartados os potenciais efeitos de fatores de interferência nos testes de antagonismo (presença de bacteriófagos, produção de ácidos e sensibilidade à proteinase K), testou-se a atividade inibitória dos isolados contra microrganismos patogênicos de importância alimentar. Utilizaram-se duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 1934 e *L. innocua* ATCC 33090) e duas bactérias Gram-negativas (*S. Enteritidis* PT4 578 e *E. coli* ATCC 29214). Os isolados foram inoculados pontualmente em 10 mL de ágar MRS e incubados a 37°C por 24 horas em condições de microaerofilia. Após, cerca de 10 mL de ágar BHI (para *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *L. innocua*) e LB (para *E. coli*) semi-sólido (0,75%) previamente inoculado com 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup> de cada um dos patógenos (microrganismo-alvo) foram vertidos sobre as placas previamente inoculadas com os isolados de BAL. As placas foram incubadas sob as condições adequadas ao crescimento de cada microrganismo indicador, 37°C para *S. aureus*, *S. Enteritidis* e *E. coli* e 30°C para *L. innocua*, por 24 horas, em aerobiose. A atividade antimicrobiana foi determinada pela medida dos halos de inibição (em mm) de crescimento do microrganismo-alvo em torno das colônias dos isolados avaliados, utilizando-se uma régua. Os testes foram realizados em triplicata, para cada um dos isolados avaliados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 isolados de BAL avaliados, 39 (39%), 27 *Lactobacillus* e 12 BAL sem identificação, inibiram o crescimento de *Lactococcus lactis* ATCC 19435, microrganismo sensível à produção de bacteriocinas (Figura 1). A atividade antagonista, no entanto, pode ser associada a outros compostos antibacterianos produzidos pelas BAL, como ácidos carboxílicos adicionais (ácido fenil-lático e ácido acético), ácidos graxos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, dentre outros (MOZZI, 2015); além disso, o antagonismo também pode estar relacionado à presença de bacteriófagos (LIU et al., 2020; LYNE, 2011). Assim, os 39 isolados foram utilizados nas análises subsequentes, a fim de se determinar a influência de tais fatores de interferência.

Figura 1 – Teste de antagonismo de BAL contra *L. lactis* ATCC 19435.



Legenda: a) e d) Resultados negativos para o teste de antagonismo dos isolados 8 e 209 contra *L. lactis* ATCC 19435 (ampliadas das imagens representadas em b e e); c) e f) Resultados positivos para o teste de antagonismo dos isolados 16 e 208 contra *L. lactis* ATCC 19435 (ampliadas das imagens representadas em b e e)

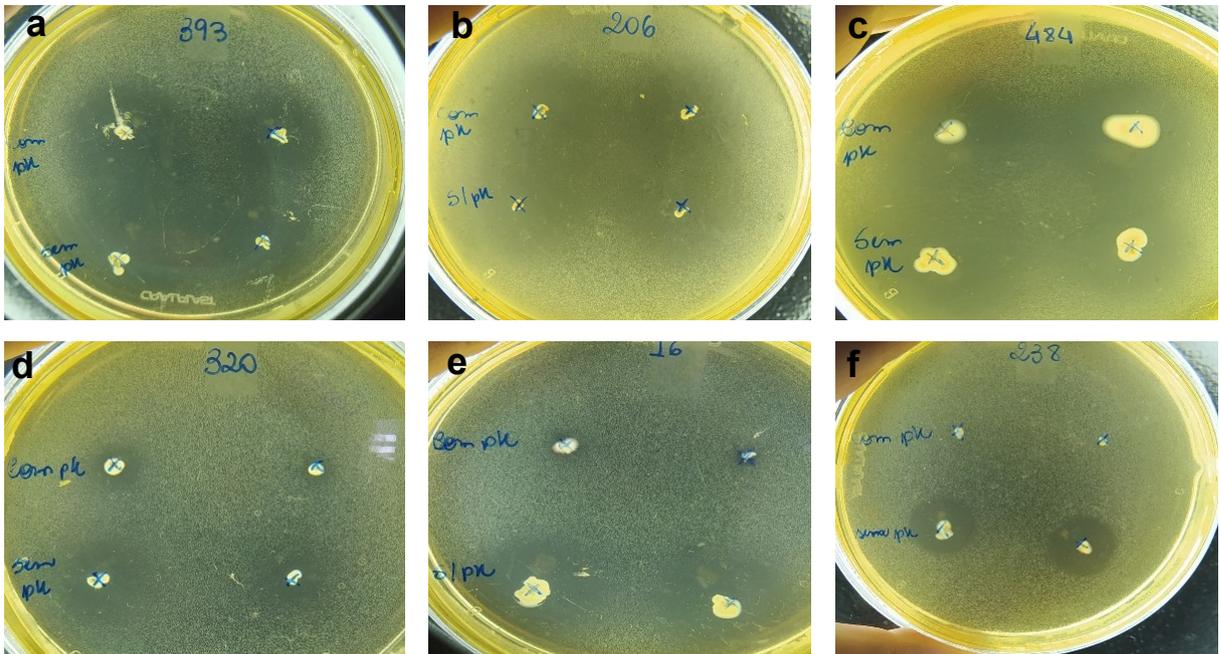
Não foi detectada a ocorrência de bacteriófagos em nenhum dos testes com os isolados, tendo em vista a inexistência de placa de lise após o cultivo. Atesta-se, portanto, que o efeito antagonista observado não estava relacionado à sua presença. Em relação à produção de ácidos com atividade antimicrobiana, o pH obtido foi de 5,5, tanto para as regiões internas aos halos de inibição quanto para as áreas ao redor. Confirma-se, portanto, que a atividade antagonista

