



EPAMIG

31º Congresso Nacional de Laticínios

Instituto de Laticínios Cândido Tostes



18 a 20 de Julho de 2017 - Juiz de Fora - MG

## ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ASSOCIADAS AO QUEIJO ARTESANAL ALAGOA PRODUZIDO NA SERRA DA MANTIQUEIRA EM MINAS GERAIS

Edna Froeder Arcuri<sup>(1)</sup>, Nivea Maria Vicentini<sup>(1)</sup>, Marcos Aurélio Souto Silva<sup>(1)</sup>, Carla Christine Lange<sup>(1)</sup>, João Batista Ribeiro<sup>(1)</sup>, Maria de Fátima A. Pires<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, edna.arcuri@embrapa.br

### Resumo

Em queijos artesanais como o queijo de Alagoa, as bactérias lácticas autóctones são fundamentais para suas características e qualidade. Este estudo objetivou isolar bactérias lácticas mesófilas e termófilas de amostras de leite cru, soro-fermento e queijos nos tempos de maturação de zero, sete, 14 e 28 dias, provenientes de cinco propriedades. Nas amostras de leite cru predominaram lactococos e lactobacilos mesófilos, já no soro fermento e queijos predominaram os grupos de lactobacilos mesófilos e termófilos. Todos os grupos reduziram em número no decorrer da maturação de até 28 dias. Um total de 366 isolados Gram positivos e catalase negativos, divididos em 167 isolados com morfologia de cocos (127 mesófilos e 40 termófilos) e 201 de bastonetes (87 mesófilos e 114 termófilos) foram armazenados a - 80°C para identificação e caracterização molecular.

**Palavras-chave:** bactérias lácticas; queijo Alagoa; soro-fermento

### Introdução

A produção de queijos artesanais é uma atividade tradicional e geradora de renda para inúmeros produtores rurais em Minas Gerais. No município de Alagoa, situado na Serra da Mantiqueira, o queijo artesanal Alagoa, também referido como queijo parmesão de Alagoa, é produzido há mais de um século em pequenas propriedades a partir de leite cru integral e soro-fermento (Passil, 2016).

Na produção de queijos artesanais, a biodiversidade de bactérias lácticas é considerada fator fundamental para as características e qualidade do produto final (Morandi et al., 2011). Portanto, para preservar as características do queijo artesanal de Alagoa e minimizar variações na sua qualidade é necessário conhecer a biodiversidade das bactérias lácticas em todo o processo de sua produção. No entanto, até o presente, nenhum estudo sobre a microbiota láctica foi realizado. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a contagem em placas, isolamento e identificação presuntiva de bactérias lácticas presentes em amostras de leite cru,

SP7440

06.13.14.001.00.05.02

soro-fermento, queijo recém fabricado e após 7, 14 e 28 dias de maturação, provenientes de cinco propriedades.

### **Material e Métodos**

Amostragem: Amostras de leite cru, soro-fermento e queijos artesanais foram coletadas em cinco propriedades rurais de agricultores familiares situadas no município de Alagoa na Serra da Mantiqueira, MG. Os queijos, oriundos de um mesmo lote, foram maturados nos respectivos locais de fabricação e amostrados nos tempos zero, sete, 14 e 28 dias. As amostragens foram realizadas nos meses de maio, junho, julho, novembro e dezembro de 2016, sendo as amostras transportadas sob refrigeração à temperatura em torno de 4°C para o Laboratório de Microbiologia da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, onde foram analisadas dentro de 24 horas após a coleta.

Contagem em placas e isolamento de bactérias: Amostras de 25 mL de leite cru e soro-fermento foram diluídas serialmente em solução tampão fosfato (Weher&Frank, 2004), alternativamente, 25 g de queijo foram primeiramente homogeneizadas em solução citrato de sódio a 2% e então diluídas serialmente como indicado para o leite e soro-fermento para plaqueamento. Para estas amostras, foram realizadas as análises de contagem de bactérias lácticas em ágar Man Rogosa e Shape (MRS) e Agar M17 acrescido de 5% de lactose, respectivamente em anaerobiose e aerobiose, ambos incubados a 30 °C e 42 °C. O período de incubação das placas contendo o meio Agar M17 foi de 48 h e o do ágar MRS de 72 h. Placas contendo entre 20 a 300 colônias foram selecionadas para contagem e isolamento. Colônias isoladas apresentando diferentes morfologias foram repassadas para novas placas para verificação da pureza das culturas e identificação presuntiva pelos testes de coloração de Gram e produção de catalase. Os isolados Gram positivos e catalase negativos foram divididos em dois grupos: cocos e bastonetes e foram preservados em Litmus Milk a -20 °C e -80 °C para posterior identificação e caracterização molecular.

### **Resultados e Discussão**

Os resultados das contagens de bactérias lácticas em amostras de leite cru, soro-fermento e queijos a diferentes tempos de maturação, provenientes de cinco propriedades, constam na Tabela 1. Nas amostras de leite cru verificou-se



predomínio de grupos mesófilos, tanto em condições aeróbias e anaeróbias de cultivo, com contagens médias de 6,77 e 6,82  $\log_{10}$  UFC/mL nos meios M17 (lactococos) e MRS (lactobacilos) a 30°C, respectivamente. Já para o soro-fermento, verificou-se predomínio de lactobacilos com contagens médias de 8,25 e 8,18  $\log_{10}$  UFC/mL em MRS a 30°C e 42°C, respectivamente. Os grupos de lactobacilos também predominaram nos queijos em todos os tempos de maturação considerados. Segundo Liu et al. (2012) a variedade de bactérias lácticas presentes em produtos lácteos fermentados depende do leite cru e fermento láctico usado na fabricação.

