



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEANDRO PAES DE BRITO

**ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJOS DE COALHO
ARTESANAIS DO SERTÃO NORDESTINO**

Recife
2021

LEANDRO PAES DE BRITO

**ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJOS DE COALHO
ARTESANAIS DO SERTÃO NORDESTINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.

Recife
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Brito, Leandro Paes de

Estudo do potencial tecnológico e molecular de bactérias ácido lácticas de queijos de coalho artesanais do sertão nordestino / Leandro Paes de Brito. - 2021.

80 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Indústria alimentícia. 2. Microbiologia dos laticínios. 3. Queijo – Indústria. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orientadora). II. Soares, Maria Tania Cavalcanti Vieira (coorientadora). III. Título.

641.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-171

LEANDRO PAES DE BRITO

**ESTUDO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJOS DE COALHO
ARTESANAIS DO SERTÃO NORDESTINO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Aprovada em: 22/ 02/ 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Laura Maria Bruno (Examinadora Externa)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de
Fortaleza

Prof^a. Dr^a. Cristiane Pereira de Lima (Examinadora
Externa) Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do
Ceará

Prof^o. Dr^o. José Luiz de Lima Filho (Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice
(Suplente)

Faculdade Senac Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Raimundo Ancelmo e Maria das Neves, os quais sempre estiveram ao meu lado. São minha fonte de inspiração e estímulo. Se alcancei esse sonho, não foi por mim, e sim por vocês!

ESSA VITÓRIA TAMBÉM É DE VOCÊS!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, sem Ele nada disso seria possível. Pela proteção e conforto em todos os momentos, pelas alegrias e conquistas alcançadas.

Com imenso amor e carinho agradeço meus amados pais, Raimundo Ancelmo e Maria das Neves que sempre lutaram para que o melhor fosse oferecido a mim. Obrigado por estarem comigo em todos os momentos, vocês são a minha maior fonte de inspiração. Obrigado por todo o apoio, pela educação investida a mim e por sempre me guiarem pelo caminho correto. A vocês eu dedico este trabalho! Aos meus irmãos Emerson Paes e Diego Paes, que sempre me apoiaram, bem como nosso bem mais precioso, minha sobrinha Maria Alice.

Agradeço imensamente minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Porto por ter aberto as portas do LABTECBIO e me recebido maravilhosamente bem. Sua ternura, gentileza e sabedoria contribuem imensamente para a minha formação acadêmica. A minha Co-orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti também expressei meus agradecimentos, obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência e companheirismo.

A Prof^a. Dr^a. Nara Freitas, a qual seus ensinamentos contribuíram grandemente para minha formação, sua amizade e companheirismo levarei para vida. A Dayane Santos pelos ensinamentos de bioinformática, obrigado pela paciência.

Aos meus amigos e fieis escoteiros de laboratório, os quais divertiam o meu dia e tornavam o ambiente mais prazeroso, Yanara (Anara), Andreza (a loka), Laura (Laurex) e José Noé (Joseph), obrigado por tudo! Vocês são incríveis e os levarei para sempre. Em especial, agradeço a duas companheiras de laboratório que se tornaram grandes amigas, Elaine Silva e Priscilla Calaça, a vocês, meus sinceros agradecimentos! Obrigado por todos os ensinamentos e pela paciência em ajudar com os testes de laboratório, aprendi e estou sempre aprendendo com vocês, foi um prazer enorme.

Agradeço a todos os meus amigos que estão presentes em minha vida desde a graduação, Lydjane, Mateus, Emmily, Henrique, Mikael, Viviane,

Jéssica e Larissa. Durante as aulas do mestrado também fiz grandes amigos, Lucas, Anderson, Ayug, Raísa, Michelle e Rodrigo, a vocês agradeço por todo o companheirismo. Em especial agradeço a minha “bencinha do core”, Ingrid Mendonça, que está sempre comigo, nas lutas diárias, incertezas bem como na felicidade também. Obrigado por tudo, bencinha!!

Por fim, agradeço ao CENAPESQ e LABTECBIO presentes na UFRPE, os quais forneceram a estrutura para realização das análises desta pesquisa.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?” (Fernando Pessoa).

RESUMO

O queijo de Coalho é um produto típico da região Nordeste produzido a partir do leite cru, o que contribui para a presença de uma microbiota bastante diversificada. As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um importante exemplo de microrganismos desejáveis nesses queijos, mas que precisam ser analisados criteriosamente quanto ao seu perfil tecnológico e genômico (para compreensão do comportamento patogênico ou não) e consequentemente indicá-los para utilização na indústria de laticínios. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades tecnológicas e estudo genético de linhagens de bactérias ácido lácticas de queijos de Coalho artesanais do Sertão Nordestino. As espécies do gênero *Enterococcus* e cepas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* foram avaliados quanto a capacidade acidificante, atividade proteolítica, produção de aroma, atividade de β -Galactosidase, tolerância ao cloreto de sódio e atividade antagonista contra diferentes patógenos como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria innocua* ATCC 33090. O estudo de genes e de genômica comparativa foi realizado utilizando sequências de DNA da região 16S ribossomal das cepas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* como sequências de entrada no GenBank, na busca de padrões que possam revelar um comportamento não patogênico das cepas nativas, comparando os elementos genéticos móveis (MGEs) (transposase, integrase, proteína transposon conjugativa e fagos), genes de resistência a antibióticos (ARGs), análise de pan-genoma e alinhamento múltiplo de genomas. Das cepas analisadas, 26,67% foram consideradas rápidas acidificantes, 33,33% foram capazes de produzir enzimas proteolíticas, 26,67% apresentaram atividade enzimática de β -galactosidase e 33,33% foram tolerantes ao cloreto de sódio. Os patógenos foram inibidos por 40,00% das BAL testadas. As cepas de *Enterococcus* apresentaram valores mais elevados quanto ao perfil tecnológico do que as cepas de *S. infantarius subsp. infantarius*, em especial a cepa *Enterococcus faecium* KT990027. Em relação ao perfil genômico das cepas de *S. infantarius*

subsp. infantarius, as quatro cepas analisadas apresentaram similaridade genômica com a cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 isolada de laticínios africanos que, após a comparação com os genomas completos de *Streptococcus thermophilus* de origem alimentar e *Streptococcus agalactiae* patogênico, demonstraram ausência de genes de patogenicidade. Assim, podemos concluir que *E. faecium* KT990027 pode ser usada como cultura iniciadora, pois apresentou as melhores características tecnológicas gerais aplicáveis a este tipo de cultura. Além disso, a genética comparativa e mobilidade de genes realizadas com as quatro cepas de *S. infantarius subsp. infantarius*, revelaram um potencial tecnológico seguro.

Palavras-Chave: Queijo de Coalho; Bioprospecção; Indústria de laticínios; Elementos Genéticos Móveis; Genética comparativa

ABSTRACT

Coalho cheese is a typical product from the Northeast region produced from raw milk, which contributes to the presence of a very diverse microbiota. Lactic acid bacteria (LAB) are an important example of desirable microorganisms in these cheeses, but they need to be carefully analyzed for their technological and genomic profile (to understand pathogenic behavior or not) and consequently indicate them for use in the dairy industry. The present work had as objective to evaluate the technological properties and genetic study of strains of lactic acid bacteria from handmade Coalho cheeses from the Sertão Nordestino. Species of the genus *Enterococcus* and strains of *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* were evaluated for acidifying capacity, proteolytic activity, aroma production, β -Galactosidase activity, sodium chloride tolerance and antagonistic activity against different pathogens such as *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Listeria innocua* ATCC 33090. The study of genes and comparative genomics was performed using DNA sequences from the ribosomal 16S region of the strains of *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* as entry sequences in GenBank, in the search for patterns that may reveal non-pathogenic behavior of native strains, comparing mobile genetic elements (MGEs) (transposase, integrase, conjugative transposon protein and phages), antibiotic resistance genes (ARGs), pan-genome analysis and multiple genome alignment. Of the strains analyzed, 26.67% were considered fast acidifiers, 33.33% were able to produce proteolytic enzymes, 26.67% had β -galactosidase enzymatic activity and 33.33% were tolerant to sodium chloride. The pathogens are inhibited by 40.00% of the tested LAB. The strains of *Enterococcus* showed higher values in terms of technological profile than the strains of *S. infantarius subsp. infantarius*, in particular the *Enterococcus faecium* KT990027 strain. Regarding the genomic profile of the strains of *S. infantarius subsp. infantarius*, the four strains analyzed showed genomic similarity with the *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 isolated from African dairy products that, after comparison with the complete genomes of food-borne *Streptococcus thermophilus* and pathogenic *Streptococcus agalactiae*, demonstrated the absence of pathogenicity genes. Thus, we can conclude that *E. faecium* KT990027 can be used as a starter culture, as it presented the best general

technological characteristics applicable to this type of culture. In addition, comparative genetics and gene mobility performed with the four strains of *S. infantarius subsp. infantarius*, revealed a safe technological potential.

Keywords: Bioprospecting; Coalho cheese; Comparative genetics; Dairy industry; Mobile Genetic Elements

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1- Imagem esquemática das etapas de fabricação de queijos de Coalho produzidos no Estado da Paraíba (Imagem adaptada de MEDEIROS, 2016)	24
--	----

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO II

Figura 1 –Similaridade entre <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> (KT990067, KT990068, KT990070, KT990071) isolados de queijo de coalho da Paraíba e <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> CJ18 de leite fermentado africano.....	69
Figura 2 –Presença de elementos genéticos móveis nos cromossomos das cepas de <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	69
Figura 3 –Presença de fagos nos genomas completos de <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	71
Figura 4 –Ilhas de patogenicidade de <i>Streptococcus thermophilus</i> ST106.....	71
Figura 5 –Ilhas de patogenicidade de <i>Streptococcus infantarius subsp. Infantarius</i> CJ18.....	72
Figura 6 –Ilhas de patogenicidade de <i>Streptococcus agalactiae</i> SAG153.....	72
Figura 7 –Sintenia entre <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> CJ18, <i>Streptococcus thermophilus</i> ST106 e <i>Streptococcus agalactiae</i> SAG155.....	73

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO I

Tabela 1 – Propriedades tecnológicas das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal do Sertão da Paraíba	41
Tabela 2 – Média dos halos de inibição (mm) do antagonismo <i>in vitro</i> de amostras de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal do Sertão da Paraíba frente bactérias indicadoras	46

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO II

Tabela 1 – Cepas de <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> com genomas completos registrados no GenBank	68
Tabela 2 – Genes de resistência a antibióticos nos cromossomos de <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	68
Tabela 3 – Proteínas de adesão e citolisinas encontradas em <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> CJ18, <i>Streptococcus thermophilus</i> (ST106, CS18, IDCC2201, APC151) e <i>Streptococcus agalactiae</i> (SAG153, NJ1606).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>E. durans</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>E. mundii</i>	<i>Enterococcus mundii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	<i>E</i> outros
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. infantarius subsp. infantarius</i>	<i>Streptococcus infantarius subsp. Infantarius</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>

LISTA DE SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijos
ATCC	American Type Culture Collection
ARG	Genes de Resistência a antibióticos
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
CARD	Comprehensive Antibiotic Resistance Database
CENAPEQ	Centro de Apoio à Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FACEPE	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
GDP	Global Dairy platform
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguros
LABTECBIO	Laboratório de Tecnologia de Bioativos
LDR	Leite desnatado reconstituído
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MGE	Elementos Genéticos Móveis
MM	Milímetros
ML	Mililitros
MRS	Man Rogosa e Sharpe
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ONPG	O- nitrofenol- β -D-galactopiranosideo
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PH	Potencial Hidrogeniônico
SBSEC	<i>Streptococcus bovis</i> / <i>Streptococcus equinus</i>
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

UFRPE

Universidade Federal Rural de Pernambuco

μL

Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2. 1	Queijo de Coalho	22
2. 2	Bactérias ácido lácticas.....	25
2. 2. 1	<i>Enterococcus</i>	26
2. 2. 2	<i>Streptococcus</i>	27
2. 3	Potencial tecnológico das BAL.....	27
2. 4	Elementos Genéticos Móveis em genomas procarióticos.....	29
3	RESULTADOS	33
3.1	ARTIGO 1 – Bactérias ácido lácticas na isoladas de queijo de Coalho brasileiro na produção de laticínios: Uma triagem para aplicação tecnológica.....	33
3.2	ARTIGO 2 – <i>Streptococcus infantarius subsp. infantarius</i> : patogênico ou potencial biotecnológico, como saber?.....	55
4	CONCLUSÃO	74
5	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O queijo é uma das iguarias mais consumidas pelos brasileiros, fazendo parte do cardápio da população de qualquer região do país. O setor de laticínios no Brasil, apresenta elevada importância socioeconômica. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ) o mercado nacional de queijos movimentou cerca de 19 milhões nos anos de 2014 e 2015 e a estimativa é positiva em relação ao aumento no consumo nos próximos anos.

