

## Isolamento de bactérias lácticas de Queijo Minas Artesanal produzidos em cinco microrregiões de Minas Gerais<sup>1</sup>

Ranaíla Kely Ferreira<sup>2</sup>, Maria Laura Gazolla Parma<sup>2</sup>, Bianca de Oliveira Hosken<sup>2</sup>, Paula Aparecida Azevedo Almeida<sup>3</sup>, Ricardo Borges Gonçalves<sup>4</sup>, Liliâne Denize Miranda Menezes<sup>5</sup>, Márcio Roberto Silva<sup>6</sup>, Mirian Pereira Rodarte<sup>7,8</sup>, João Batista Ribeiro<sup>6,8</sup>

<sup>1</sup>Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Parte do projeto RISKFACTOR, código 02.13.10.007.00.00, liderado por Márcio R. Silva

<sup>2</sup>Graduanda em Farmácia – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Estudante de ensino médio – E. E. Mal. Mascarenhas de Moraes, Bolsista BIC-JR FAPEMIG

<sup>5</sup>Supervisora do Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) - IMA

<sup>6</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>7</sup>Professora – Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>8</sup>Orientador

**Resumo:** Bactérias lácticas fazem parte da microbiota do queijo Minas artesanal, são frequentemente responsáveis por características sensoriais desejáveis e podem possuir propriedades de interesse industrial. O objetivo desse estudo foi isolar bactérias lácticas mesófilas e termófilas a partir de amostras de queijos Minas artesanal provenientes de cinco microrregiões de Minas Gerais visando constituir uma coleção biológica geneticamente diversificada para futuros desenvolvimentos. Nas 59 amostras de queijo analisadas foi isolado um total de 250 bactérias usando os meios agar Man Rogosa e Shape (MRS) e Agar M17 acrescido de 5% de lactose, sendo predominante o isolamento de bactérias mesófilas (n=165). Um total de 95 isolados foram positivos quanto à coloração de *Gram* e negativos no teste da catalase (53 mesófilos e 42 termófilos), sendo considerados presuntivamente bactérias ácido lácticas (BAL). Estes isolados de BAL foram preservados em meio *Litmus milk* a -80 °C, serão identificados e a população bacteriana caracterizada quanto à diversidade genética para posterior uso na prospecção de linhagens e biomoléculas de interesse tecnológico.

**Palavras-chave:** bactérias lácticas; queijo minas artesanal; Serro

## Isolation of lactic bacteria from artisanal Minas cheese produced in five microregions of Minas Gerais

**Abstract:** Lactic bacteria are part of the microbiota of the artisanal Minas cheese, they are often responsible for desirable sensory characteristics and may have properties of industrial interest. The objective of this study was to isolate mesophilic and thermophilic lactic bacteria from samples of artisanal Minas cheese from five microregions of Minas Gerais aiming to constitute a genetically diverse biological collection for future developments. In the 59 cheese samples analyzed, a total of 250 bacteria were isolated using Man Rogosa and Shape agar (MRS) and M17 agar supplemented with 5% lactose, with isolation of mesophilic bacteria (n = 165) predominating. A total of 95 isolates were positive for Gram staining and negative on the catalase assay (53 mesophilic and 42 thermophilic), and they were considered presumptively lactic acid bacteria (BAL). These BAL isolates have been preserved in Litmus Milk medium at - 80 °C, will be identified and characterized in relation to genetic diversity for future prospection of strains and biomolecules of technological interest.

**Keywords:** lactic bacteria; artisanal Minas cheese; Serro

## Introdução

O queijo minas artesanal além de um importante fator cultural no estado de Minas Gerais também possui um grande valor econômico devido a geração de renda principalmente para pequenos produtores e a movimentação da economia do estado. As características sensoriais de produtos lácteos como os queijos, estão muito relacionadas com a microbiota nativa presente no produto e uma vez que essa microbiota nativa é variável pela região, os produtos podem adquirir características sensoriais muito específicas e que se tornam tradicionais daquela região.