não estava relacionada à produção de ácidos orgânicos decorrente do metabolismo dos isolados. Os resultados sugerem, portanto, a possibilidade do efeito antimicrobiano estar associado à produção de substâncias bioativas pelas BAL selecionadas. Sabino et al. (2019) também avaliaram a influência de fatores de interferência na atividade antagonista de BAL (bacteriófagos ou produção de ácidos), descartando essa possibilidade mediante à observação de um resultado similar ao encontrado no presente trabalho.

Ao avaliar o caráter peptídico dos compostos com atividade antagonista, observou-se que tais compostos, produzidos por 12 isolados (8 *Lactobacillus* e 4 BAL sem identificação), apresentaram sensibilidade à proteinase K, uma vez que perderam a capacidade de inibir o crescimento de *L. lactis*, conforme evidenciado pela alteração das zonas de inibição (Figura 2). A perda da atividade antimicrobiana após o tratamento com proteinase K confirmou, portanto, a natureza proteica dos compostos antagonistas produzidos pelos isolados, indicando a possibilidade de corresponderem a compostos da classe das bacteriocinas, uma vez que estas são reconhecidas por serem degradadas por enzimas proteolíticas (PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014).

Dos 39 isolados que apresentaram atividade antagonista, 27 não apresentaram sensibilidade à proteinase K. No entanto, apesar dos compostos antimicrobianos produzidos por tais isolados não serem sensíveis à ação desta enzima, não se deve descartar a possibilidade de sua natureza proteica; a atividade de outras enzimas deve ser avaliada, como  $\alpha$ -quimotripsina, tripsina e protease tipo XIV, uma vez que há bacteriocinas (como a plantaricina C produzida por *Pediococcus acidilactic*) que são resistentes à ação da proteinase K (JOHNSON; JUNG; JIN, 2017; MARGALHO et al., 2020b; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018).

Figura 2 – Teste de sensibilidade à proteinase K em isolados de BAL que formaram halos contra *L. lactis* ATCC 19435.



Legenda: a-c) Resultados negativos para teste de susceptibilidade do composto antimicrobiano à proteinase K (nas colônias acima das placas foi adicionada proteinase K; naquelas das regiões inferiores, não se fez uso da enzima; os halos de inibição contra *L. lactis* se formaram, portanto, independentemente da adição ou não de proteinase K); d-f) Resultados positivos para susceptibilidade do composto antimicrobiano à proteinase K – no crescimento de colônias superiores foi adicionado proteinase K e nos inferiores não foi adicionado proteinase K, os halos das colônias superiores não se formaram, enquanto os halos das colônias inferiores se formaram.

Cabe ressaltar que para a confirmação de que os compostos antagonistas sejam realmente bacteriocinas, deve-se proceder sua extração, identificação e caracterização (FIALHO et al., 2018). Porém, as evidências apresentadas somadas a trabalhos realizados com BAL isoladas de QA do Brasil apontam para a possibilidade de que o antagonismo observado neste trabalho sejam devido à produção de bacteriocinas (BRITO; PEREIRA; MEDEIROS, 2020; CAMPAGNOLLO et al., 2018a; CAVICCHIOLI et al., 2017; COSTA et al., 2015, 2013; MARGALHO et al., 2020b; TODOROV; HOLZAPFEL; NERO, 2020; TULINI; WINKELSTRÖTER; DE MARTINIS, 2013). A descoberta de bacteriocinas é interessante, à medida que são substâncias com potencial de uso para se suprirem as demandas de consumidores por produtos com conservantes alimentares naturais, em alternativa ao uso de conservantes sintéticos. Ainda, o uso de culturas probióticas produtoras de bacteriocinas para alimentação de animais consiste em estratégia promissora para a saúde animal. Além disso, bacteriocinas podem ser mais vantajosas que antibióticos clássicos, uma vez que o desenvolvimento de resistência é relativamente difícil devido ao espectro de ação específico de bacteriocinas em comparação com os antibióticos, além de serem facilmente manipuladas por

bioengenharia devido aos seus mecanismos biossintéticos relativamente simples (DABA; ELKHATEEB, 2020; KUNIYOSHI et al., 2020).