A maioria das regiões brasileiras apresentam uma tradição de consumo de produtos artesanais. O queijo de Coalho é um produto típico da região Nordeste, com destaque nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Devido a suas características, é um dos queijos mais tradicionais e possui um processo de fabricação simples com pouca tecnologia. Os queijos de coalho artesanais são alimentos fermentados elaborados a partir do leite cru (não pasteurizado), que contribui para a presença de uma microbiota bastante diversificada de microrganismos desejáveis e indesejáveis. As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um importante exemplo de microrganismos desejáveis nos queijos de Coalho.

As BAL são utilizadas na produção de muitos produtos fermentados, por serem GRAS (*Generally Recognized As Safe*) modificam e melhoram a qualidade do alimento, além de benefícios nutricionais e terapêuticos (MUÑOZ et al. 2010). São caracterizadas como Gram positivas, anaeróbicas facultativas, catalase negativas, com forma de cocos, cocobacilos ou bacilos não formadoras de esporos. De acordo com o produto final da fermentação, as BAL se dividem em bactérias homofermentativas, que utilizam a via glicolítica para transformar a glicose em ácido láctico, ou heterofermentativas, que produzem a partir da glicose o dióxido de carbono, ácido acético, etanol e o ácido láctico pela via da fosfoacetolase (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010). Entre os gêneros que compõem este grupo, os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* são os mais conhecidos (YERLIKAYA, 2018).

As BAL têm importante função na melhoria e tecnologia da fabricação dos queijos de Coalho por possuírem propriedades que acentuam as características sensoriais como sabor, textura, aroma e participarem do

processo fermentativo (MORAES et al. 2013), além de produzirem compostos antagonistas que contribuam com a segurança microbiológica do alimento, inibindo microrganismos patogênicos e deteriorantes, e redução da microbiota intestinal indesejável dos hospedeiros.

No entanto, para a utilização das BAL em aplicações tecnológicas de laticínios, o genoma desses microrganismos devem estar livres de genes de patogenicidade e virulência. Em particular, os genomas de BAL são bem conhecidos por abrigar genes e *loci* envolvidos com a mobilidade genética, como sequências de inserção ou transposons conjugativos integrativos. Estes ativamente podem conferir a absorção de funções vantajosas, perda de locais dispensáveis ou possível disseminação de genes indesejados, portanto, desempenham um papel ativo na especiação e adaptação de nicho em ambientes alimentares (GAWRYSZEWSKA et al. 2017).

A triagem do potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas e o estudo molecular genômico em busca de padrões de patogenicidade e virulência é de extrema importância para indústria de alimentos devido a promoção de diversas informações acerca de suas características que são avaliadas para uso adequado e aplicabilidade em produtos funcionais. Isso contribui tanto para a saúde dos consumidores como para o desenvolvimento econômico regional, em especial para o Nordeste brasileiro, onde o Queijo de Coalho é destaque como uma das principais fontes de renda.

1.1 OBJETIVOS

1. 1. 1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades tecnológicas e estudos moleculares de linhagens de Bactérias Ácido Láticas de queijos de Coalho artesanais do Sertão Nordestino

1. 1. 2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de acidificação das bactérias ácido láticas;
- Analisar o perfil proteolítico das BAL;
- Investigar a capacidade de produção da enzima β -galactosidase;
- Avaliar a capacidade de produção de aroma (diacetil);
- Investigar a capacidade de tolerância ao NaCl;
- Avaliar a capacidade antagonista das BAL frente a patógenos;
- Analisar os elementos genéticos móveis de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* e cepas relacionadas;
- Investigar os genes de resistência a antibióticos de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* e cepas relacionadas;
- Analisar o perfil pan-genômico de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* e cepas relacionadas;
- Examinar as ilhas de patogenicidade e o alinhamento de múltiplos genomas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* e cepas relacionadas;

2 RERERENCIAL TEÓRICO

2.1 QUEIJO DE COALHO

O leite é um dos produtos agropecuários mais importantes do mundo, estando entre os cinco produtos mais comercializados, tanto em volume quanto em valor (Global Dairy Platform-GDP, 2017). Além da sua importância econômica como fonte de renda, o leite também é uma fonte vital de nutrição que contém altas concentrações de proteínas, minerais e vitaminas importantes para o desenvolvimento humano. Pode ser consumido na sua forma original ou ser transformado em diversos produtos, especialmente em queijos (SIQUEIRA, 2019).

A fabricação de queijos, é uma prática realizada há décadas e seu surgimento se deu a partir das dificuldades em armazenar e distribuir a matéria prima (PAQUEREAU et al. 2016). Em particular, a prática de produção de queijo de Coalho provavelmente tenha se desenvolvido pelas mesmas dificuldades. A tecnologia de produção inicial foi trazida pelos colonizadores, ganhou características específicas locais, e assim, foi estabelecido nas tradições familiares. A princípio, sua produção era apenas para o consumo doméstico, mas ao longo do tempo ganhou espaço entre os principais produtos comercializados (PAQUEREAU et al. 2016).

Segundo o decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o queijo de Coalho é aquele que se obtém a partir da coagulação do leite através do coalho natural ou enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de microrganismos selecionados e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação.

O queijo de Coalho é um alimento típico brasileiro produzido a partir de leite cru ou pasteurizado na Região Nordeste há mais de 150 anos. As principais características desse queijo é o seu sabor levemente salgado e ácido e sua resistência ao calor sem derreter, o que permite a preparação do “popular” queijo assado (AMARANTE, 2015). É fabricado em quase todos os estados nordestinos, podendo ser produzidos através de massa crua, como os processados em Pernambuco (PAQUEREAU et al. 2016) ou semicozida

como os produzidos na Paraíba (TRAVASSOS, 1996), Ceará e Rio Grande do Norte (NASSU et al. 2003).

A produção de queijos de Coalho é realizada em pequenas agroindústrias familiares que tem como principal base de comercialização a economia informal, sendo significativo na renda desses produtores, especialmente daqueles que não têm acesso a unidades de processamento de leite (QUEIROGA et al. 2013). Mensalmente, o comércio de queijos de Coalho gera em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza ser uma atividade importante em termos social e econômico na região (PERRY, 2004).

A popularidade e o consumo elevado pela população devem-se a características sensoriais específicas dos queijos de Coalho que estimulam os sentidos e provocam vários graus de reações de desejo e aceitação pelos consumidores (MEDEIROS et al. 2016). Características organolépticas como sabor, aroma, textura e até a resistência quando aquecido, são as mais exigidas pelos consumidores de queijos de Coalho e esses fatores estão mais intensos em queijos de leite cru do que os produzidos a partir do leite pasteurizado devido à biodiversidade de bactérias ácido lácticas que ocorrem naturalmente como microbiota autóctone no leite cru (MONTEL et al. 2014; DIAS et al., 2019).

As etapas de fabricação do queijo de coalho da Paraíba são apresentadas por Medeiros (2016), em um fluxograma (figura 1), As etapas do processo de fabricação são recessão, filtragem e pesagem do leite integral cru; adição de coalho comercial; repouso por 40 minutos; corte da coalhada; repouso; aquecimento da coalhada (realizada por alguns produtores); dessoragem; enformagem e prensagem; salga (podendo ser feita na massa da coalhada ou na superfície do queijo); embalagem e armazenamento (temperatura ambiente ou refrigeração), embora o produto seja bastante difundido regionalmente, não existem dados estatísticos oficiais para sua produção.

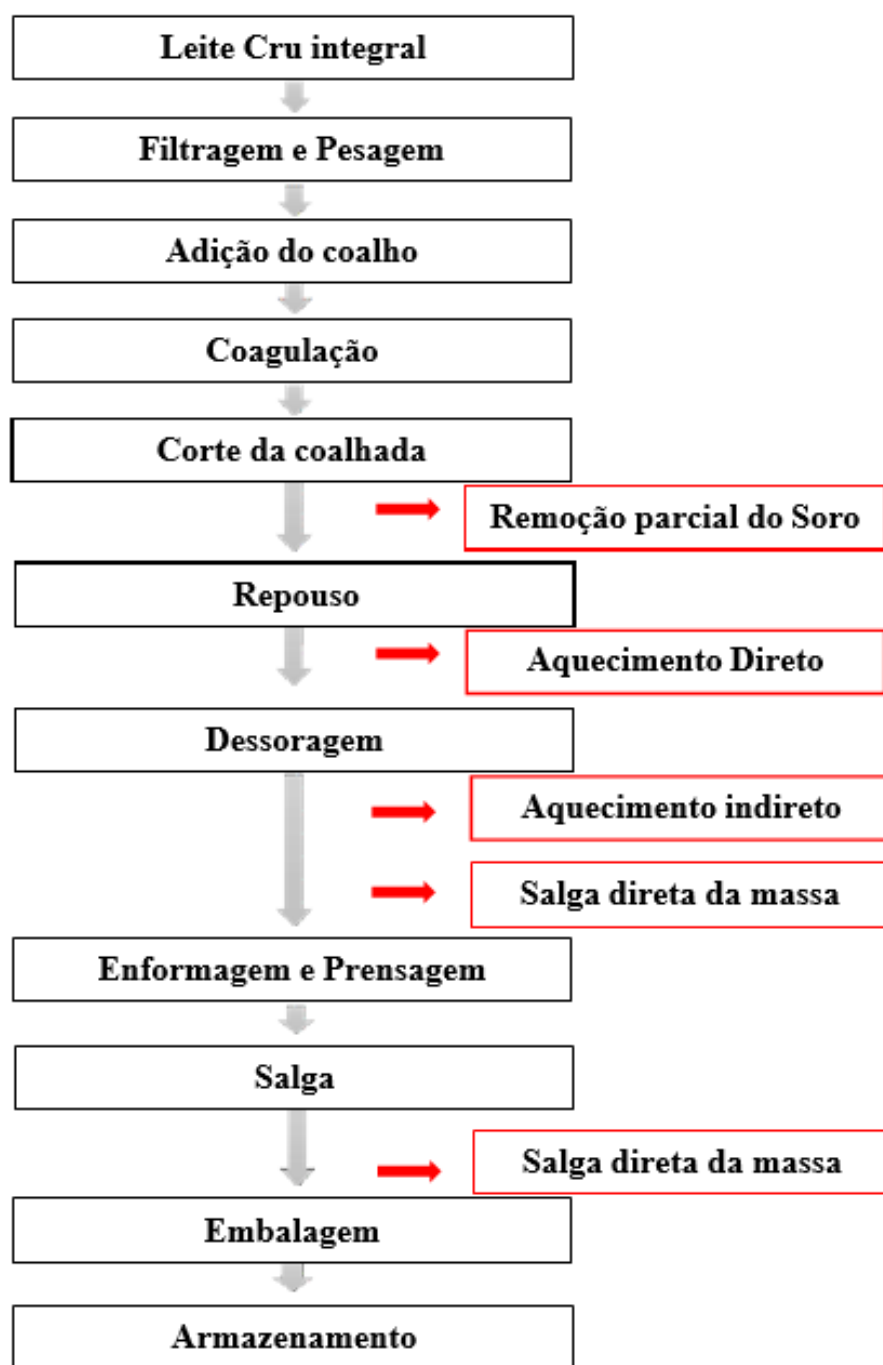


Figura 1: Imagem esquemática das etapas de fabricação de queijos de Coalho produzidos no Estado da Paraíba (Imagem adaptada de MEDEIROS, 2016).

2. 2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As BAL participam de um grupo de microrganismos que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Possuem forma de bacilos, cocos ou cocobacilos, Gram positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos, anaeróbicas facultativas, capazes de realizar fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose e produzem ácido lático como produto da fermentação dos açúcares (TAMANG et al. 2016).

