



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DA REGIÃO DO JAGUARIBE, CE

J.G. Santos¹, L.M. Bruno²

1 - Departamento de Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP - CEP: 13083-862 - Campinas - SP - Brasil, Telefone: 55 (19) 35212175 - E-mail: jessgsantos@gmail.com

2 - Embrapa Agroindústria Tropical, CEP: 60511-110 - Fortaleza - CE - Brasil, Telefone: 55 (85) 33917100 - E-mail: laura.bruno@embrapa.br

RESUMO - O conhecimento sobre a diversidade de bactérias ácido-láticas presentes em produtos lácteos, como o queijo de Coalho, possui grande relevância para a agroindústria. O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar bactérias ácido-láticas da microbiota de queijos de Coalho artesanais. Um total de 133 isolados foram identificados e inseridos à Coleção de Microorganismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical, visando à conservação dos mesmos e futura prospecção de suas propriedades.

ABSTRACT - The knowledge about the diversity of lactic acid bacteria presents in the dairy products such as Coalho cheese, has great relevance for agroindustry. This study aimed to isolate, identify and characterize lactic acid bacteria of the microbiota of artisanal Coalho cheeses. A total of 133 isolates were identified and added to the Collection of Microorganisms of Interest for Tropical Agroindustry, from Embrapa, aiming the conservation and future exploration of its properties.

PALAVRAS - CHAVE: Queijo de Coalho; BAL; identificação.

KEYWORDS: Coalho cheese; LAB; identification.

1. INTRODUÇÃO

A microbiota de queijos que são produzidos com leite cru e fermento natural é muito complexa e a sua composição é crucial para o desenvolvimento da característica sensorial única de cada variedade de queijo tradicional (Lazzi *et al.*, 2016). A caracterização de bactérias ácido-láticas (BAL) provenientes de produtos lácteos de interesse para a agroindústria, como o queijo de Coalho, gera conhecimento sobre a microbiota láctica destes produtos, o qual é fundamental para o desenvolvimento de culturas lácticas que auxiliem na preservação das características originais do produto tradicional no produto industrializado. As BAL tem sido isoladas e caracterizadas de leite e queijos artesanais, como o Coalho, visando principalmente a seleção de culturas lácticas para a obtenção de produtos de maior qualidade (Bruno *et al.*, 2004; Carvalho, 2007).

Este grupo de bactérias, BAL, possui as seguintes características comuns: são Gram positivas, não formadoras de esporos, não produtoras de catalase, oxidase e gelatinase, com morfologia de cocos ou bastões, não reduzem nitrato a nitrito, mas são capazes de utilizar o lactato. Crescem em condições anaeróbias, mas são tolerantes ao O₂, sendo então chamadas de microaerófilas (Carr *et al.*, 2002; Hassan e Frank, 2001).

As BAL fermentam carboidratos e produzem ácido lático, sendo os principais organismos responsáveis pela acidificação dos queijos. De acordo com a temperatura de crescimento, podem ainda



ser divididas em mesofílicas, crescem a uma temperatura ótima por volta de 30°C, e termofílicas, que crescem a uma temperatura ótima de 42°C (Fox *et al.*, 2000).

O grupo das BAL tem sido, nas últimas décadas, desmembrado para constituir novos gêneros, reagrupados e redenominados. *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* são os gêneros mais comumente encontrados em queijos (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2000).

Este trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar bactérias ácido lácticas presentes na microbiota de queijos de Coalho artesanais produzidos na região do Jaguaribe, Ceará, e ainda, adicionar os micro-organismos isolados à Coleção de Micro-organismos de Interesse da Agroindústria Tropical, da Embrapa Agroindústria Tropical.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras de queijo de Coalho foi realizada em três unidades artesanais de processamento, no estado do Ceará, na região do Jaguaribe. As amostras foram transportadas, sob refrigeração, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical, onde foram analisadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2 Preparação das amostras

As três amostras de queijo de Coalho artesanal foram analisadas 11, 4 e 11 dias após a sua fabricação, respectivamente, seguindo metodologia descrita por Frank *et al.* (1992) e Harrigan (1998). Cada amostra foi dividida em porções aleatórias e 25 g de queijo foi homogeneizada com 225 mL de solução de citrato de sódio 2%. Em seguida, foram preparadas as diluições decimais em série utilizando-se solução peptonada a 0,1%.

2.3 Isolamento e contagem de bactérias ácido-láticas

O isolamento e a contagem das BAL foram efetuados após a inoculação de 1 mL das diluições das amostras, em profundidade, com sobrecamada (Hall *et al.*, 2001), em ágar M17 e ágar Rogosa. As placas de M17 foram incubadas a 30 °C e a 42 °C, durante 48 horas e as placas de Rogosa permaneceram incubadas por cinco dias, nas mesmas condições.

2.4 Purificação e confirmação de bactérias ácido-láticas

A etapa de purificação dos isolados foi realizada pelo estriamento das colônias pré-selecionadas em ágar Man, Rogosa e Sharpe – MRS, a 30 °C ou 42 °C (de acordo com a temperatura utilizada na etapa de isolamento) por 48 horas. Após a purificação, os isolados foram submetidos aos seguintes testes de confirmação: coloração de Gram, produção de catalase e de ácido.