Para verificar o espectro de ação das potenciais bacteriocinas produzidas pelos 12 isolados selecionados anteriormente, avaliou-se sua atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e negativas de importância alimentar. Dos 12 isolados avaliados, todos apresentaram atividade antagonista contra pelo menos um dos patógenos (Tabela 1); 9 isolados (75%), 6 *Lactobacillus* e 3 BAL sem identificação, apresentaram atividade antagonista contra *S. aureus*, 8 (66,6%), 6 *Lactobacillus* e 2 BAL sem identificação, contra *L. innocua*, 10 (83,3%), 7 *Lactobacillus* e 3 BAL sem identificação, contra *E. coli* e 7 (58,3%), 5 *Lactobacillus* e 2 BAL sem identificação, contra *S. Enteritidis*. Normalmente, bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas têm baixa atividade antagonista contra Gram-negativas, uma vez que a presença da membrana externa no último grupo limita a atividade das bacteriocinas que atuam na membrana da célula alvo (ORTOLANI et al., 2010; PRUDÊNCIO; DOS SANTOS; VANETTI, 2015). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que os isolados avaliados foram capazes de inibir bactérias de ambos os grupos, indicando um amplo espectro de ação das potenciais bacteriocinas, da mesma maneira que outras bacteriocinas produzidas por BAL previamente caracterizadas (JOHNSON; JUNG; JIN, 2017).

Tabela 1 – Halos de inibição (em mm) para o teste de atividade antagonista de isolados de BAL de QMA contra microrganismos patogênicos de importância alimentar.

Microrganismos-alvo	Isolados											
	16	104	141	233	238	313	320	407	452	495	472	512
<i>S. aureus</i> ATCC 1934	-	4,0	-	6,0	10,5	7,0	7,5	3,0	-	9,5	7,5	6,0
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	6,5	-	-	4,5	-	3,5	-	4,5	4,5	3,0	3,0	5,0
<i>E. coli</i> ATCC 29214	12,5	-	6,0	9,5	10,0	9,5	10,0	10,5	10	9,0	11,0	9,0
<i>S. Enteritidis</i> PT4 (578)	6,5	-	7,0	-	-	6,5	6,5	7,0	7,5	-	8,0	-

Legenda: -: ausência de atividade antagonista

Bacteriocinas como Nisina, Lacticina 3147A, Plantaricina C, Pediocina PA-1, Enterocina 1071, Enterocina EJ97 e Enterocina AS-48 produzidas por BAL isoladas de diferentes alimentos possuem atividade antagonista conhecida contra microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos; no entanto, poucos estudos detectaram efeito inibitório contra

*Salmonella* spp. (HEREDIA-CASTRO et al., 2017; JOHNSON; JUNG; JIN, 2017; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015). Os resultados aqui apresentados, portanto, demonstram a detecção de prováveis bacteriocinas de isolados de BAL a partir de QMA com amplo espectro de ação, incluindo *Salmonella* sp., o que é de grande interesse para diversos setores da indústria de alimento, uma vez que poderia ser aplicado como cultura protetora diretamente na matriz alimentar ou, ainda, utilizada como cultura *starter* em alimentos fermentados. Ressalta-se também que a purificação de bacteriocinas de BAL é um processo menos laborioso e custoso que para bactérias Gram-negativas, que podem conter LPS e outras enterotoxinas potencialmente tóxicas para o consumidor final (JOHNSON; JUNG; JIN, 2017).

Além do amplo espectro de ação da atividade bacteriocinogênica observada para 10 dos 12 isolados avaliados (83,3%), outro ponto a ser destacado é o fato de que essa atividade é proveniente de BAL isoladas de alimentos (QMA), o que poderia, por exemplo, facilitar sua aprovação de uso pelos órgãos reguladores, considerando-se o *status* GRAS de algumas BAL. Para que uma nova bacteriocina seja reconhecida como tal, deve ser feita uma solicitação às agências competentes descrevendo o uso proposto e sua segurança, detalhes sobre as formulações (incluindo as propriedades físicas e químicas), além das condições de uso. Como BAL são consideradas GRAS, este processo seria, certamente, facilitado. Além disso, a origem das bacteriocinas indica uma aplicação em potencial especialmente em produtos lácteos, cujos efeitos contribuiriam para a garantia da qualidade do produto final. O uso de estirpes produtoras de bacteriocinas como cultura *starter* ou adjuvante na fermentação pela indústria de laticínios pode, ainda, superar as limitações de uso de bacteriocinas purificadas, garantindo a produção contínua de compostos antimicrobianos ao longo da maturação e armazenamento de queijos (JOHNSON; JUNG; JIN, 2017; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2018). Importante salientar ainda que, para que essas BAL e seus possíveis compostos antimicrobianos sejam aplicados no setor alimentício, é necessário que estas sejam identificadas em nível de espécie e que seja realizado o estudo de inocuidade do uso de bacteriocinas em alimentos. Esse estudo é conduzido pelas etapas: isolamento da bactéria de um alimento, seleção para a produção da bacteriocina, caracterização da bacteriocina, produção da bacteriocina em modelos alimentares e, por último, aplicação no alimento propriamente dito. As duas primeiras etapas já estariam contempladas por este trabalho, sendo necessária a realização apenas das três últimas (MORAIS, 2015).

#### **4. CONCLUSÕES**

Nesse estudo foi demonstrada a capacidade de BAL isoladas de QMA de inibir o crescimento de patógenos de importância alimentar, cuja atividade antagonista está potencialmente relacionada à produção de bacteriocinas. BAL isoladas de QMA com atividade antagonista apresentam potencial para aplicação na indústria de alimentos visando à segurança microbiológica. Pesquisas de prospecção são importantes para a descoberta de novos compostos com atividade antagonista; no entanto, estudos para extração, purificação e caracterização se fazem necessários a fim de se avaliar se há potencial de exploração industrial.