Podem serem mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de se desenvolver em temperaturas entre 5 a 45°C. Normalmente suportam pH de até 3,8 e sintetizam um número elevado de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas (LIMA et al. 2009).

Alguns dos gêneros representantes deste grupo são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e outros (HOLZAPFEL et al. 2002; YERLIKAYA, 2018).

As bactérias ácido lácticas estão naturalmente presentes no leite cru ou são adicionadas intencionalmente durante o processo de fabricação de queijos por estarem associadas a propriedades como sabor, textura e aroma dos produtos lácteos e são amplamente empregadas como culturas iniciadoras em diversos produtos dessa indústria (CARR et al. 2002).

Na fermentação dos alimentos o papel das BAL é duplo, podem participarem na degradação dos carboidratos presentes na matéria prima, contribuindo para o aumento da vida útil do produto, devido a redução do pH, tornando o meio inadequado para microrganismos deteriorantes e patogênicos, além disso, algumas BAL também são capazes de produzir peptídeos antagônicos contra outras bactérias (MADERA et al. 2003), o que tem promovido seus estudos como agentes bioprotetores (PEYER et al. 2016). Características importantes que contribuíram para o consentimento do *status* de GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (HAN et al. 2017).

Além disso, algumas BAL possuem a capacidade de aderência e

sobrevivência frente as condições do trato gastrointestinal dos hospedeiros, atuando principalmente sobre a estabilidade e proteção deste ambiente, além de contribuírem benéficamente para o sistema digestivo e os processos do metabolismo, bem como na modulação da resposta imune local e sistêmica (GARCÍA-HERNANDÉZ et al., 2016). Sendo assim, diversas cepas deste grupo são caracterizadas e comercializadas como as bactérias probióticas de promoção à saúde (SAVIJOKI et al. 2006).

2.2.1 *Enterococcus*

Bactérias desse gênero são em forma de coco individuais, aos pares ou em cadeias curtas, não esporuladas, catalase negativa, anaeróbico facultativo e homofermentativa, cujo principal produto da fermentação é o ácido lático L(+) (DEVRIESE & POT, 1995).

A comum ocorrência desses micro-organismos no trato gastrointestinal de animais, aliado a capacidade de sobreviver a condições adversas, como pH entre 4,5- 10, temperaturas entre 5-65°C e salinidade extrema fazem desses, micro-organismos indicadores de contaminação (CARIDI et al., 2003). Contudo, sabe-se que sua utilização como indicador de contaminação fecal é limitada em função da inespecificidade do hospedeiro, uma vez que são frequentemente isolados de água, plantas e alimentos, compondo a microbiota de diversos produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2002).

A presença desses micro-organismos na microbiota natural de queijos artesanais é de extrema importância devido ao desenvolvimento de características sensoriais dos queijos, pela produção de compostos aromáticos e enzimas que contribuem na textura, sabor, aroma dos queijos, e pela produção além de bacteriocinas, substâncias antimicrobianas com espectro de inibição a patógenos como *Listeria* spp. e *Clostridium* spp. (GIRAFFA, 1997). Contudo, a alta incidência desse gênero em queijos industrializados produzidos a partir do leite pasteurizado, geralmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a sua elaboração (GIRAFFA, 2003b).

O Advisory Committee on Novel Foods and Processors (ACNFP) permite o uso de *E. faecium* K77D como fermento lácteo em produtos

fermentados. No entanto, a resistência de espécies do gênero a antibióticos e evidências e relatos de sua ocorrência em infecções humanas tem gerado controvérsias sobre seu uso na tecnologia alimentar (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

2.2.2 *Streptococcus*

O *Streptococcus thermophilus* compreende um grupo de bactérias Gram-positivas, em forma de cocos, anaeróbicos facultativos, homofermentativa com produção de L(+) lactato, acetaldeído e diacetil a partir da lactose do leite (ROBINSON, 2002).

Streptococcus thermophilus é a única espécie do gênero utilizada nas fermentações lácteas sendo amplamente utilizada como cultura iniciadora para a produção de iogurtes, queijos e leites fermentados (ROBINSON, 2002). Na fermentação láctea o papel do *S. thermophilus* está relacionado a sua rápida conversão de lactose em ácido láctico, causando uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008).

Esta espécie é diferenciada das demais pela sua resistência ao aquecimento, pois cresce bem a 45°C e também a 52°C, conseguindo sobreviver ao aquecimento de 60°C por 30 minutos (HARDIE & WHILEY, 1995). Contudo, são capazes de fermentar um pequeno número de carboidratos e suporta concentração máxima de NaCl de até 2,5% (HASSAN & FRANK, 2001).

A maior parte dos produtos lácteos submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação é acidificada pelo crescimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus spp* (CARVALHO, 2007). Em ensaios *in vitro* apresentou propriedade anti-inflamatória, sendo ferramenta eficaz como probiótico (LAMMERS et al., 2003).

2.3 POTENCIAL TECNOLÓGICO DAS BAL

A escolha, compra, aceitação e preferência do consumidor formam um processo que envolve as características sensoriais do produto e que

influenciam fortemente a sua aceitação (SABBE et al. 2009). Nos últimos anos, a demanda do consumidor por alimentos com altos valores nutricionais, seguros e benéficos a saúde tem aumentado (OLIVEIRA et al. 2012). A fermentação provocada pelas bactérias ácido lácticas é um método conveniente para melhorar a qualidade nutritiva dos alimentos e conceder atributos sensoriais importantes (HUANG et al. 2011).

As bactérias ácido lácticas podem desempenhar papéis diferentes durante a fabricação de queijos, algumas espécies participam do processo de fermentação, enquanto outros são encontrados na maturação do queijo. No primeiro caso, as BAL fermentam rapidamente a lactose produzindo altas concentrações de ácido láctico e são designados como BAL iniciadoras, enquanto as BAL responsáveis pelo processo de amadurecimento são indicadas como BAL não iniciadoras. Além disso, a produção de ácido láctico pela microbiota *starter* (responsáveis pela rápida acidificação do substrato) durante a fabricação do queijo, que resulta na diminuição do pH do leite e em combinação com a agitação da massa, promove a sinérese da coalhada e a expulsão do soro de leite (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Outra importante propriedade tecnológica das BAL está associada à sua capacidade de produzir proteases extracelulares, que desempenham um papel importante na degradação da caseína e dos peptídeos, levando à produção de aminoácidos livres (MUKISA et al. 2016). Esses aminoácidos produzidos a partir dos sistemas proteolíticos de bactérias iniciadoras podem ter impacto direto no sabor ou servir como precursores do sabor nesses produtos, além de também serem essenciais no crescimento das BAL e parâmetros fundamentais na ecologia microbiana do produto (VASIEE et al. 2014).

As BAL presentes nos laticínios também são responsáveis pela produção de diacetil ou acetoína, compostos voláteis gerados como produtos finais do metabolismo do citrato, que dá ao queijo sabores amanteigados e desenvolve odores intensos (MUKISA et al. 2016). Além disso, as BAL produzem outros compostos aromáticos, como ácido acético, etanol, várias enzimas e bacteriocinas (HAITI et al. 2014). No entanto, a biodiversidade das BAL e todas as qualidades alimentares atribuídas para eles, pode se extinguir

quando o leite utilizado na produção de queijos artesanais for pasteurizado.

As BAL também podem participar na ampliação do prazo de validade dos alimentos. A segurança alimentar conferida por esse grupo é decorrente da síntese de substâncias antimicrobianas, responsáveis por produzir um microambiente desfavorável a diversos microrganismos, inclusive aqueles com potencial patogênico, sendo este fator a base de inúmeros métodos de conservação de alimentos por fermentação (PRIYODIP et al. 2017). Essa atividade antimicrobiana é devido a síntese de agentes antagonistas incluindo ácido láctico, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (QUIGLE et al. 2013). Sendo as bacteriocinas peptídeos sintetizados nos ribossomos das BAL e outras bactérias com espectro de inibição a patógenos como *Listeria* spp., *Clostridium* spp. e *Escherichia coli*, microrganismos comumente encontrados em queijos artesanais (SHORI, 2015).

As indústrias de laticínios precisam de produtos novos e aprimorados com base em fermentações de BAL, e estão constantemente em busca de cepas que possam contribuir com características sensoriais desses alimentos (KANDASAMY et al. 2016). Em particular, os genomas de BAL são bem conhecidos por abrigar genes e loci envolvidos com a mobilidade genética, como sequências de inserção ou transposons conjugativos integrativos. Estes ativamente podem conferir a absorção de funções vantajosas, perda de locais dispensáveis ou possível disseminação de genes indesejados, portanto, desempenham um papel ativo na especiação e adaptação de nicho em ambientes alimentares (GAWRYSZEWSKA et al. 2017).

2.4 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS EM GENOMAS PROCARIÓTICOS

A genômica comparativa está bem estabelecida em bactérias ácido lácticas (MAKAROVA et al. 2006) e promove avanços no conhecimento de como as espécies de BAL se diversificaram por meio de alterações genéticas (SMOKVINA et al. 2013). O genoma bacteriano é composto de um esqueleto genômico central decorado com uma variedade de elementos funcionais multifacetados, como os elementos genéticos móveis (MGEs) (ALVARENGA et al. 2018).

Elementos transponíveis ou elementos genéticos móveis foram

descobertos por Barbara McClintock durante experimentos conduzidos em 1944 com milho. Como eles pareciam influenciar os traços fenotípicos, ela os chamou de elementos controladores. No artigo original, eles escreveram: “Elementos genéticos foram encontrados em organismos superiores que parecem ser facilmente transpostos de um local para outro no genoma. Tais elementos, identificáveis por suas funções de controle, foram descritos por McClintock em milho. É possível que eles possam ser de alguma forma análogos às sequências inserções (IS) atualmente estudadas” (MALAMY et al. 1972).

Os MGEs são geralmente subestimados, afetando a qualidade de anotação e potencialmente afetando as análises do genoma a jusante. Transposons (Tn), Sequências de Inserção, Profagos, Repetições Palindrômicas Curtas com Espaçamento Regular e Agrupado (CRISPRs), Ilhas Genômicas (GEIs), Integrons e Elementos Integrativos e Conjugativos (ICEs) são os MGEs mais comuns encontrados em genomas procariontes e suas propriedades e comportamento são importantes em eventos de transferência lateral de genes (LGT) (ALVARENGA et al. 2018).

Esses elementos são conhecidos por promover expansão e rearranjos genômicos, o surgimento de virulência, patogenicidade e simbiose, e, portanto, desempenham papéis importantes como um condutor de instabilidade genômica e elementos regulatórios (ALVARENGA et al. 2018). Assim, a identificação de novos MGEs em genomas individuais e a análise de sua dinâmica são importantes para um melhor entendimento da instabilidade do genoma como um dos fatores responsáveis por infecções, contaminações e doenças (BAE et al. 2018).

Trabalhos anteriores investigaram elementos genéticos móveis no LAB (DAHMANE et al. 2017). No entanto, sem fenótipos conhecidos associados ao MGE, a previsão de ambos os novos MGE e suas funções codificadas associadas é difícil (JOHNSON & GROSSMAN, 2015), e abordagens mais sistemáticas são necessárias para compreender a diversidade genética e o impacto na fisiologia no nível das espécies. Além disso, apesar do uso rotineiro de sequenciamento de genoma, os genomas das BAL são ricos em *loci* de sequências de inserção altamente semelhantes e redundantes,

que dificultam a identificação de MGE quando flanqueado por genes de transposase (DARMON & LEACH, 2014).

CAPÍTULO I

(Artigo publicado na revista *Research, Society and Development*, Qualis A3)

3 RESULTADOS

Research, Society and Development, v. 9, n. 10, e5249108457, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8457>

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

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

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

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

Leandro Paes de Brito

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

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: leandropaes02ufpe@gmail.com

Elaine Cristina da Silva

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

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: e.csilva2@outlook.com

Priscilla Régia de Andrade Calaca

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

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: priscilla.calaca@hotmail.com

Rosália Severo de Medeiros

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

Universidade Federal de Campina Grande, Brasil

E-mail: medeiros.rsm@gmail.com

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

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

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br

Ana Lúcia Figueiredo Porto

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

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

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

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

Abstract

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

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

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

Resumen

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

2. Metodologia

2.1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo

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

2.2 Avaliação da capacidade acidificante

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

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

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

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

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

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

2.4 Determinação da atividade enzimática de β -galactosidase

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

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

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

2.5 Tolerância ao Cloreto de Sódio

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

2.6 Avaliação da atividade antagonista

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

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

2.7 Análise estatística

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

3. Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da atividade acidificante

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

apresentou as maiores variações de acidificação ΔpH 1,46 e ΔpH 2,66 a 6 e 24h, respectivamente (Tabela 1).

