

# Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo

*Isolation and identification of supposedly bacteriocinogenic lactic acid bacteria from milk and cheese*

Gislaine Hermanns<sup>[a]</sup>, Graciele Daiana Funck<sup>[b]</sup>, Jéssica Tamiozzo Schmidt<sup>[c]</sup>, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards<sup>[d]</sup>

<sup>[a]</sup> Química Industrial, doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS - Brasil, e-mail: gisaqia@yahoo.com.br

<sup>[b]</sup> Química Industrial, doutoranda em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS - Brasil, e-mail: gracifunck@yahoo.com.br

<sup>[c]</sup> Graduanda em Química de Alimentos, bolsista Pibic, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijui), Santa Rosa, RS - Brasil, e-mail: gecicka\_27@hotmail.com

<sup>[d]</sup> Engenheira de Alimentos, professora associada do Departamento Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS - Brasil, e-mail: neilarichards@uol.com.br

## Resumo

Dentre os produtos fermentados naturalmente por bactérias lácticas (BAL) encontram-se os queijos artesanais. Essas bactérias são capazes de produzir substâncias antimicrobianas frente a microrganismos deteriorantes e patogênicos, com destaque à *Listeria monocytogenes*. Na região fronteira noroeste do estado do Rio Grande do Sul é produzido um queijo típico, denominado “colonial”, que devido às condições de processamento possui uma diversificada população microbiana. O objetivo do presente estudo foi isolar e identificar BAL de leite cru e queijos artesanais dessa região com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, classificadas como bacteriocinas, podendo ser utilizadas como potenciais cultivos iniciadores. Para isso, foram coletadas amostras em dez produtores de leite e queijos, em duas épocas do ano (inverno e verão). As BAL foram isoladas desses produtos e então testadas quanto à sua capacidade de produzir tais substâncias, frente a enzimas proteolíticas, usando *L. monocytogenes* como microrganismo indicador. Do total de bactérias lácticas isoladas, com potencial antagonista, 33,33% mostraram-se capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica, sendo classificadas como possivelmente bacteriocinogênicas. A identificação molecular dos isolados revelou que estes se tratavam de *Enterococcus durans*. Concluiu-se que as BAL isoladas podem ser utilizadas como potenciais cultivos iniciadores antimicrobianos, supostamente bacteriocinogênicos, em queijos.

**Palavras-chave:** Bactérias lácticas. Bacteriocinas. Leite. Queijo.



## Abstract

*Artisanal cheeses are products naturally fermented by lactic acid bacteria (LAB). These bacteria are able to produce antimicrobial substances against spoilage and pathogenic microorganisms, more noticeably against *Listeria monocytogenes*. The Northwest region of Rio Grande do Sul produces a typical cheese called "colonial", that presents a diverse microbial population due to processing conditions of this product. The aim of this study was to isolate and identify LAB in raw cow milk and artisanal cheeses from this region with capacity to produce antimicrobial substances of protein nature. These compounds are classified as bacteriocins, and the isolated bacteria may be used as starter cultures. Samples were collected from ten farmers who manufactured milk and cheese during two seasons (winter and summer). LAB were isolated and their ability to produce proteinaceous antimicrobial substances was tested against *L. monocytogenes* in the presence of proteolytic enzymes. Among the isolated lactic acid bacteria with antagonist potential, 33.33% were able to produce antimicrobial substances of protein nature, and therefore, were classified as supposedly bacteriocinogenic. Isolates were molecularly identified as *Enterococcus durans*. The results of this study indicate that the isolated LAB may be used as potential starter cultures with antimicrobial properties for cheese production.*

**Keywords:** Lactic acid bacteria. Bacteriocins. Milk. Cheese.

## Introdução

O emprego de leite cru e sem adição de fermentos lácteos, na grande maioria dos processos de produção artesanal de queijos, fornece a esse produto uma diversificada população microbiana indesejada, proveniente do próprio leite e também das condições higiênico-sanitárias às quais é submetido. Esse aspecto se caracteriza como um perigo aos consumidores, já que além de microrganismos deteriorantes, o produto pode também servir como veículo de microrganismos patogênicos (CAVALCANTE et al., 2007).

Além dos microrganismos indesejáveis, a microbiota é composta também de bactérias lácticas (BAL), as quais são inerentes ao leite e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do leite e maturação dos queijos, conferindo características sensoriais essenciais (NESPOLO, 2009).

Muitas BAL também apresentam poder de inibição frente a patógenos e deteriorantes como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* e outras bactérias do grupo coliforme (HERNANDEZ; CARDELL; ZARATE, 2005; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009). A capacidade antagonista deve-se à produção de compostos formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, dentre os quais podemos citar os ácidos orgânicos (como ácido lático), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono,

diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza proteica, denominadas bacteriocinas (NAIDU; BIDBLACK; CLEMENS, 1999).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomalmente, biologicamente ativos, produzidos por diversas espécies de bactérias, caracterizados por agirem contra um grupo específico de microrganismos da mesma espécie, ou de diferentes gêneros (MARTINIS et al., 2001; NESPOLO, 2009; ORTOLANI, 2009). Graças à sua natureza proteica, testes de inibição de sua ação antibacteriana com diferentes enzimas proteolíticas podem ser utilizados para caracterizar a presença de bacteriocinas produzidas por BAL (LEWUS; MONTVILLE, 1991).