## REFERÊNCIAS

- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infections. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579–588, 2017.
- AHMAD, V. et al. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2017.
- ANDRADE, C. R. G. et al. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. isolated from minas artisanal cheese from serra da Canastra - MG | Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014.
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.
- BRITO, L. P. DE; PEREIRA, J. L.; MEDEIROS, R. S. DE. Atividade antagonista in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal do Sertão paraibano frente a microrganismos indicadores. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 41, n. 2Supl, p. 275, 2020.
- 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.
- CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2526–2535, 2017.
- CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.
- COELHO, M. C. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–59, 2014.
- COSTA, E. F. et al. Avaliação Antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produtoras de bacteriocinas. *In*: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, XX, 2015, Pernambuco.
- COSTA, H. H. S. et al. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858–1866, 2013.
- DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A. Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, n. June, p. 101750, 2020.

DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sake* strain. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

DE SANT'ANNA, F. M. et al. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, p. 592–601, 2017.

FIALHO, T. L. et al. Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 406–413, 2018.

GÁLVEZ, A. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

GODOY-SANTOS, F. et al. Efficacy of a ruminal bacteriocin against pure and mixed cultures of bovine mastitis pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 304–312, 2019.

GONTIJO, M. T. P. et al. Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food Research International**, v. 128, p. 108783, 2020.

GUAN, R. et al. Efficacy of vaccination and nisin Z treatments to eliminate intramammary *Staphylococcus aureus* infection in lactating cows. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 18, n. 4, p. 360–364, 2017.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. DEC, p. 1–12, 2013.

HEREDIA-CASTRO, P. Y. et al. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. **Interciencia**, v. 42, n. 6, p. 340–346, 2017.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A. et al. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2041–2052, 2020.

JOHNSON, E. M.; JUNG, Y.; JIN, Y. Bacteriocins as food preservatives : Challenges and emerging horizons. **Food Science and Nutrition**, v. 8398, n. September, 2017.

KUNIYOSHI, M. et al. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Microbiology**. p. 160–167, 2020.

WEJUN LIU, HUILI PANG, HEPING ZHANG and YIMIN CAI. Biodiversity of lactic acid bacteria. **Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice**, c.2, p. 1-535, 2014.

LIU, A. et al. Characterization of the narrow-spectrum bacteriophage LSE7621 towards *Salmonella* Enteritidis and its biocontrol potential on lettuce and tofu. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 118, p. 108791, 2020.

LYNE, J. Bacteriophage: Technological Importance in the Dairy Industry. **Encyclopedia of**

**Dairy Sciences: Second Edition**, p. 439–444, 2011.

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. **The Lancet**, 2020.

MARTINS, E. **Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal**. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

MILLS, S. et al. Inhibitory activity of *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 1–11, 2011.

MONTEL, M. C. et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136–154, 2014.

MORAIS, M.F. de. **Inibição de *Listeria monocytogenes* em salsicha por *Leuconostoc mesenteroides* isolada de grãos de kefir**. 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

MOZZI, F. Lactic Acid Bacteria. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 501–508, 2015.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

ORTOLANI, M. B. T. et al. Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2880–2886, 2010.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**. v. 13, n. Suppl 1, p. 1–13, 2014.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Circular and leaderless bacteriocins: Biosynthesis, mode of action, applications, and prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–18, 2018.

PRUDÊNCIO, C. V.; DOS SANTOS, M. T.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5408–5417, 2015.

SABINO, Y. N. V. et al. Antibacterial activity and lantibiotic post-translational modification genes in *Streptococcus* spp. isolated from ruminal fluid. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 131–138, 2019.

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, n. April, 2018.

TODOROV, S. D.; HOLZAPFEL, W.; NERO, L. A. Safety evaluation and bacteriocinogenic

potential of *Pediococcus acidilactici* strains isolated from artisanal cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, p. 110550, 2020.

TULINI, F. L.; WINKELSTRÖTER, L. K.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactiplantibacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. **Anaerobe**, v. 22, p. 57–63, 2013.