2.5 Identificação de bactérias ácido-láticas

A classificação, no nível de gênero, das BAL com a morfologia de cocos (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*), foi realizada de acordo com os seguintes testes: crescimento nas temperaturas de 10 °C e 45 °C; crescimento em pH de 4,4, e 9,6; crescimento em NaCl 6,5% e produção de CO₂ a partir da glicose (Harrigan, 1998).

Para averiguar o gênero das BAL identificadas como bastões (*Lactobacillus*) os micro-organismos foram submetidos às seguintes condições: crescimento nas temperaturas de 15 °C e 45 °C e produção de CO₂ a partir da glicose, seguindo metodologia descrita por Cogan *et al.* (1997).



3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a população láctica bacteriana em diferentes meios (M17 e Rogosa) e em diferentes temperaturas (30 °C e 42 °C). As amostras foram denominadas QC (Queijo de Coalho) 1, 2 e 3. Pode ser observado que houve crescimento em ambos os meios e temperaturas empregados, embora o meio M17 pareça ter favorecido o crescimento de BAL em relação ao Rogosa, uma vez que apresentou contagem um pouco superior de UFC/g de queijo, em ambas as temperaturas. De acordo com Richter e Vedamuthu, (2001), o meio M17 favorece o crescimento de micro-organismos na forma de cocos. Portanto, a contagem superior encontrada no meio M17 é indicativa da predominância de cocos nestas amostras.

No meio M17 foi observado para todas as amostras um crescimento com contagens superiores a 10^7 UFC/g (Figura 1), já o crescimento no meio Rogosa variou de 10^5 a 10^8 UFC/g.

A amostra que apresentou um comportamento diferente das demais em ambos os meios foi a QC3, exibindo maior contagem a 30 °C, quando comparada com as outras, porém, contraditoriamente, desta amostra foram provenientes o menor número de células viáveis deste experimento.

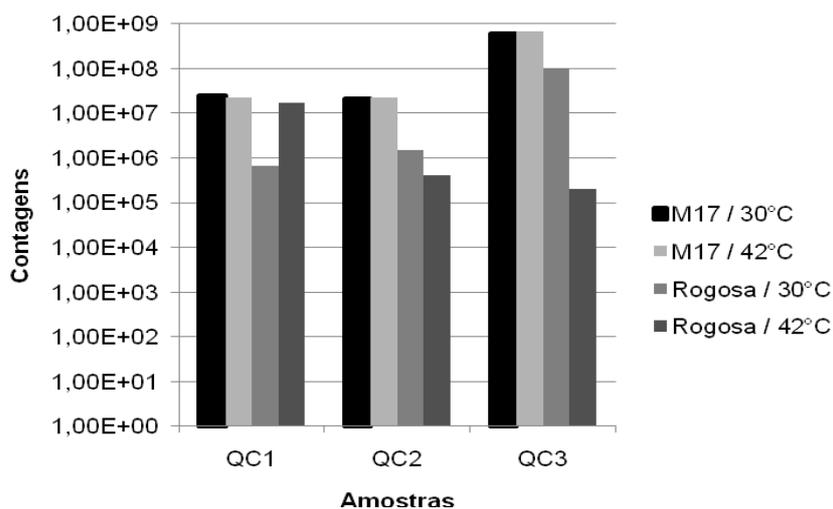


Figura 1: Contagem de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanais (QC1, QC2 e QC3) em diferentes meios e temperaturas.

Para os micro-organismos isolados serem considerados BAL, eles deveriam ser Gram positivos, catalase negativo e produtores de ácido (Hall *et al.*, 2001). De um total de 210 micro-organismos isolados, 133 foram considerados BAL, 15 não eram BAL e 62 não se desenvolveram nos meios de cultura utilizados, sendo considerados não cultiváveis e posteriormente descartados (Tabela 1). Embora meios seletivos para BAL tenham sido empregados no isolamento, o desenvolvimento de outros micro-organismos ocorre devido ao uso de meios de cultura ricos em nutrientes.



Tabela 1: Testes realizados para confirmação de BAL.

Características	Número de Isolados	Frequência (%)	Resultado
Coloração de Gram positivo, catalase negativo e produtor de ácido	133	63,4	BAL
Catalase positivo	8	3,8	Não BAL
Não produtor de ácido	7	3,3	Não BAL
Não cultiváveis	62	29,5	-

Dos 133 micro-organismos considerados BAL, 82,7% apresentaram a forma de cocos e 17,3%, a forma de bastão ou cocobacilo, conforme a Figura 2.