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

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

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

Fonte: Elaborado pelos autores

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

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

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

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

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

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

3.2 Determinação da atividade proteolítica e produção de diacetil

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

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

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

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

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

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

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

3.3 Determinação da atividade enzimática de β -galactosidase

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

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

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

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

3.4 Tolerância ao cloreto de sódio

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

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

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

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

3.5 Determinação da atividade antagonista

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

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

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

Fonte: Elaborado pelas autoras.

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

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

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

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

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

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

4. Conclusão

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

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

Agradecimentos

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

Referências

- Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-year review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, (100), 9987–10013.
- Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., & Papademas, P. (2016). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, (73), 81-90. Doi: 10.1016/j.foodcont.2016.05.022.
- Aspri, M., O'Connor, P. M., Field, D., Cotter, P. D., Ross, P. R., Hill, C., & Papademas, P. (2017). Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, (73), 1-9. Doi: 10.1016/j.idairyj.2017.04.008.

- Banwo, K., A. Sanni, A., & Tan, H. (2013). Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (1), 229-241.
- Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Canamero, M. M., Gálvez, A., & Manai, M. (2009). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21 (4), 462-470. Doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.007.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy*, (11), 259-274.
- Cabral, M. L. B., Lima, M. S. F., Araújo, G. A., Costa, E. F., Porto, A. L. F., & Cavalcanti, M.T. H. (2016). Queijos artesanais fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. *Journal of bioenergy and food Science*, 3(4), 207-215. doi:10.18067/jbfs. v3i4.111.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., & Fernandes, I. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, (64), 409-421.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(2), 451– 460.
- Dias, G. M. P., Silva, A. B., Granja, N. M. C., Silva, T. N., Lima, G.V. M., Cavalcanti M. T. H., & Porto, A. L. F. (2019). Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? *Scientia Plena*, 15 (2), 1-9. Doi: 10.14808/sci.plena.2019.021501.
- Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, (63), 178-190. Doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2017). Recuperado de [file:///C:/Users/leand/Downloads/projecoas_agronegocio_2017_2_web%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/leand/Downloads/projecoas_agronegocio_2017_2_web%20(4).pdf).

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

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

- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, (106),1-24.
- Nagy, Z., Kiss, T., Szentirmai, A., & Biró, S. (2001). β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification and characterization of the enzyme. *Protein Expr Purif*, 21(1), 24-29. Doi: 10.1006 / prep.2000.1344.
- Pailin, T., Kang, D. H., Schmidt, K., & Fung, D. Y. C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Applied Microbiology*, (33)45–49.
- Papademas, P., & Aspri, M. (2014). Dairy pathogens: Characteristics and impact. In P. Papademas (Ed.), *Dairy microbiology: A practical approach* (pp. 69-113). New York, NY, USA: CRC Press.
- Ribeiro, S. C., Costa, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (3), 573-585.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ahrens, F., & Barth, C. A. (2020). Atributos nutricionais e de saúde do leite e imitações do leite. *Eur J Nutr* (59), 19–34. Doi: 10.1007/s00394-019-01936-3.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, (27), 691-697.
- Silva, F. T. (2005). *Queijo Mussarela*. Brasília: Embrapa.
- Silvério, S. C., Macedo, E. A., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2018). New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresour. Technol.* (250), 131-139. Doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.045.

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

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

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

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

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

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Leandro Paes de Brito – 45%

Elaine Cristina da Silva – 5%

Priscilla Régia de Andrade Calaça – 5%

Rosália Severo de Medeiros – 5%

Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – 20%

Ana Lúcia Figueiredo Porto – 20%

CAPÍTULO II

(Artigo a ser submetido à revista *OMICS: Journal of Integrative Biology*)

Streptococcus infantarius subsp. infantarius isolados de queijos de Coalho do Nordeste do Brasil: patogênico ou potencial biotecnológico, como saber?

Leandro Paes de Brito¹, Dayane da Silva Santos², Rosália Severo de Medeiros³, Nara Suzy Aguiar de Freitas⁴, Paulo Roberto Eleutério de Souza⁴, Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares⁵, Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵

¹Centro de Biociência, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil.

⁴Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁵Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

Resumo

Streptococcus infantarius subsp. infantarius é membro do complexo *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* (SBSEC), um grupo de patógenos oportunistas. No entanto, ultimamente tem sido relatado positivamente em fermentações lácticas. Um estudo dos genes e de genômica comparativa se torna importante para determinar a relação de patogenicidade ou não de cada membro do grupo. Sequências de DNA da região 16S ribossomal das cepas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* nativas de queijos de Coalho da Paraíba-Brasil foram usadas como sequências de entrada no GenBank, na busca de padrões que possam revelar um comportamento não patogênico das cepas nativas, comparando os elementos genéticos móveis (MGEs), genes de resistência a antibióticos (ARGs), análise de pan-genoma e alinhamento múltiplo de genomas. A cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 isolada de laticínios africanos foi a única que retornou com genoma completo e posteriormente foi comparada com os genomas completos de *Streptococcus thermophilus* de origem alimentar e *Streptococcus agalactiae* patogênico. As espécies estudadas revelaram uma dinâmica de rearranjos de blocos de sequências antes desconhecidas. A genética comparativa e mobilidade de genes permitiram identificar padrões de similaridades entre patogênicos e não patogênicos, indicando que cada isolado precisa ser estudado separadamente, e que as cepas de ambiente nativo apresentam potencial biotecnológico.

Palavras-Chave: Elementos genéticos móveis; Genômica comparativa; Potencial biotecnológico; *S. Infantarius subsp. infantarius*

Introdução

O gênero *Streptococcus* spp. apresenta uma ampla variedade de espécies que diferem entre si de acordo com sua fisiologia, bioquímica, características moleculares, aplicações e origens. São caracterizados como cocos Gram-positivos, imóveis, ocorrendo em pares ou em cadeias curtas, não esporuladas e catalase negativa (Du Toin et al., 2014; Santos, KMO. et al., 2020).

O complexo *Streptococcus bovis/ Streptococcus equinus* (SBSEC), um grupo altamente diversificado inclui habitantes comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais (Jans et al., 2012b) e patógenos oportunistas associados a várias infecções incluindo bacteremias, endocardites, meningites e diarreias (Boleij et al., 2011). *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* é um membro do SBSEC e embora sua patogenicidade seja pouco conhecida Biarc et al. (2004) e Corredoira et al. (2008) relatam isolados com genes para proteínas pró-inflamatórias com participações em casos de câncer não colônico.

No entanto, Jans et al. (2013a) e Wullschleger et al. (2013) ao analisarem produtos lácteos fermentados africanos como suusac, gariss e fènè detectaram isolados de *S. infantarius subsp. infantarius*, predominante, cerca de 10^8 UFC/mL, entre as bactérias ácido lácticas (BAL). Desde então, o conhecimento acerca de seu potencial em fermentações cresceu e revelou novas percepções sobre sua evolução e adaptação ao ambiente lácteo. A habilidade de crescimento em produtos fermentados foi caracterizada por Jans et al., (2016a) pelas adaptações fenotípicas e genotípicas no metabolismo da lactose.

A captação da lactose é mediada pelo sistema galactose-lactose codificado no Operon Gal-Lac pelos genes LacS/Z, um recurso que segundo Jans et al. (2013a) está ausente entre outros membros do SBSEC e homólogo a *Streptococcus thermophilus*, a única espécie estreptocócica classificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) e amplamente utilizada como cultura inicial em laticínios (Leuschner et al., 2010).

No momento, temos apenas dois genomas completos de *S. infantarius subsp. infantarius* disponíveis no GenBank. A cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 isolada de laticínios africanos e a cepa *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 patogênica isolada de fezes humanas (Jans et al., 2013a). Dada a relação taxonômica com membros patogênicos do SBSEC, predominância e adaptação paralela a *S. thermophilus*, seu papel nas fermentações lácticas tem sido discutido e algumas questões permanecem. Será que as cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* são seguras para aplicação tecnológica? É possível diferenciar um *S. infantarius subsp.*

infantarius patogênico de um não patogênico?_

O ponto de partida pode ser o estudo de genomas relacionados, por exemplo, comparar espécies do mesmo gênero e analisar genes que sejam considerados patogênicos. O gênero *Streptococcus* spp. apresenta uma diversidade quanto a segurança de seus membros, desde patógenos de relevância para a saúde pública, como *Streptococcus agalactiae*, até microrganismos utilizados em fermentações lácticas, como *S. thermophilus* (Jans et al., 2017).

Diante disto, este estudo teve como objetivo comparar as sequências de 16S rDNA de isolados de *S. infantarius subsp. infantarius* nativas do queijo de Coalho do Sertão da Paraíba-Brasil com genomas relacionados e completamente sequenciados em busca de padrões de virulência e seus respectivos elementos genéticos móveis para tornar o uso das cepas nativas mais seguro.

Material e Métodos

Bactérias ácido lácticas utilizadas no estudo

Foram analisadas neste estudo quatro cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* (KT990067; KT990068; KT990070; KT990071) isoladas de queijos de Coalho do Sertão da Paraíba-Brasil. Essas cepas foram identificadas molecularmente através do sequenciamento da região 16S rDNA pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em um estudo anterior realizado por Medeiros et al. (2016) e caracterizadas *in vitro* quanto ao potencial biotecnológico por Brito et al. (2020).

Genomas Completos

As sequências da região 16S rDNA das quatro cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* foram submetidas a ferramenta BLAST (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local) do NCBI - National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para as seleções dos genomas completos de cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* de diferentes origens, além de cepas de espécies externas ao SBSEC.

Elementos genéticos móveis

O número de fagos foi quantificado utilizando uma versão aprimorada da ferramenta de pesquisa PHAGE (PHASTER) considerando as seguintes referências: Intacto (pontuação > 90), questionável (pontuação 70–90) e incompleta (pontuação <

70). O número de MGEs (a proteína das transposases, integrases e transposons conjugativos) para ambos os cromossomos e o plasmídeo foi quantificado no genoma completo de *S. infantarius subsp. infantarius* (CJ18 e ATCC BAA-102), *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151) e *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) obtidos no GenBank (Arndt et al., 2016).

Genes de Resistência a Antibióticos (ARGs)

O CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) foi utilizado para identificar o resistome sob BLAST e RGI (sob os critérios de acerto perfeito, acerto rigoroso sozinho e perfeito e critérios de acerto estritos) e para verificar a posição do gene (cromossomo ou plasmídeo), dos genomas de *S. infantarius subsp. infantarius* (CJ18 e ATCC BAA-102), *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151), *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606). O ResFinder Servidor 3.0 foi usado para identificar os genes de resistência a antimicrobianos (Alcock et al., 2020).

Pan-genomas

Pan-genome analysis & exploration (panX) foi usado para pesquisar a presença ou ausência de genes específicos em cada espécie e realizar inferências filogenéticas para mostrar os níveis de proximidade entre *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151) e *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) (PanX, 2020).

Ilhas de patogenicidade

O software IslandViewer 4 foi utilizado para identificação computacional e visualização de ilhas genômicas em *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, *S. thermophilus* ST106 e *S. agalactiae* SAG153 (Bertelli et al., 2017).

Alinhamento de múltiplos genomas

O Mauve, sob DNASTAR, foi usado para realizar as análises de sintenia de blocos de sequências, rearranjos e os múltiplos alinhamentos do genoma (configuração padrão).

Aprovação ética

Não houve a necessidade de aprovação do comitê de ética para este estudo, uma vez que o mesmo não envolve seres humanos ou animais, ou suas amostras biológicas, mas somente DNA de bactérias e sequências de DNA disponibilizadas no GenBank.

Resultados

Genomas completos

As sequências de 16S rDNA das cepas KT990067, KT990068, KT990070 e KT990071 (Figura 1) submetidas ao BLAST/NCBI retornaram apenas um único genoma completo de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*, a cepa *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* CJ18. A cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 foi então usada para as análises subsequentes como representante de isolados alimentícios pela similaridade com as cepas estudadas do queijo de Coalho da Paraíba-Brasil. Foram selecionadas também a cepa de *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 de origem humana, duas cepas de *Streptococcus agalactiae* (SAG153 e NJ1606), considerados patógenos clínicos e quatro cepas de *Streptococcus thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151) a única espécie enterocócica com status GRAS, para identificação de similaridades e verificação de segurança das nossas cepas nativas para aplicações tecnológicas (Tabela 01).

Elementos genéticos móveis

Entre os genomas completos do GenBank estudados, quando comparados o número de transposases e integrases, a cepa de origem biotecnológica *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 apresentou maior número em relação a patogênica *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 (Figura 02). Além disso, *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 contém genes para codificar proteínas de transposons conjugativos, que estão ausentes em *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102. No entanto, o número de transposases e integrases das cepas de *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151) foram superiores às de outras espécies analisadas. Com exceção de *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102, todas as cepas apresentaram fagos nos genomas, no entanto, a infecção foi de diferentes origens. A cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 foi infectada por fagos de bactérias do

gênero *Streptococcus*, as cepas de *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151) por fagos de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus* e *Oenococcus*, enquanto as cepas de *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606), foram infectadas por fagos *Streptococcus* e *Lactococcus* (Figura 03).

Genes de Resistência a Antibióticos (ARG)

Não foram encontrados ARGs nos genomas completos das cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 e *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151). Em contrapartida, os genes de resistência à tetraciclina (*tet W/N/W* e *tetM*), à aminoglicosídeos (*APH (3')-IIIa* e *aad (6)*) e a defensinas (*mprF*) estavam presentes nas duas cepas de *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) selecionadas. O gene *ermB*, que confere resistência a eritromicina, estava presente somente em *S. agalactiae* SAG153 (Tabela 02).

Pan-genomas

O PanX revelou a presença de genes de produção de bacteriocinas, de folato e riboflavina (vitaminas B9 e B2, respectivamente) para as cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) e *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201 e APC151). As cepas de *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) também apresentaram genes de virulência para síntese de proteínas de adesão e citolisina (Tabela 03).

Ilhas de patogenicidade

O software IslandViewer 4 confirmou a presença dos elementos transponíveis e ausência de ilhas de patogenicidade em *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 e *S. thermophilus* ST106, diferentemente de *S. agalactiae* SAG153 que apresentaram genes de virulência e patogenicidade (Figuras 04, 05 e 06).

Alinhamento de múltiplos genomas

Os blocos colineares de *S. thermophilus* ST106 e *S. agalactiae* SAG153 possuem grupos de blocos invertidos quando comparados com o genoma de *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, porém também foi possível identificar deleções de blocos de sequências e pequenos blocos ($\approx$ 5.000 pares de bases) exclusivos ao mesmo

tempo que a sintenia é comum para os três genomas (Figura 7).

Discussão

O potencial biotecnológico das cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* (KT990067, KT990068, KT990070 e KT990071) nativas de queijos de Coalho do nordeste do Brasil, fabricado artesanalmente com leite não pasteurizado de rebanhos leiteiros expostos a baixas quantidades de antibióticos, foi determinado anteriormente por Brito et al. (2020). Rastreamos as relações das sequências de genes das quatro cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* com outros microrganismos de aplicação tecnológica segura e patógenos geneticamente próximos (Tabela 1).

A sequência do gene 16S rDNA vem sendo exaustivamente utilizada nas análises filogenéticas de grupos de microrganismos bacterianos (Mekadim et al., 2018; Poirier et al., 2018; Konecka & Olszanowski, 2019). A comparação entre a sequência de genes 16S rDNA mostrou que as cepas utilizadas neste trabalho são geneticamente similares ao genoma do isolado de leite africano CJ18 (Fig. 1), sequenciado por Jans et al. (2013a), o primeiro relato de conjunto de genoma completo da espécie de *S. infantarius subsp. infantarius*.

Jans et al. (2013a) ao compararem o genoma de *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 com *S. infantarius subsp. infantarius* ATCC BAA-102 de origem humana e *S. thermophilus* revelaram, a pressão da seleção natural e adaptações em *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 para o ambiente leiteiro, assim como para *S. thermophilus* de origem alimentícia. Análises de comparação genômica podem revelar diferentes valores adaptativos de genes de virulências, por exemplo, Ghattargi et al. (2018) demonstraram que o DNA de *Enterococcus faecium* 17OM39 é desprovido de genes de resistência a antibióticos (vancomicina e tetraciclina), de adesão, biofilmes e exoenzimas, além de ser intimamente relacionada a cepa probiótica *E. faecium* T110, livres de fatores de virulência patogênicos. A evolução das espécies gera populações com diferentes biótipos patogênicos ou não, que precisam ser analisados individualmente.

Recentemente, Tarrah et al. (2020) identificaram que *Streptococcus macedonicus* 211MA de origem leiteira não apresenta genes de virulência patogênicos de adesão, quando comparados a outros *S. macedonicus*. Nesse cenário, análises de genômica comparativa podem elucidar questionamentos de virulência, sejam de valor

biotecnológico, alimentares, probióticos ou de patogenicidade. Em bactérias de diferentes origens e características adaptativas os elementos genéticos móveis podem também modificar a dinâmica evolutiva das características estudadas (Tabela 1 e Figuras 2 e 7). As propriedades de adesão podem ser interpretadas como benéficas ou não para tecnologia de laticínios ou probióticos, isso depende do comportamento da cepa e interação com outras espécies bacterianas presentes no ambiente ecológico específico.

Ao analisarmos os elementos genéticos móveis das cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* (CJ18 e ATCC BAA-102), *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201, APC151) e *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) as transposases foram mais abundantes (Fig. 2), fato que merece novas investigações para o complexo (SBSEC), porque os elementos genéticos móveis (MGEs) são unidades genéticas egoístas que se autoreplicam e normalmente codificam proteínas que permitem sua proliferação no genoma e se espalham por hospedeiros criando perfis individuais (Jungam et al., 2017). Essas sequências podem surgir com características específicas e servirem ou não à função celular, além de aumentar ou diminuir a expressão dos genes.

Infecções por fagos requerem máxima atenção em tecnologia de laticínios, uma vez que os fagos podem transferir genes de virulência ou patogenicidade a bactérias fermentadoras. A cepa africana de *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18 foi infectada por um fago de *Streptococcus* sp., no entanto, segundo Jans et al. (2013a) essa cepa não foi continuamente exposta a fagos por períodos prolongados dentro de um ambiente homogêneo de fermentação espontânea. Todavia, *S. infantarius subsp. infantarius* pertence a um complexo de espécies de ambientes heterogêneos o que aumenta as chances de exposição dessas bactérias a diferentes tipos de fagos, independentemente do tempo. Além disso, diferentes mecanismos de defesa ou incorporação de fagos aos plasmídeos ou cromossomos estão presentes em bactérias, e com isso, podem ou não serem transmitidos.

As cepas de *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201, APC151) e *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) foram infectadas por diferentes fagos, provenientes de bactérias ácido lácticas patogênicas ou não (Figura 3, 4, 5 e 6). Como descrito por Santos, DS. et al. (2020) bacteriófagos podem empacotar parte do material genético do hospedeiro, incluindo genes de ARGs, ocasionando uma rápida disseminação de

resistência entre bactérias, reforçando a necessidade de isolar cepas bacterianas, nativas de animais clinicamente saudáveis, para aplicações seguras.

O uso indevido de antibióticos nos setores médico e veterinário juntamente com a seleção de genes bacterianos de resistência a antibióticos são atualmente considerados um desafio (Chidozie et al., 2020), e esses genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente ou verticalmente para outras bactérias. Os genes ARGs não foram encontrados nas cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* (CJ18 e ATCC BAA-102) e *S. thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201, APC151). No entanto, como esperado, as cepas patogênicas de *S. agalactiae* (SAG153 e NJ1606) apresentaram genes de resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas, eritromicinas e defensinas, diferente das nossas cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* isoladas de queijo de Coalho bovino no Estado da Paraíba, Brasil (Tabela 2).

Em contrapartida, o estudo realizado por Santos, KMO. et al., (2020) as cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* K1-4 e K5-1 isoladas de leite de cabra no Estado do Ceará, Brasil, apresentaram o gene de resistência *vanB* (resistência à vancomicina), o que representa uma preocupação de segurança dessas cepas, uma vez que vancomicina é uma droga de último recurso para o tratamento de infecções graves. Sendo assim, a análise do ARG em BAL deve ser realizada permanentemente, porque dependendo do nicho, as bactérias podem adquirir ou transferir ARGs por meio dos elementos genéticos móveis (Santos, DS. et al., 2020). O número de elementos genéticos móveis está potencialmente relacionado com ilhas genômicas (Figuras 4, 5 e 6).

A análise pan-genômica mostrou que todas as cepas estudadas apresentaram genes para a produção de bacteriocinas, e bacteriocinas são ativas contra *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Aspri et al., 2017). As cepas analisadas também apresentaram genes para as vitaminas B9 e B2, que auxiliam o metabolismo celular, e, portanto, são indispensáveis para a saúde de microrganismos e animais (Tabela 3). Em contrapartida, foram encontrados em *S. agalactiae* SAG153 as ilhas de patogenicidade contendo genes para proteínas de adesão e quando esses genes estão presentes em cepas que apresentam fatores de virulência adicionais, como é o caso de *S. agalactiae*, essa característica passa a ser considerada patogênica. O gene *cylB* que codifica a citolisina também está presente em *S. agalactiae* SAG153, e como descrito por Hooven et al. (2019), a

citolisina é uma importante citotoxina implicada em facilitar a invasão de patógenos na corrente sanguínea dos hospedeiros.

As cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* K1-4 e K5-1, analisadas por Santos KMO. et al., (2020), apresentaram os genes *esp* (proteína de superfície enterocócica), *gelE* (gelatinase), *efaA* (antígeno de endocardite), *ace* (adesão de proteínas de colágeno) e *epfSTR* (fator extracelular) que segundo os autores as cepas K1-4 e K5-1 não são seguras para a indústria de laticínios. No entanto, para determinar se uma espécie é patogênica, além de conhecer sua história genética, reprodutiva e ecológica, precisamos compreender que as características são tanto genotípicas quanto fenotípicas e podem apresentar diferentes normas de reação. Assim, uma característica considerada patogênica, como os genes *esp*, *gelE*, *efaA*, *ace* e *epfSTR* estudados, podem ser apenas fatores de virulência responsáveis pela sobrevivência e não necessariamente uma característica indesejável para sua aplicação biotecnológica (Gaglio et al., 2016; Gholizadeh et al., 2020).

Apesar dos genomas apresentarem grandes blocos de sequências genicas comuns, também apresentaram diversos rearranjos (Figura 7), que podem ter sido construídos em conjunto com os elementos genéticos de suas ilhas de patogenicidade (Figuras 4, 5 e 6), o que demonstra a dinâmica do complexo (SBSEC). Segundo Santos, DS. et al. (2020) a sintenia também pode facilitar a compreensão inicial de padrões adaptativos. Assim, é necessário não generalizar os padrões de virulência e patogenicidade apenas para uma espécie e sim verificar permanentemente cada isolado.

Conclusão

As análises realizadas revelaram pela primeira vez uma dinâmica de rearranjos de blocos de sequências entre as espécies estudadas. A genética comparativa e mobilidade de genes permitiram identificar padrões de similaridade entre espécies patogênicas e não patogênicos, indicando que cada isolado precisa ser avaliado separadamente, e que as cepas estudadas neste trabalho de ambiente nativo apresentam potencial biotecnológico semelhantes a cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18, utilizada para laticínios.

Agradecimentos

Agradecemos a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), Nº.: IBPG-1268-2.12/18, pelo suporte financeiro, ao CENAPESQ (Centro de Apoio à Pesquisa) e LABTECBIO (Laboratório de Tecnologia de Bioativos), ambos presentes na Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela infraestrutura disponibilizada.

Referências

Alcock et al. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 48, D517- D525.

Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A, (2019). Resistance integrons; A mini review. *Caspian Journal of Internal Medicine* 10, 370–376. <https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370>

Arndt D, Grant J, Marcu A, et al. (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, May 3.