Os dados evidenciam que todos os grupos reduziram em número no decorrer da maturação de até 28 dias: o grupo de lactococos mesófilos reduziu de 7,05  $\log_{10}$  UFC/mL para 6,31  $\log_{10}$  UFC/mL; o grupo de lactococos termófilos reduziu de 5,65 para 5,22  $\log_{10}$  UFC/mL; o grupo de lactobacilos mesófilos reduziu de 7,43 para 6,54  $\log_{10}$  UFC/mL e o grupo de lactobacilos termófilos reduziu de 7,44 para 5,81  $\log_{10}$  UFC/mL. Estas reduções podem estar associadas à inibição do crescimento de algumas estirpes de bactérias lácticas causada por variações no queijo durante este período de maturação, tais como: aumento na concentração de ácidos orgânicos, abaixamento do pH e do teor de umidade, concentração de sal e redução de nutrientes disponíveis.

Foram obtidos muitos isolados das amostras de leite cru, soro-fermento e queijos a diferentes tempos de maturação. A maioria dos isolados foram identificados presuntivamente como bactérias lácticas por apresentarem reação positiva na coloração de Gram, ausência de catalase e morfologia de cocos ou bastonetes. Ao final uma coleção de 366 isolados divididos em 167 isolados com morfologia de cocos (127 mesófilos e 40 termófilos) e 201 de bastonetes (87 mesófilos e 114 termófilos) foram armazenados a - 80°C para posterior identificação e caracterização molecular.

Tabela 1. Contagem de bactérias lácticas em leite cru, soro-fermento e queijos a diferentes tempos de maturação, provenientes de cinco propriedades.

Amostra	M17 30°C (Log UFC/ g ou ml)					M17 42°C (Log UFC/ g ou ml)					MRS 30°C (Log UFC/ g ou ml)					MRS 42°C (Log UFC/ g ou ml)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Leite cru	6,35	7,62	6,49	6,48	6,90	6,30	3,00	5,91	5,32	4,62	6,38	7,79	6,25	6,43	7,27	6,38	3,00	5,20	3,78	3,477
	(6,77 ± 0,52)					(5,03 ± 1,30)					(6,82 ± 0,67)					(4,37 ± 1,39)				
Soro - fermento	-	5,90	4,84	5,30	4,60	-	5,75	4,90	4,30	4,90	8,28	8,39	8,94	7,83	7,81	8,11	8,49	9,00	6,74	8,544
	(5,16 ± 0,57)					(4,96 ± 0,59)					(8,25 ± 0,46)					(8,18 ± 0,86)				
Queijo T0	7,68	7,68	6,04	6,60	7,255	7,93	5,00	5,30	5,00	5,0	8,11	7,57	7,93	6,727,43	8,70	7,23	7,87	5,95	7,46	
	(7,05 ± 0,72)					(5,65 ± 1,28)					(7,55 ± 0,54)					(7,44 ± 1,00)				
Queijo T7	7,11	7,81	5,60	6,84	3,0	6,90	5,20	5,00	5,30	3,477	7,54	7,81	6,36	7,02	7,06	7,17	6,00	6,49	6,92	7,176
	(6,07 ± 1,89)					(5,18 ± 1,21)					(7,16 ± 0,56)					(6,75 ± 0,50)				
Queijo T14	6,83	6,87	5,11	6,52	4,49	6,07	4,41	4,41	5,00	5,60	6,60	6,87	4,84	6,67	6,80	6,54	4,78	4,84	6,40	6,724
	(5,96 ± 1,09)					(5,10 ± 0,73)					(6,36 ± 0,85)					(5,86 ± 0,96)				
Queijo T28	5,12	7,32	5,70	7,93	5,477	5,67	4,54	4,47	5,36	6,06	6,38	7,10	5,60	6,86	6,75	6,40	4,62	5,60	6,02	6,40
	(6,31 ± 1,24)					(5,22 ± 0,70)					(6,54 ± 0,58)					(5,81 ± 0,74)				

## Conclusão

Considerando que não há informações disponíveis na literatura sobre a caracterização deste queijo tradicional, este estudo é a primeira etapa para conhecimento das bactérias lácticas envolvidas na sua produção. Nossos resultados sugerem que grupos de bactérias lácticas presentes no leite e soro-fermento tendem a predominar no queijo, e, portanto, esta microflora autóctone deve ser identificada, caracterizada, protegida e conservada.

## Agradecimentos

Aos produtores de queijo artesanal Alagoa e a EMATER Minas Gerais.

## Referências

- Liu, W.J.; Sun, Z.H.; Zhang, Y.B.; Zhang, C.L.; Menghebilige; Yan, M.; Sun, T.S.; Bao, Q.H.; Chen, W.; Zhang, H.P. A survey of the bacterial composition of kurut from Tibet using a culture-independent approach. **J.DairySci.**, v. 95, p. 1064–1072, 2012.
- Morandi, S.; Basca, M.; Lodi, R. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic bacteria involved in the production of Bitto Italian cheese. **Dairy Sci. and Technol.**, v. 91, p. 341-359, 2011.
- Passil, L. Queijo Artesanal Alagoa, feito no alto da Serra da Mantiqueira. <<http://www.sertaobras.org.br/blog/2016/11/20/parmesao-dalagoa/>>2016. Acesso em 20 abr. 2017.
- Weher, M.; Frank, J.F. (Ed). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 17<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, DC. 2004. 570p.