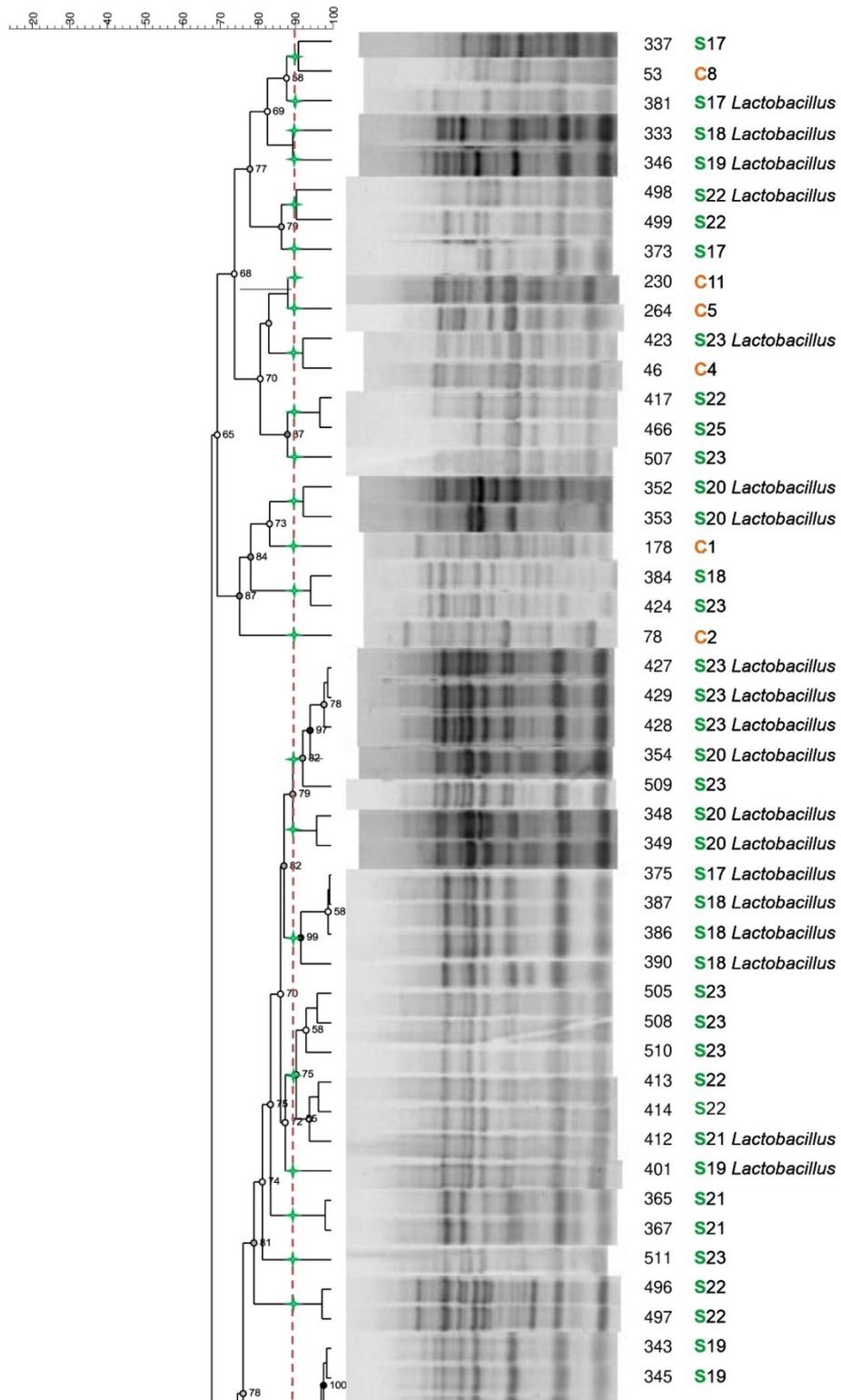
YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–10, 2014.

## CONCLUSÕES GERAIS

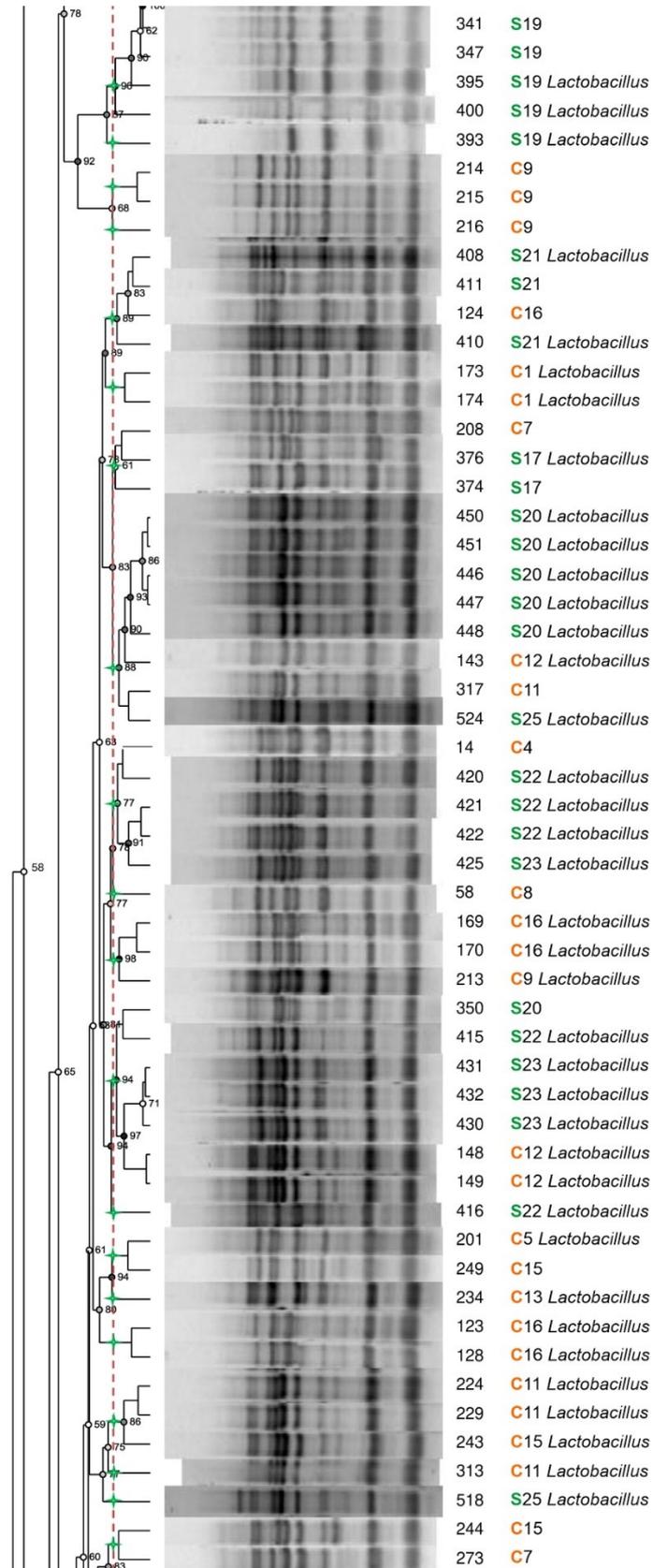
Com este trabalho foi possível concluir que QMA produzidos na Serra da Canastra e do Serro possuem como constituição de sua microbiota BAL com potencial biotecnológico para aplicação no setor alimentício. A partir das amostras de QMA coletadas em diferentes propriedades dessas microrregiões foram prospectadas BAL, principalmente *Lactobacillus*, com diferentes características fenotípicas e genotípicas. Alguns isolados foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores de importância para o setor de alimentos; novos estudos sobre sua viabilidade de aplicação, no entanto, se fazem necessários.

## APÊNDICE

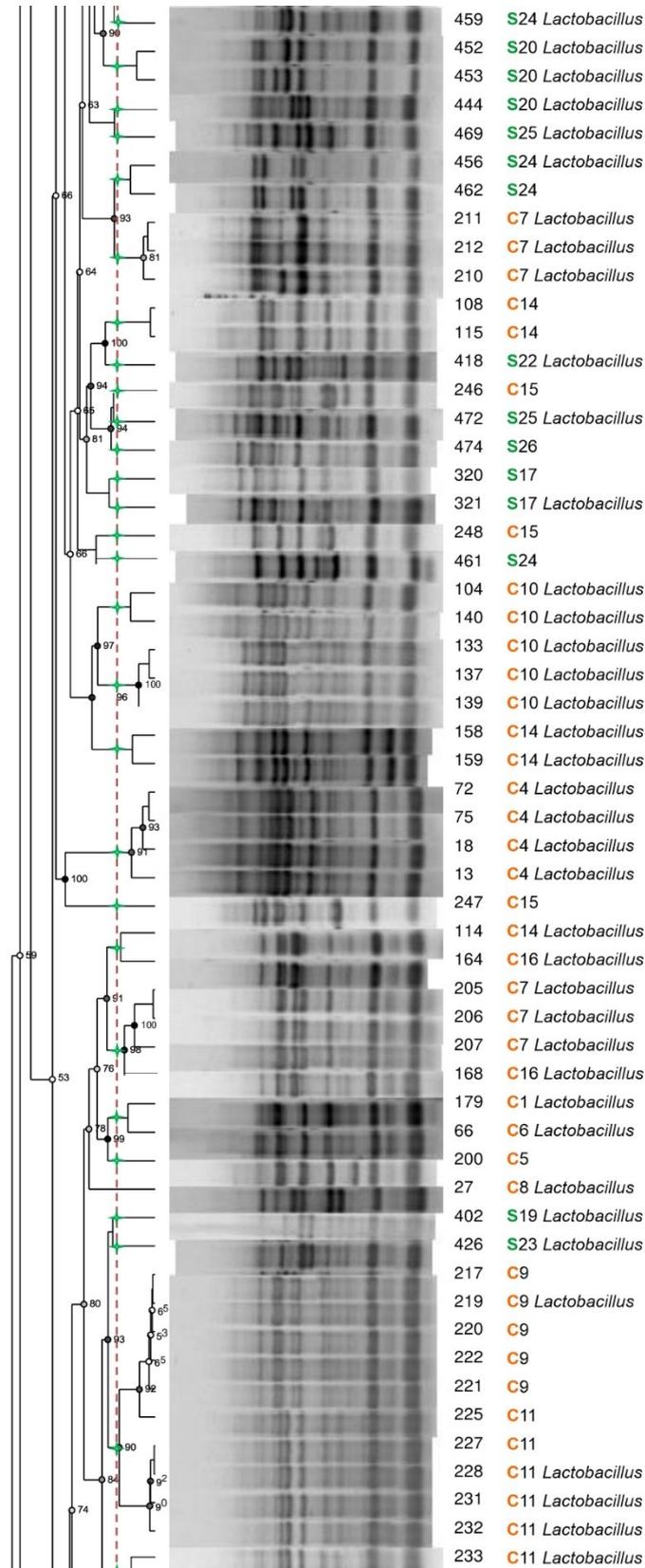
APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