Aspri M, Bozoudi D, Tsaltas D, Hill C, Papademas P, (2017). Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control* 73, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.022>

Bertelli, C. et al. (2017). "IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets" *Nucleic Acids Research*. May 2. doi: 10.1093/nar/gkx343

Biarc J, Nguyen IS, Pini A, et al. (2004). Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis*). *Carcinogenesis* 25, 1477e1484.

Boleij A, Muytjens CMJ, Bukhari SI, et al. (2011). Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases* 203, 1101e1109.

Brito LP, Silva EC, Calaça PRA, Medeiros RS, Soares MTCV, Porto ALF, (2020). Bactérias ácido láticas isoladas de queijo de Coalho do nordeste brasileiro na produção

de laticínios: Uma triagem para aplicação tecnológica. *Research, Society and Development* 10, 1-21. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8457>

Corredoira, J., Alonso, M.P., Coira, A., Varela, J., (2008). Association between *Streptococcus infantarius* (formerly *S. bovis* II/I) bacteremia and noncolonic cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1570.

Du Toit M, Huch M, Cho G-S, Franz CMAP, (2014). The genus *Streptococcus*. Chapter

23. In: Holzapfel WH, Wood BJB (eds) Lactic acid bacteria – biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 457–505

Gaglio R, Couto N, Marques C, et al. (2016). Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 236, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.020>

Ghattargi VC, Nimonkar YS, Burse SA, et al. (2018). Genomic and physiological analyses of an indigenous strain, *Enterococcus faecium* 17OM39. *Functional and Integrative Genomics* 18, 385–399. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0596-x>

Gholizadeh P, Aghazadeh M, Ghotaslou R, et al. (2020). CRISPR-cas system in the acquisition of virulence genes in dental-root canal and hospital-acquired isolates of *Enterococcus faecalis*. *Virulence* 11, 1257–1267. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809329>

Hooven TA, Catomeris AJ, Bonakdar M, et al. (2018). The *Streptococcus agalactiae* stringent response enhances virulence and persistence in human blood. *Infection and Immunity* 86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00612-17>

Iwu CD, Korsten L, Okoh AI, (2020). The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: A concern for public health. *MicrobiologyOpen* 9, 1–28. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1035>

Jangam D, Feschotte C, Betrán E, (2017). Transposable element domestication as an adaptation to evolutionary conflicts. *Trends Genet* 11, 817–831. doi: 10.1016/j.tig.2017.07.011.

Jans C, Gerber A, Bugnard J, Njage PMK, Lacroix C, Meile L, (2012b). Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* 31, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.001>

Jans C, Follador R0, Hochstrasser M, Lacroix C, Meile L, Stevens MJA, (2013a). Comparative genome analysis of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, an African fermented camel milk isolate with adaptations to dairy environment. *BMC Genomics* 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-200>

Jans C, de Wouters T, Bonfoh B, et al. (2016a). Phylogenetic, epidemiological and functional analyses of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex through an overarching MLST scheme. *BMC Microbiology* 16, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0735-2>

Jans C, Meile L, Kaindi DWM, et al. (2017). African fermented dairy products – Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced

food safety and security. *International Journal of Food Microbiology* 250, 27– 36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.012>

Konecka E, Olszanowski Z, (2019). Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA, *gltA*, *gatB*, and *hcpA* gene sequences of *Wolbachia* from the novel host *Ceratozetes thienemanni* (Acari: Oribatida). *Infection, Genetics and Evolution* 70, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.032>

Leuschner RGK, Robinson TP, Hugas M, (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends Food Sci Technol* 21, 425–435

Medeiros RS, Araújo LM, Queiroga Neto V, Andrade PP, Melo MA, Gonçalves MMBP, (2016). Identificación de bacterias lácticas aislado de queso Coalho artesanal producidos en el Nordeste Brasileño. *CYTA - Journal of Food* 14, 613–620. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1185468>

Mekadim C, Killer J, Pechar R, Mrázek J, (2018). Variable regions of the *glyS*, *infB* and *rplB* genes usable as novel genetic markers for identification and phylogenetic purposes of genera belonging to the family propionibacteriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 2697–2705. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002873>

Poirier S, Rué O, Peguilhan R, et al. (2018). Deciphering intra-species bacterial diversity of meat and seafood spoilage microbiota using *gyrB* amplicon sequencing: A comparative analysis with 16S rDNA V3-V4 amplicon sequencing. *PLoS ONE* 13, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204629>

Santos DS, Calaça PRA, Porto ALF, Souza PRE, Freitas NSA, Soares MTCV, (2020). What Differentiates Probiotic from Pathogenic Bacteria? The Genetic Mobility of *Enterococcus faecium* Offers New Molecular Insights. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 1–9. <https://doi.org/10.1089/omi.2020.0078>

Santos KMO, de Matos CR, Salles HO, et al. (2020). Exploring Beneficial/Virulence Properties of Two Dairy-Related Strains of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Probiotics and Antimicrobial Proteins. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09637-8>

Tarrah A, da Silva Duarte V, Pakroo S, Corich V, Giacomini A, (2020). Genomic and phenotypic assessments of safety and probiotic properties of *Streptococcus macedonicus* strains of dairy origin. *Food Research International* 130, 108931. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108931>

Wullschlegel S, Lacroix C, Bonfoh B, et al. (2013). Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a spontaneously fermented dairy product

(Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model. *Int. Dairy J.* 29, 28-35.

Tabela 1. Cepas de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus agalactiae* com genomas completos registrados no GenBank

Espécies	Cepas	ID Genbank	Tamanho do genoma	Plasmídeos	País	Origem
<i>S. infantarius subsp. infantarius</i>	CJ18	CP003295.1	1988420 bp	1	Kenya	Leite fermentado
	ATCC BAA-102	NZ_DS572694.1	233422 bp	-	United States	Fezes humana
<i>S. thermophilus</i>	ST 106	CP031881.1	1856083 bp	-	United States	Leite cru
	CS18	CP030928.1	1858890 bp	-	China	Leite fermentado
	IDCC 2201	CP035306.1	1794836 bp	-	South Korea	Queijos
	APC 151	CP019935.1	1839134 bp	-	Ireland	Intestino de peixe
<i>S. agalactiae</i>	SAG153	CP036376.1	2174504 bp	-	China	Humanos
	NJ1606	CP026084.1	2136438 bp	-	China	Leite de vaca

Tabela 2. Genes de Resistência a antibióticos nos cromossomos de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus agalactiae*

Gene	<i>S. infantarius subsp. infantarius</i>		<i>S. thermophilus</i>				<i>S. agalactiae</i>	
	CJ18	ATCC BAA-102	ST106	CS18	IDCC 2201	APC151	Sag153	NJ1606
APH (3') - IIIa	-	-	-	-	-	-	+	-
aad (6)	-	-	-	-	-	-	+	-
ErmB	-	-	-	-	-	-	+	-
tet (W/N/W)	-	-	-	-	-	-	+	-
tetM	-	-	-	-	-	-	-	+
mprF	-	-	-	-	-	-	+	+
vanA	-	-	-	-	-	-	-	-
vanB	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Presença; - Ausência.

Tabela 3. Proteínas de adesão e citolisinas encontradas em *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* CJ18, *Streptococcus thermophilus* (ST106, CS18, IDCC2201, APC151) e *Streptococcus agalactiae* (SAG153, NJ1606)

Proteínas	Cepas	Comprimento	Duplicata	Diversidade
	<i>S. thermophilus</i> (ST106, CS18, IDCC2201, APC151)	801 AA	NÃO	0.001
Proteína biossintetizante de folato (folP)	<i>S. agalactiae</i> (SAG153, NJ1606)	804 AA	NÃO	0.003
	<i>S. infantarius subsp. infantarius</i> CJ18	-	-	-
	<i>S. thermophilus</i> (ST106, CS18, IDCC2201, APC151)	917 AA	NÃO	0.005
Proteína biossintetizante de riboflavina (RibF)	<i>S. agalactiae</i> (SAG153, NJ1606)	903 AA	NÃO	0.002
	<i>S. infantarius subsp. infantarius</i> CJ18	-	-	-
	<i>S. thermophilus</i> (ST106, CS18, IDCC2201, APC151)	1056 AA	NÃO	0.001
Proteína biossintetizante bacteriocinas	<i>S. agalactiae</i> (SAG153, NJ1606)	246 AA	NÃO	0.0
	<i>S. infantarius subsp. infantarius</i> CJ18	-	-	-
Proteínas de adesão	<i>S. agalactiae</i> (SAG153, NJ1606)	924 AA	NÃO	0.005
Proteína biossintetizante de citolisina (cylB)	<i>S. agalactiae</i> (SAG153, NJ1606)	879 AA	NÃO	0.002

Fig 1. Similaridade entre *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* (KT990067, KT990068, KT990070, KT990071) isolados de queijo de coalho da Paraíba e *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* CJ18 de leite fermentado africano

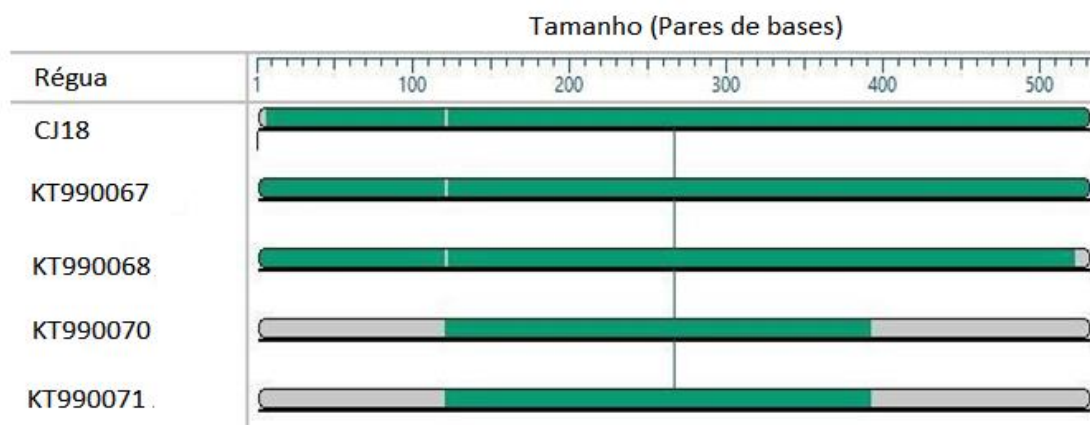
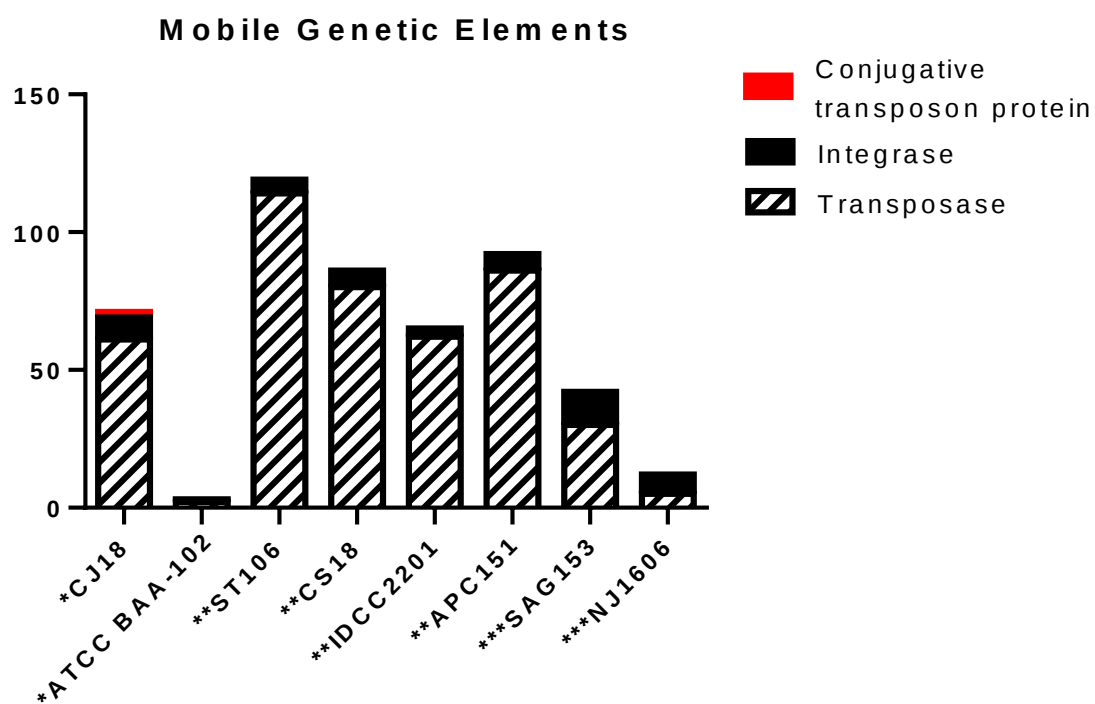