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas, em leite cru e queijos artesanais produzidos na região da fronteira noroeste do Rio Grande do Sul, com o intuito de averiguar a viabilidade de utilizá-las como culturas iniciadoras em queijos.

## Materiais e métodos

A pesquisa foi realizada, inicialmente, junto a dez propriedades rurais da região da fronteira noroeste do estado do Rio Grande do Sul, onde foram coletadas amostras de leite (n = 20) e queijos

(n = 40), em dois tempos de maturação (1 dia = T1; 7 dias = T7) e em duas épocas do ano (inverno e verão). Os experimentos foram realizados junto aos Laboratórios de Microbiologia e Físico-Química da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (Unijuf) e ao Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

As BAL foram isoladas em placas de ágar De Man Rogosa e Sharpe – MRS (Oxoid Ltda., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), sob anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a 35 °C por 72h (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF, 1983). Destas, foram coletadas cinco colônias aleatoriamente e purificadas em ágar MRS (Oxoid) para avaliação quanto a morfologia, coloração de Gram e catalase. Posteriormente, os isolados purificados e identificados como Gram positivos e catalase negativos foram transferidos para caldo MRS (Oxoid), onde foram cultivados por 18-24h para determinação da atividade antagonista.

A atividade antagonista foi realizada a partir de linhagens de referência de *E. coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466, *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13076 e como controle positivo a linhagem de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (*spot-on-the-lawn*) proposto por Jacobsen et al. (1999).

Os isolados com atividade antagonista foram testados quanto à capacidade de produção de substâncias antimicrobianas de natureza proteica frente às enzimas: pepsina ( $\geq 250$  un./mg),  $\alpha$ -quimotripsina ( $\geq 40$  un./mg), e proteinase K ( $\geq 30$  un./mg) (Sigma, St. Louis, MO, USA), conforme descrito por Lewus e Montville (1991), com as seguintes modificações: inicialmente, os isolados de BAL foram cultivados em caldo MRS (Oxoid) a 35 °C por 24h. Dessas culturas foram inoculadas quatro gotas de 5  $\mu$ L cada, em pontos distantes um do outro, em placa de ágar MRS (Oxoid). As placas foram incubadas em anaerobiose a 35 °C por 24h. Decorrido esse tempo, foram perfurados orifícios de 5 mm de diâmetro, a 5 mm de distância de cada colônia. Três orifícios foram preenchidos com solução de cada uma das enzimas citadas a 20 mg/mL. Um quarto orifício foi preenchido com água destilada estéril, servindo como controle.

Após absorção, as placas foram recobertas com uma sobre camada de ágar BHI semissólido a 0,8% contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de *L. monocytogenes*. Em seguida as placas foram incubadas a 35 °C/24 sob aerobiose.

A interpretação dos resultados foi feita mediante observação dos halos de inibição; a retração do halo (formato de meia-lua) próximo à enzima, por exemplo, indicou sensibilidade à mesma, caracterizando a substância antimicrobiana como uma possível bacteriocina.

As BAL supostamente bacteriocinogênicas foram identificadas por biologia molecular no Laboratório de Bioquímica do ICTA/UFRGS, por meio da obtenção e sequenciamento do rDNA 16S. O DNA total foi extraído pelo método fenol/clorofórmio e as Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas empregando os *primers* universais 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGA-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006). Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Análises Moleculares da ACTGene. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados depositado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) por meio do *software* Basic Alignment Search Tool (BLAST).

## Resultados e discussão

Durante os dois períodos de coleta de amostras de leite cru e queijos artesanais (verão e inverno), foram isoladas 112 colônias características de BAL, das quais 54,46% eram positivas para coloração de Gram e negativas para catalase; destes, 25,89% apresentaram morfologia de bacilos e 29,46% de cocos.

Diversos estudos apontam uma microbiota específica em cada local de produção de leite e queijos artesanais (MORAES et al., 2010; LIMA et al., 2009; SOUZA; ROSA; AYUB, 2003). Segundo Moraes et al. (2010), a população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo ser atribuída a variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento. O conhecimento de uma microbiota diversificada é de fundamental

importância para a produção de alimentos, uma vez que cada cultura microbiana propicia características específicas aos produtos nos quais são aplicados.

Conforme Quadro 1, os resultados obtidos também mostraram que sete isolados (33,33%) dos 21

que apresentaram atividade antagonista foram sensíveis ao menos a uma das enzimas proteolíticas testadas. Isso sugere que esses isolados foram capazes de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica ante a *L. monocytogenes*, sendo caracterizados como possíveis produtores de bacteriocinas.