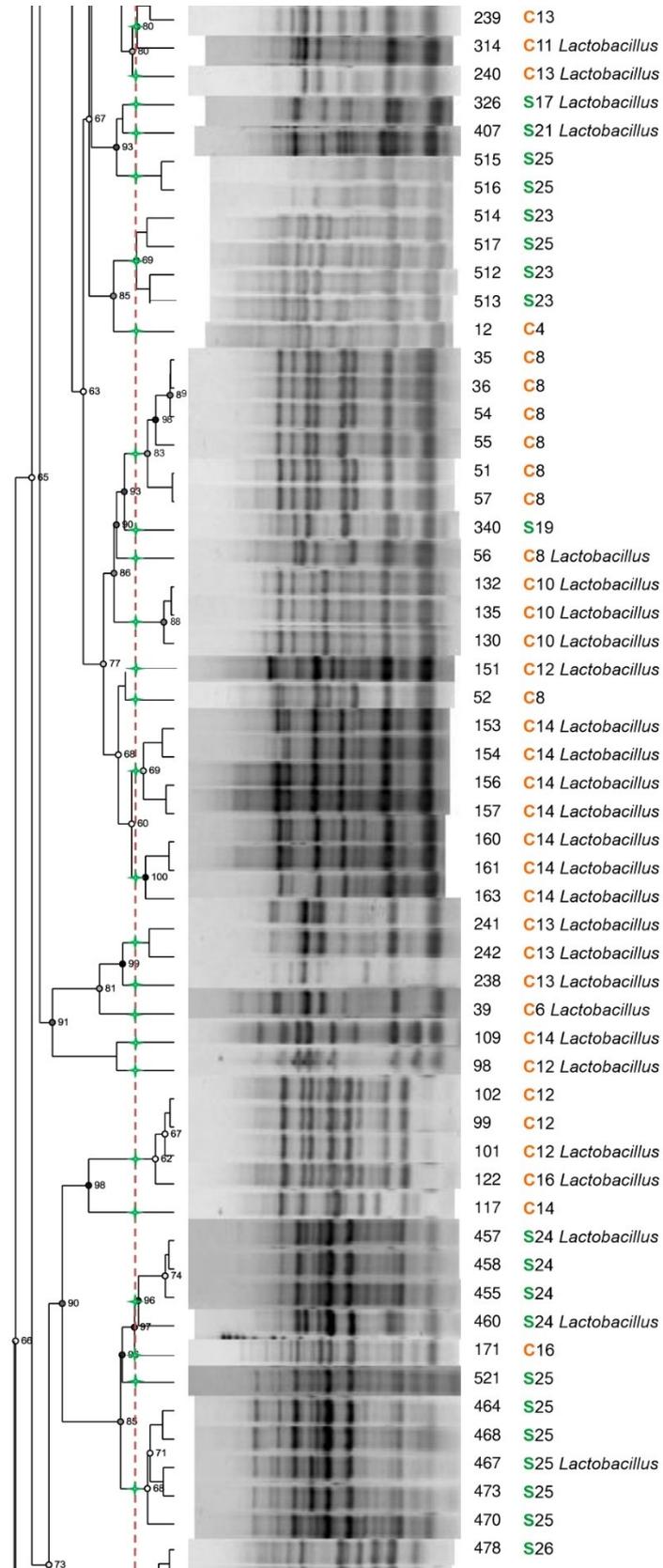
APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



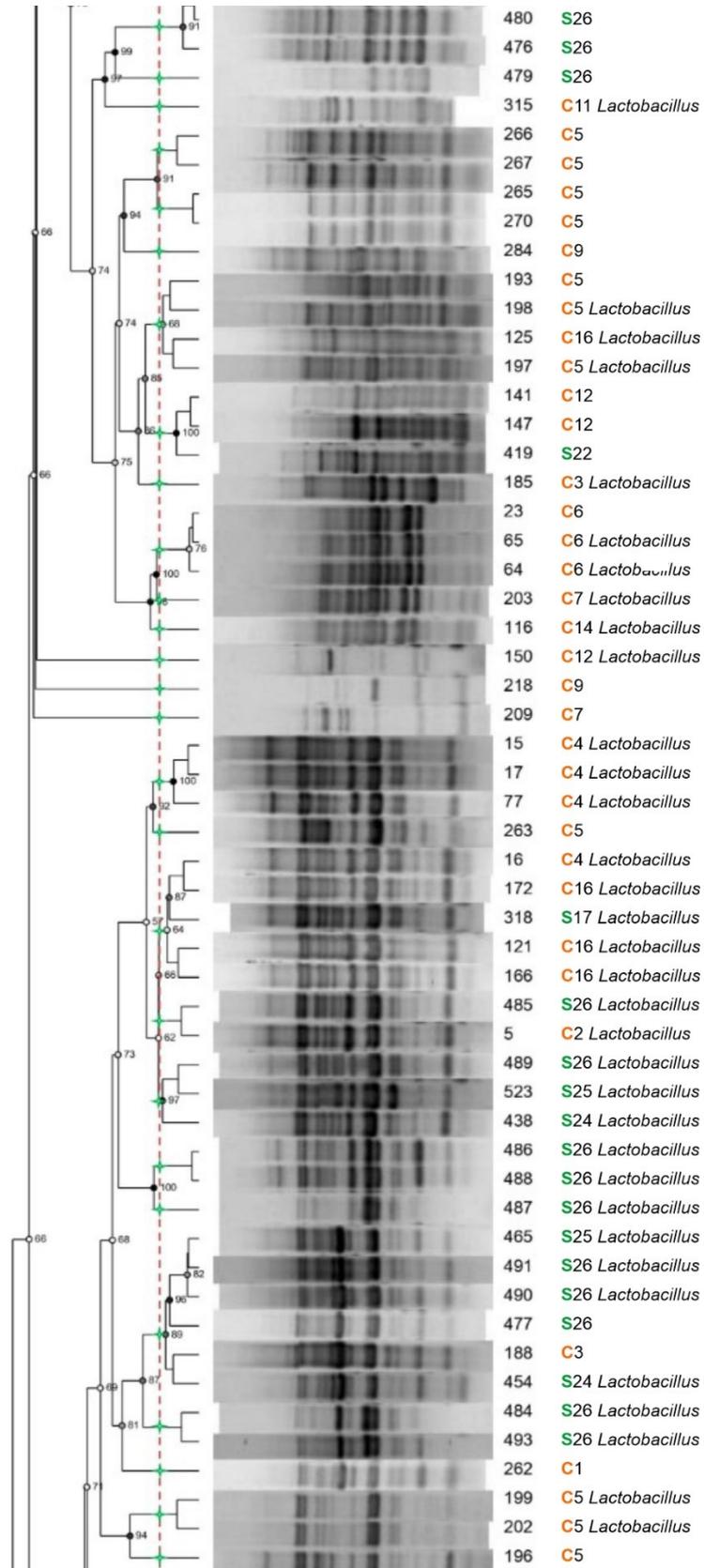
APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