Meios de cultura seletivos que promovem o crescimento dos microrganismos de interesse e que inibem o crescimento de outros, são uma ferramenta importante no isolamento desses microrganismos. Devido às suas diversas exigências nutricionais, para detectar, isolar e identificar os diferentes gêneros que constituem o grupo de bactérias ácido-lácticas (BAL), faz-se necessário muitas vezes a utilização de mais de um meio, geralmente, ricos em nutrientes, além de diferentes condições de incubação.

As bactérias ácido-lácticas (BAL) representam o principal grupo presente na microbiota nativa de produtos lácteos. Esse grupo tem sido largamente estudado não só para produção de culturas para produtos lácteos, mas também devido suas atividades probióticas e capacidade de produzirem

bacteriocinas (BRUNO,2009). O que torna de grande importância a manutenção e preservação de coleções desses microrganismos como fonte de recursos genéticos para estudos de melhorias em diversos processos biotecnológicos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar presuntivamente as bactérias lácticas presentes em amostras de queijos minas artesanais provenientes de cinco microrregiões de Minas Gerais.

### Material e Métodos

Um total de 59 amostras de queijos minas artesanais foram coletadas em dezesseis municípios de Minas Gerais, nas microrregiões da Canastra, Serro, Araxá, Triângulo e Cerrado. As amostras foram coletadas e levadas ao LSMA do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Contagem, MG, onde subamostras foram transferidas para sacos estéreis, congeladas e transportadas sob refrigeração à temperatura de 4 °C para o Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. As amostras foram mantidas a 4 °C até a realização das análises. As coletas foram realizadas de 06/09/2017 a 23/11/17 e o tempo de maturação dos queijos no momento da coleta variou de 0 a 30 dias.

Após homogeneização das amostras (aproximadamente 30g cada), subamostras de 1g de cada queijo foram suspensas em 9 mL de solução citrato de sódio a 2% e feitas diluições decimais serialmente em solução tampão fosfato até  $10^{-5}$ . Em seguida, 0,1 mL das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram inoculados por espalhamento em placas contendo meio ágar MRS e M17 acrescido de 5% de lactose, as quais foram incubadas a 30 °C. O mesmo volume das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foi plaqueado e as placas incubadas a 43 °C. Ambos os meios foram incubados por um período de 48 horas, mantendo-se as condições de aerobiose.

Após o tempo de incubação, as colônias foram contadas e aquelas apresentando diferentes morfologias foram isoladas em novas placas e incubadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente, para verificação da pureza das culturas e identificação presuntiva pelos testes de coloração diferencial de *Gram* e produção de catalase. Os isolados *Gram* positivos e catalase negativos foram preservados em meio *Litmus Milk* a -80 °C para análises posteriores visando à identificação e caracterização molecular dos isolados.

### Resultados e Discussão

Foram isoladas 250 bactérias a partir de 59 amostras de QMA provenientes das microrregiões da Canastra, Serro, Araxá, Triângulo e Cerrado (16 municípios) utilizando os meios MRS e M17, os quais não mostraram diferenças quanto aos números de isolamentos bacterianos para uma mesma amostra de QMA (Tabela 01). Em geral, o ágar M17, desenvolvido por Terzaghi e Sandine, tem sido usado para o isolamento de BAL na forma de cocos, e o ágar Rogosa acidificado ou o ágar MRS, desenvolvido por Man, Rogosa e Sharpe, para o isolamento de BAL na forma de bastões (CARVALHO, 2007; MARINO et al., 2003; RICHTER e VEDAMUTHU, 2001), entretanto, análises de morfologia ainda não foram realizadas para este grupo de bactérias. Torres-Llanez e outros (2006) também utilizaram diferentes meios (M17 e MRS) e temperaturas (30, 37 e 42 °C) para o isolamento de BAL isoladas de um queijo fresco Mexicano, observando crescimento representativo em todas as combinações de meio e temperatura. Medina e outros (2001) não encontraram diferença significativa entre as contagens médias para as BAL nos meios M17, MRS e MSE.