Fig. 2. Presença de elementos genéticos móveis nos cromossomos das cepas de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus agalactiae*



* *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*;

** *Streptococcus thermophilus*;

*** *Streptococcus agalactiae*.

Fig. 3. Presença de fagos nos genomas completos *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus agalactiae*

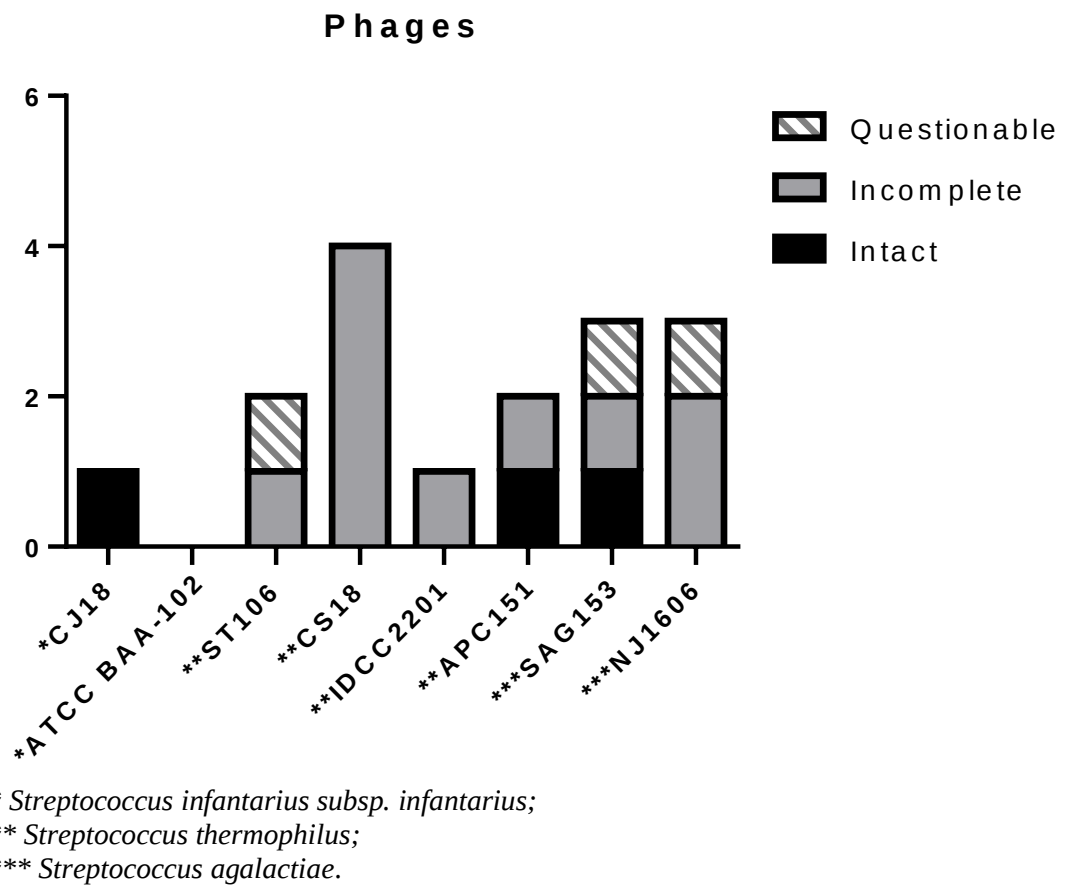


Fig 4. Ilhas de patogenicidade de *Streptococcus thermophilus* ST106.

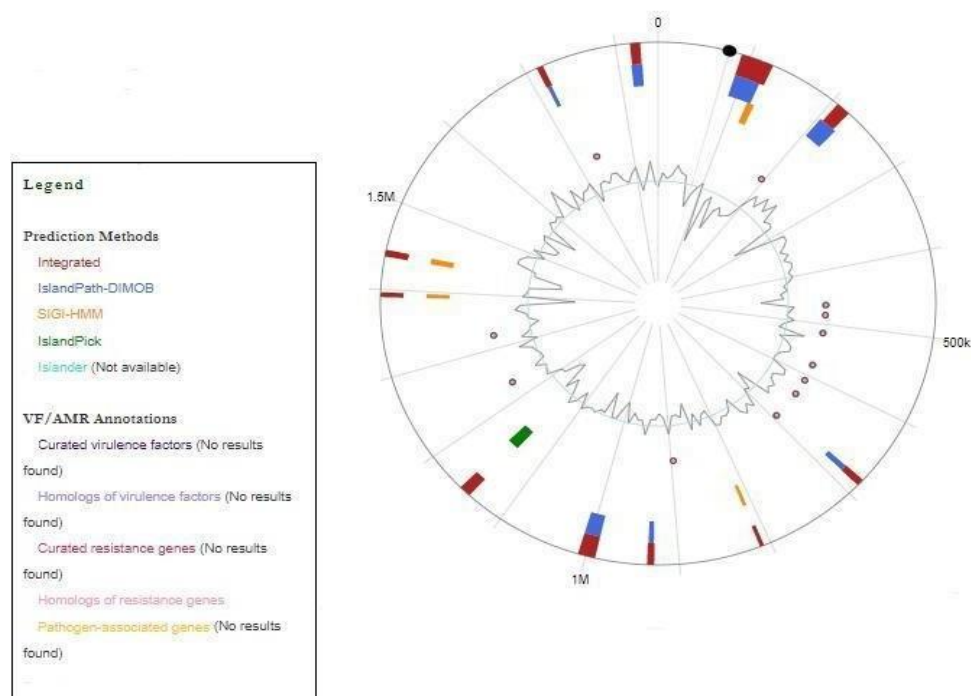


Fig 5. Ilhas de patogenicidade de *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* CJ18

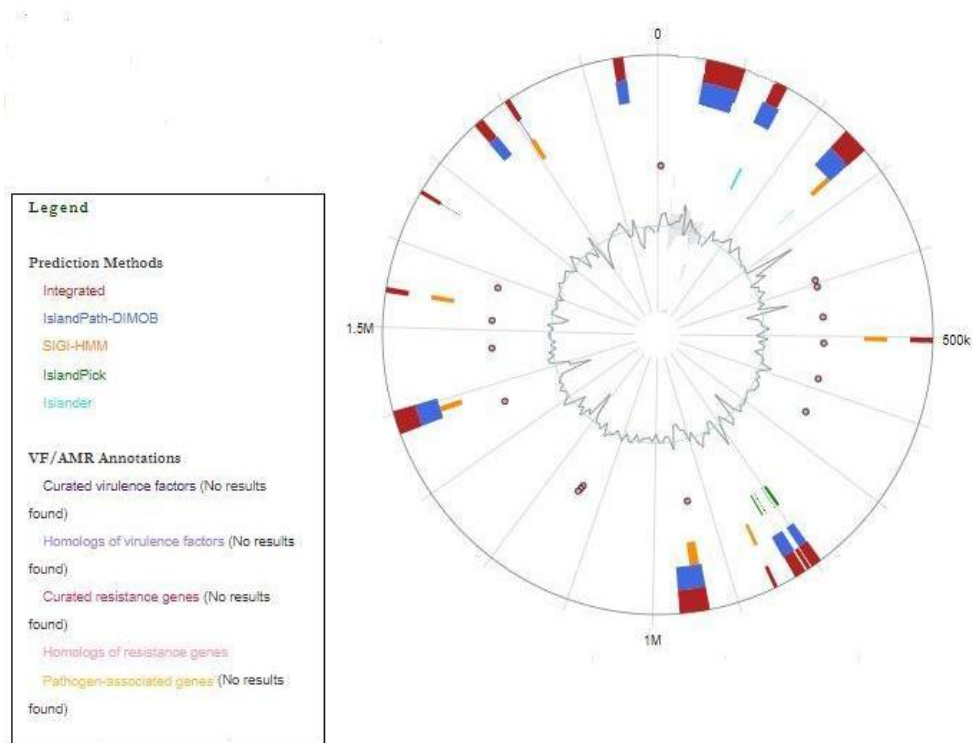


Fig 6. Ilhas de patogenicidade de *Streptococcus agalactiae* SAG153

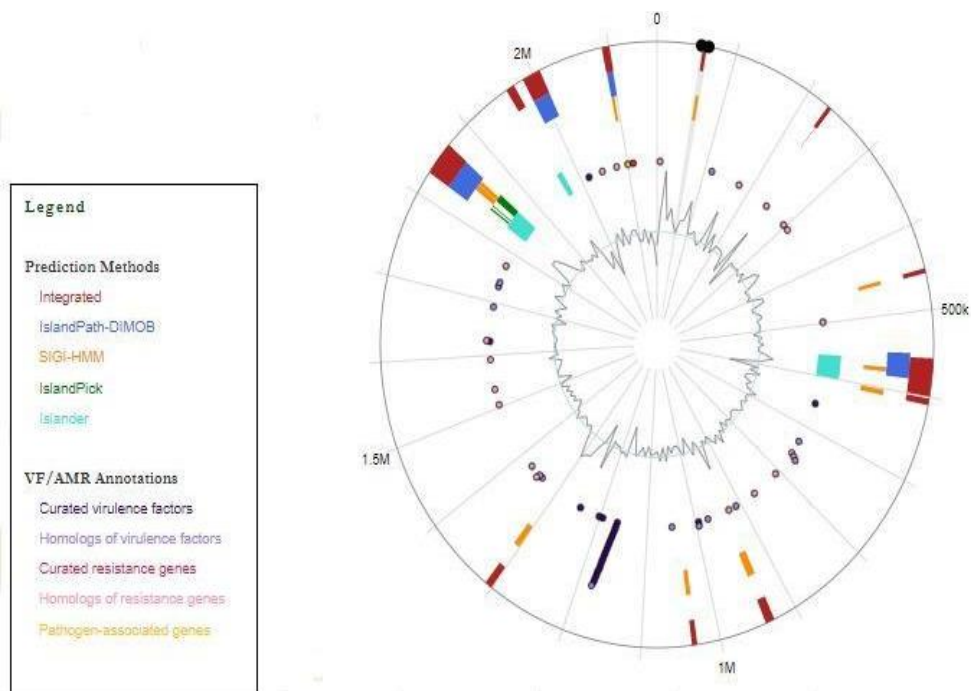
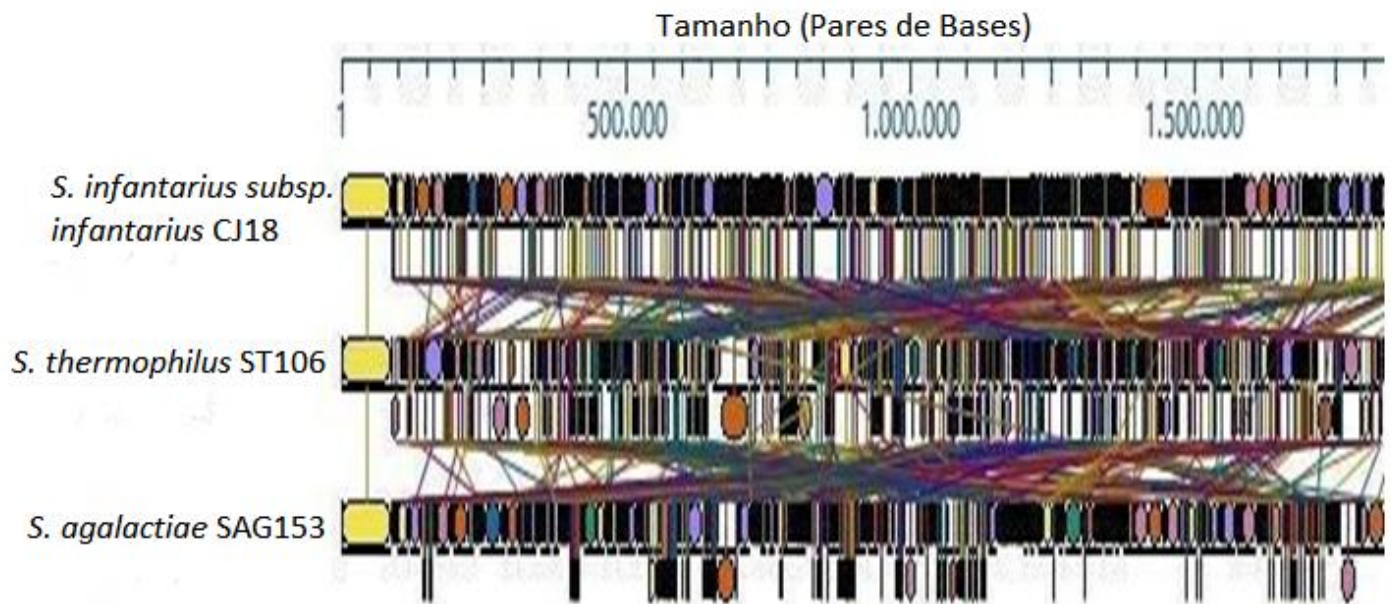


Fig 7. Sintenia entre *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* CJ18, *Streptococcus thermophilus* ST106 e *Streptococcus agalactiae* SAG155.