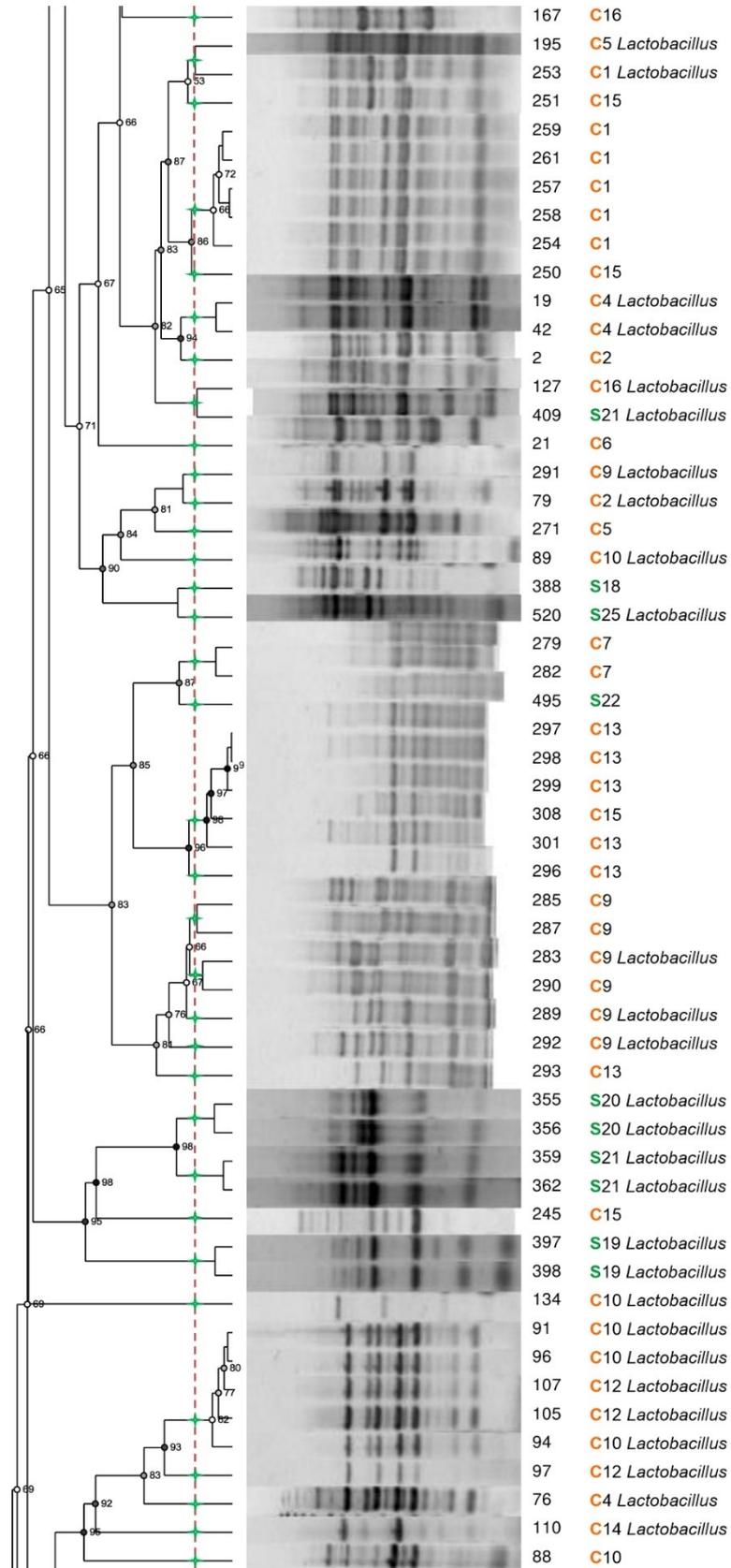
APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.



APÊNDICE A – Dendrograma obtido por análise de agrupamento de *fingerprint* rep-PCR (GTG)5 de BAL isoladas de QMA.