**Quadro 1** - Sensibilidade dos isolados de bactérias lácticas (BAL), com atividade antagonista, frente a enzimas proteolíticas

Isolados	Sensibilidade a enzimas proteolíticas		
	Pepsina	Proteinase K	$\alpha$ - Quimotripsina
BB9	+	+	+
AB7	+	+	+
R7	+	+	+
F9	+	+	+
I6	+	+	+
B6	-	-	-
U5	-	-	-
U3	-	-	-
U4	-	-	-
R3	-	-	-
R2	-	-	-
F4	-	-	-
E4	-	-	-
J4	-	-	-
P2	-	-	-
R1	+	+	+
C4	-	-	-
AC4	-	+	+
O4	-	-	-
Y5	-	-	-
A5	-	-	-

Legenda: + = sensibilidade do isolado frente à enzima; - = isolado não se mostrou sensível frente à enzima.

Fonte: Dados da pesquisa.

Esses resultados se assemelham aos encontrados por Schittler (2012) que, isolando e caracterizando BAL de leite *in natura* do oeste de Santa Catarina, demonstrou que 36% dos isolados com atividade antagonista frente à *L. monocytogenes* apresentaram-se capazes de produzir bacteriocinas. Uma quantidade menor de isolados (14,9%) com sensibilidade a enzimas proteolíticas foi encontrada por Ortolani (2009) em trabalho similar, ao identificar BAL nativas de leite cru e queijo minas frescal. Ainda, Furtado (2010), através do isolamento de BAL de queijo frescal produzido a partir de leite de cabra, identificou 10% de seus isolados como sendo produtores de bacteriocinas. Os resultados relatados afirmam mais uma vez que a região de produção influencia na diversidade microbiana e nas características das espécies envolvidas.

Neste estudo, a maioria dos isolados com capacidade de produzir substâncias antimicrobianas de natureza proteica mostrou-se sensível a mais de uma enzima de forma simultânea. Segundo Arauz et al. (2009), a sensibilidade a mais de uma enzima proteolítica sugere a produção concomitante de diferentes bacteriocinas. No entanto, não é possível determinar qual bacteriocina é produzida pelo isolado apenas avaliando-se o perfil de sensibilidade às proteases.

A identificação molecular dos isolados de BAL supostamente bacteriocinogênicas por meio da obtenção e sequenciamento do rDNA 16S demonstrou tratar-se de *Enterococcus durans*.

De acordo com Centeno, Menéndez e Rodríguez-Otero (1996), *E. durans*, *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies mais frequentemente encontradas em produtos lácteos, sendo de grande importância para a produção de alguns queijos típicos. O metabolismo desses microrganismos durante o processo de maturação libera enzimas e compostos aromáticos, responsáveis pelo sabor, aroma e textura desses queijos.

Nos alimentos, os enterococos também podem ser utilizados como culturas protetoras, pois produzem várias substâncias antagonistas, em especial as enterocinas, que agem no controle ou na inibição do desenvolvimento de diversos microrganismos patogênicos; isso é de grande valia para a segurança alimentar e para o controle do crescimento de microrganismos deteriorantes (GIRAFFA, 2002).

## Conclusão

O leite e o queijo artesanal produzido na região da fronteira noroeste do Rio Grande do Sul apresentam bactérias lácticas produtoras de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, supostamente caracterizadas como bacteriocinas.

As bactérias lácticas isoladas podem ser utilizadas como potenciais cultivos iniciadores antimicrobianos, supostamente bacteriocinogênicos, em queijos.

## Agradecimentos

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, pelo financiamento do projeto e ao Pibic/Unijuí pela bolsa de Iniciação Científica.

## Referências

- ARAUZ, L. J. et al. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3-4, p. 146-154, 2009. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056.
- CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007. doi:10.1590/S0101-20612007000100036.
- CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (northwest Spain). **International Journal Food Microbiology**, v. 33, n. 2-3, p. 307-313, 1996. PMID:8930715.
- FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2010.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x.

- HERNANDEZ, D.; CARDELL, E.; ZARATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 77-84, 2005. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02576.x.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. Yogurt: enumerations of characteristic microorganisms count technique at 37 °C. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 117, p. 1-4, 1983.
- JACOBSEN, C. N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999. PMID:10543808.
- LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991. doi:10.1016/0167-7012(91)90014-H.
- LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009. doi:10.1590/S0102-09352009000100037.
- LISBOA, M. P. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amylolique faciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 111-118, 2006. PMID:16835841.
- MARTINIS, E. C. P. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 32-37, 2001. doi:10.1590/S1517-83822001000100008.
- MORAES, P. M. et al. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 9, p. 1320-1324, 2010. doi:10.1016/j.lwt.2010.05.005.
- NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, n. 1, p. 13-126, 1999. PMID:10028126.
- NESPOLO, C. R. **Características microbiológicas e físico-químicas durante o processamento de queijo de ovelha**. 2009. 200 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- SCHITTLER, L. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido-láticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste de Santa Catarina**. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, 2012.
- SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristic of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003. doi:10.1590/S1517-83822003000300016.

Recebido: 04/02/2013

Received: 02/04/2013

Aprovado: 17/04/2013

Approved: 04/17/2013