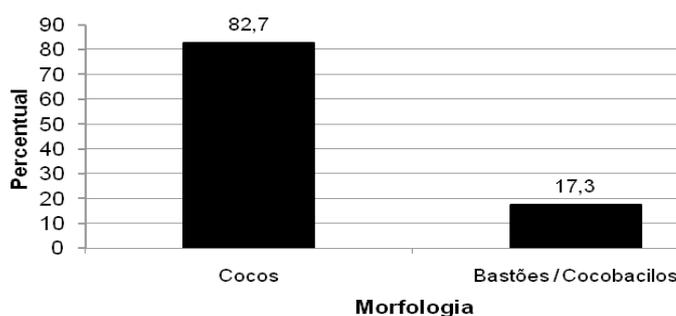


Figura 2: Morfologia dos micro-organismos considerados BAL.

A identificação em nível de gênero das BAL na forma de cocos, isoladas das amostras de queijo de Coalho artesanal, foi realizada seguindo as características descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Diferenciação dos gêneros de BAL na forma de cocos.

Testes	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Crescimento à 10 °C	+	+	-	+
Crescimento à 45 °C	+	-	+	-
Crescimento em 6,5% de NaCl	+	-	-	-
Crescimento em pH 9,6	+	-	-	-
Crescimento em pH 4,4	+	-	-	-
Produção de CO ₂ a partir da glicose	-	-	-	+

Fonte: Harrigan (1998)

A classificação de gênero dos 133 micro-organismos caracterizados como BAL pode ser observada na Figura 3.

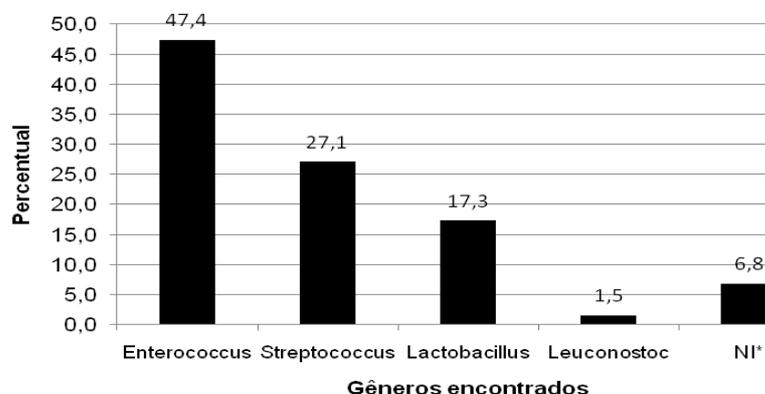


Figura 3: Classificação dos gêneros de BAL e sua frequência (*NI: não identificados).

Foi observada a presença dominante de isolados dos gêneros *Enterococcus* (47,4%) e *Streptococcus* (27,1%), embora tenha havido ausência de *Lactococcus*.

Os enterococos possuem capacidade de se adaptar às condições adversas, como altas e baixas temperaturas e concentrações elevadas de sal e isso possibilita seu desenvolvimento em vários tipos de queijos (Carvalho, 2007).

Em relação ao gênero *Lactobacillus*, do total de 23 isolados, 86,9% foram classificados como termofílicos. Apenas 2 dos isolados se enquadraram no gênero *Leuconostoc* e 6,8% dos isolados não puderam ser classificados em nenhum dos gêneros, de acordo com os testes realizados.

4. CONCLUSÕES

A avaliação da microbiota láctica do queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará fornece conhecimento para a caracterização deste produto.

A predominância dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* e a ausência de *Lactococcus* sugerem que durante o processamento deste tipo de queijo pode haver uma seleção de bactérias resistentes a temperaturas elevadas, devido a etapa de cozimento da massa.

A alta frequência de *Enterococcus* pode estar relacionada com a matéria-prima utilizada, bem como indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção do queijo de Coalho artesanal. No entanto, podemos inferir que os enterococos fazem parte da microbiota natural deste queijo e devem ter uma contribuição significativa nas características do mesmo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N. L., & Cogan, T.M (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11 (4-7), 259–274.

Bruno, L.M., Carvalho, J.D.G., Vasconcelos, N.M., Nassu, R.T., & Ferreira, C. L. L. F. (2004). Isolamento e identificação preliminar de bactérias ácido lácticas de leite e queijo de coalho. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Recife, PE.

Carvalho, J. D. G. (2007). *Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no ceará e de suas propriedades tecnológicas*. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuviel, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C, &



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

Rodriguez, E (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, 3 (64), 409-421.

De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Microbiology, Genetics and Application* (1. ed.). London: Chapman & Hall.

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

Frank, J.F., Christen, G.L., & Bullerman, L.B. (1992). Test for groups of microorganisms. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (16. ed.). Washington: American Public Health Association.

Hall, P.A., Ledenbach, L., & Flowers, R.S. (2001). Acid-producing Microorganisms. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4. ed.) Washington: American Public Health Association.

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

Hassan, A.N., & Frank, J.F. (2001). Starter cultures and their use. *Applied Dairy Microbiology* (2. ed.). New York: Marcel Decker.

Lazzi, C., Povolò, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M. (2016). Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology*, 16 (233), 20-28.

Richter, R.L., & Vedamuthu, E.R. (2001). Milk and Milk Products. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (4. ed.). Washington: American Public Health Association.