4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que há uma grande variedade de bactérias ácido lácticas nativas de queijos de Coalho artesanais com diferentes propriedades fermentativas que podem ser aplicadas no desenvolvimento de novos produtos lácteos com características sensoriais adequadas, em especial a cepa *E. faecium* KT990027 como cultura iniciadora fermentativa.

A genética comparativa e mobilidade de genes permitiram identificar que nossas cepas de *S. infantarius subsp. infantarius* de ambiente nativo apresentam potencial biotecnológico seguro semelhantes a cepa *S. infantarius subsp. infantarius* CJ18.

Assim, a manutenção da biodiversidade microbiana desses queijos deve ser considerada como fator fundamental e constantemente analisada, uma vez que as BAL nativas auxiliam na qualidade microbiológica desses produtos e mantém as características organolépticas típicas de produtos artesanais.

REFERÊNCIAS

- ABID, Y.; CASILLO, A.; GHARSALLAH, H.; JOULAK, I.; LANZETTA, R.; CORSARO, M. M.; ATTIA, H.; AZABOU, S. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 108, p. 719- 728. 2018.
- ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos**. Acesso em: 22 de jan. de 2021.
- ABUSHELAIBI, A.; ALMAHADIN, S.; EL-TARABILY, K.; SHAH, N. P.; AYYASH, M. Characterization of probiotic lactic acid bacterias isolated from camel milk. **LWT-Food Science and technology**. v. 79, p. 316-325, 2016.
- ALVARENGA, D. O.; MOREIRA, L. M.; CHANDLER, M.; VARANI, A. M. Um guia prático para genômica comparativa de elementos genéticos móveis em genomas procarióticos. **Methods in Molecular Biology**. p. 213–242, 2017. doi: 10.1007 / 978-1-4939-7463-4_7
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probiotics: health promoting agents. *Nutrire: rev. J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007.
- AMARANTE, J. O. **Queijos do Brasil e do mundo: para iniciantes e apreciadores**, São Paulo: Editora: Mescla, 2015.
- BAE, J.; LEE, K. W.; ISLAM, M. N.; YIM, H. S.; PARK, H.; RHO, M. iMGEins: detecting novel mobile genetic elements inserted in individual genomes. **BMC Genomics**. v. 19, n. 1, p. 944, 2018. doi:10.1186/s12864-018-5290-9
- BEHBAHANI, B. A.; NOSHAD, M.; FALAH, F. Inhibition of *Escherichia coli* adhesion to human intestinal Caco-2 cells by probiotic candidate *Lactobacillus plantarum* strain L15. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, p. 103677, 2019.
- CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d’Aspromonte produced from raw or thermized goat’s milk. **Food Microbiology**. v. 20, n. 2, p. 201-209, 2003.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 28, p. 281-370, 2002.
- CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Campinas: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CHIANG, S.S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 93, p. 903–916, 2012.

COSTA, E. S.; VARAVALLO, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC.** v. 4, n. 2, 2011.

DAHMANE, N.; LIBANTE, V.; CHARRON-BOURGOIN, F. Diversity of integrative and conjugative elements of *Streptococcus salivarius* and their intra- and interspecies transfer. **Appl Environ Microbiol.** v. 83, p. 337–17, 2017.

DARMON, E.; LEACH, D. R. F. Instabilidade do genoma bacteriano. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 78, p. 1-39, 2014.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.

DEVRIESE, L. A.; POT, B. The genus *Enterococcus*. In: Wood, B. J. B., HOLZAPFEL, W. H. (Eds.), **The genera of lactic acid bacteria**, v. 2. p. 327-367, 1995.

DIAS, G. M. P.; SILVA, A. B.; GRANJA, N. M. C.; SILVA, T. N.; LIMA, G.V. M.; CAVALCANTI M. T. H.; PORTO, A. L. F. Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? **Scientia Plena**, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2019 Doi: 10.14808/sci.plena.2019.021501.

DOMINGO, J. J. S. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 40, n. 6, p. 417- 429, 2017.

FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. **World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations**, London Ontario, Canada, 2006.

FOULQUIÉ MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

FULLER, R. probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BOUCOURT, R.; BALCÁZAR, L. J.; NICOLI, J. R.; MOREIRA-SILVA, J.; RODRÍGUEZ, Z.; FUERTES, H.; NUÑEZ, O.; ALBELI, N. E.; HALAIHEL, N. Production of β - galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria. **Research in Veterinary Science.** v. 108, p. 125-132, 2016.

GDP – **Global Dairy Platform. Annual Review 2017**. Disponível em: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2020.

GIRAFFA, G. Enterococci in food. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163 – 171, 2002.

- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 732 – 738, 1997.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, 2003b.
- HAITI, S.; MANDAL, S.; PRAJAPATI, J. B. Novel Starters for Value Added Fermented Dairy Products. **Current Research in Nutrition and Food Science**. v. 1, n. 1, p. 83-91, 2013 doi:10.12944/CRNFSJ.1.1.09.
- HAN, Q.; KONG, B.; CHEN, Q.; SUN, F.; ZHANG, H. *In vitro* comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. **Journal of Functional Foods**. v. 32, p. 391-400, 2017.
- HASSAN, P.; PEH, K. K. Characterization and identification of *Lactobacillus acidophilus* using biolog rapid identification system. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 1, 2014.
- HUANG, Y. H.; LAI, Y. J.; CHOU, C. C. Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product of soybean. **Journal of Bioscience & Bioengineering**. v. 112, p. 49– 53, 2011.
- HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52. p. 141-148. 2002.
- JOHNSON, C. M.; GROSSMAN, A. D. Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work. **Annu Rev Genet**. v. 49, p. 577–601, 2015.
- KHAN, S. U. Probiotics in dairy foods: A review. **Nutrition and Food Science**. v. 44, n. 1, p. 71-88, 2014. doi:10.1108/NFS-04-2013-0051
- LAMMERS, K. M.; BRIGIDI, P.; VITTALLI, B.; GIONCHETTI, P.; RIZELLO, F.; CAMELLI, E.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Immunomodulatory effects of probiotics bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 165-172, 2003.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.
- LIMA, C.; LIMA, L.; CERQUEIRA, M.; FERREIRA, E.; ROSA, C. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre. **Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 1, p. 266-272, 2009.
- MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANSEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, n. 3, p. 213-222,

2003.

MALAMY, M. H.; FIANDT, M.; SZYBALSKI, W. Microscopia eletrônica de inserções polares no operon lac de *Escherichia coli*. **Mol Gen Genet.** v. 119, n. 3, p. 207–222, 1972.

MALLAPPA, R. H.; SINGH, D. K.; ROKANA, N.; PRADHAN, D.; BATISH, V.; GROVER, S. Screening and selection of probiotic Lactobacillus strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. **LWT- Food Scienc and Technology.** v. 105, p. 272-281, 2019.

MAKAROVA, K.; SLESAREV, U. M. A.; LOBO, Y. Genômica comparativa das bactérias do ácido láctico. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 103, p. 15611-6, 2006.

MEDEIROS, R. S.; ARAÚJO, L. M.; QUEIROGA NETO, V.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A.; GONÇALVES M. M. B. P. Identification of lactic acid bacteria isolated from artisanal Coalho cheese produced in the Brazilian Northeast. **CyTA- Journal of Food.** v. 14, n. 4, p. 613-620, 2016.

MEDEIROS, R. S. **Parâmetros de qualidade do Queijo de Coalho produzido na Paraíba: indicadores químicos e microbiológicos.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa. 2016.

MONTEL, M. C; BUCHIN, S.; MALLET A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D. A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology.** v. 177: p. 136-154, 2014 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; JUNIOR, A. S.; NERO, L. A.; Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. **Brazilian Journal Microbiology.** v. 44, p. 109-112, 2013.

MUKISA, I. M.; BYARUHANGA, Y. B.; MUYANJA, C. M. B. K.; LANGSRUD, T.; NARVHUS, J. A. Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from Obushera, a traditional sorghum malt fermented beverage. **Food Science & Nutrition.** v. 5, n. 3, p. 702-712, 2016. doi:10.1002/fsn3.450

MUÑOZ, R.; ARENA, M. E.; SILVA, J.; GONZÁLEZ, S. N. Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology.** v. 41, p. 1019-1026, 2010.

NASSU, R. T.; ARAUJO, R. S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. A. **Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte,** Fortaleza: Editora: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.

OLIVEIRA, G. M. E.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, C. R. E.; SOUZA, E. L. D. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi- hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola.** v. 69, n. 6, p. 370–379, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162012000600005>

OSUNTOKI, A.; KORIE, I. Antioxidant activity of Whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. **Food Technol Biotechnol**, v. 48, n. 4, p. 505-511, 2010.

PAQUEREAU, B., MACHADO, G., CARVALHO, S. **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. Garanhuns, PE: Ed. Dos Autores, 2016.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspetos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PEYER, L. C.; AXEL, C.; LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; JACOB, F. E ARENDT, E. K. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **Food Control**. v. 69, p. 227-236, 2016.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria *in vitro* by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. **Clinical Nutrition Experimental**. v. 23, p. 97-115. 2019.

PRIYODIP, P.; PRAKASH, P. Y.; BALAJI, S. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. **Indian Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2017.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 538-544, 2013.

QUIGLEY L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiol Rev**. v. 37, p. 664-98, 2013.

RIISPOA. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017. Dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Lex: coletânea de legislação: edição federal, Brasília, 2017.

ROBINSON, R. K. (ed.) Dairy Microbiology handbook. 3. ed. New York: **Wiley Interscience**. p. 765, 2002.

SABBE, S.; VERBEKE, W.; VAN DAMME, P. Confirmation/disconfirmation of Consumers expectations about fresh and processed tropical fruit products. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 44, p. 539-551, 2009.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**. 71:394-406

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

SIQUEIRA, K. B. **Perfil do Consumidor de Leite e Derivados**. 1. ed. Minas Gerais: Editora: Embrapa, 2019.

SHORI, A. B. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423-431, 2015.

SMOKVINA, T.; WELS, M.; POLCA, J. Genômica comparativa de *Lactobacillus paracasei*: em direção à definição do pan-genoma das espécies e exploração da diversidade. **PLoS One**. v. 8, p. 68731, 2013.

TAMANG J. P.; SHIN D. H.; JUNG S. J.; CHAE, S. W. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

TRAVASSOS, A. E. R. **Queijo de Coalho: atividade enzimática e qualidade do produto**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo. 1996.

VASIEE, A. R.; TABATABAEI YAZDI, F.; MORTAZAVI, A.; EDALATIAN, M. R. Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli* spp. From Tarkhineh. **International Food Research Journal**. v. 21, p. 2487-2492, 2014.

VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015. doi:10.1007/s13197-015-1795-2.

WEICHSELBAUM, E. Probiotics and health: A review of the evidence. **Nutrition Bulletin**. v. 34, n. 4, p. 340-373, 2009.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal Dairy Science**. v. 102, n. 1, p. 124-134, 2018. doi.org/10.3168/jds.2018-14983