Dentre os 250 isolados bacterianos, 95 (38%) apresentaram resultado positivo na coloração diferencial de Gram e resultado negativo para o teste da catalase, sendo consideradas presuntivamente BAL. Todos esses isolados foram purificados e estocados em meio *Litmus Milk* a -80°C. Dentre as BAL isoladas, 53 foram obtidas por incubação a 30 °C e 42 crescidas a 43 °C. Segundo Carvalho (2007), a incubação em diferentes temperaturas de crescimento é um fator importante para a seleção de microrganismos mesofílicos e termofílicos. Outro fator que influencia na microbiota presente no queijo é o tempo de maturação. As principais reações bioquímicas que ocorrem no queijo durante a maturação são glicólise, proteólise, lipólise, sendo que as duas últimas afetam a textura, sabor e aroma finais do produto (ORDÓNEZ, 2005).

A quantidade de isolamentos variou por microrregião, sendo que não houve nenhuma BAL entre as bactérias isoladas nas regiões do Triângulo e Cerrado. Isso se deve provavelmente ao pequeno número de amostras de QMA coletadas nessas duas microrregiões, contudo não se pode descartar a influência da variação nos métodos de produção e fatores ambientais visto que são locais diversos do ponto de vista geográfico e climático.

No presente trabalho optou-se por trabalhar com amostras de QMA de diferentes origens geográficas, com diferentes tempos de maturação e isolamentos microbianos em diferentes condições ambientais e meios de cultura visando à obtenção de uma população de BAL genética e metabolicamente diversificada. Considerando o interesse de nossa equipe de pesquisa em explorar o potencial tecnológico de BAL proveniente de produtos lácteos, futuros trabalhos serão realizados visando à identificação e caracterização dos isolados obtidos. Nessa perspectiva, a coleção de BAL ora constituída poderá ser usada como fonte de

recursos genéticos para a realização de estudos visando à prospecção e ao desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos a serem empregados em prol da cadeia produtiva do leite.

**Tabela 1.** Isolados bacterianos obtidos de amostras de Queijo Minas Artesanal provenientes de cinco microrregiões do Estado de Minas Gerais.

Microrregião	Número de Amostras	Quantidade isolados	Temperatura 30 - 43°C		BAL	Tempo de Maturação
<b>Canastra</b>	6	29	21	8	8	16 a 28 dias
<b>Serro</b>	45	195	128	67	75	1 a 30 dias
<b>Araxá</b>	6	19	12	8	12	0 a 18 dias
<b>Triângulo</b>	1	2	2	0	0	14 dias
<b>Cerrado</b>	1	5	3	2	0	2 dias

### Conclusões

Foram identificadas 95 BAL dentre as 250 bactérias isoladas de 57 amostras de QMA das microrregiões do Serro, da Canastra e de Araxá. Nenhuma BAL foi identificada dentre os 16 isolados bacterianos obtidos de amostras de QMA provenientes das microrregiões do Cerrado (n=1) e do Triângulo Mineiro (n=1). Dentre os isolados, predominaram bactérias mesófilas isoladas a 30 °C. Os meios M17 e MRS se mostraram apropriados para o isolamento de BAL, não apresentando diferenças em relação aos número de isolamentos proporcionados. Mais estudos serão realizados visando caracterizar essa população de BAL quanto à diversidade genética e ao potencial tecnológico.

### Agradecimentos

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), à Universidade Federal de Juiz de Fora, à Embrapa (Projeto 02.13.10.007.00.00) e à FAPEMIG (Processos CVZ-APQ-02746-14 e CVZ-PPM- 00526-16).

### Referências

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Embrapa Agroindustrial Tropical, ISSN 1666-1915, 124. 30 p. Dezembro, 2009.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. **Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE**. Revista do Instituto Cândido Tostes, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

DORES, M. T DAS., & FERREIRA, C. L. L. F. **Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios**. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.2, n.2, p. 26-34. Dez 2012.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. **Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina**. Journal of Food Protection, v. 64, n. 4, p. 559-663, Apr., 2001.

MINAS GERAIS. Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013 do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). **Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal**. Diário Oficial do Executivo. 1 de mar. 2013.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, v.2, 2005.

SANTOS, A. J. P. **Efeitos do período de maturação de queijos sobre a microbiota deteriorante e Listeria monocytogenes** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 36 p. Dissertação de Mestrado).

SILVA, D. **Análise microbiológica de amostras de queijo minas frescal comercializadas no estado do rio de janeiro**. 2016. 33f. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz.