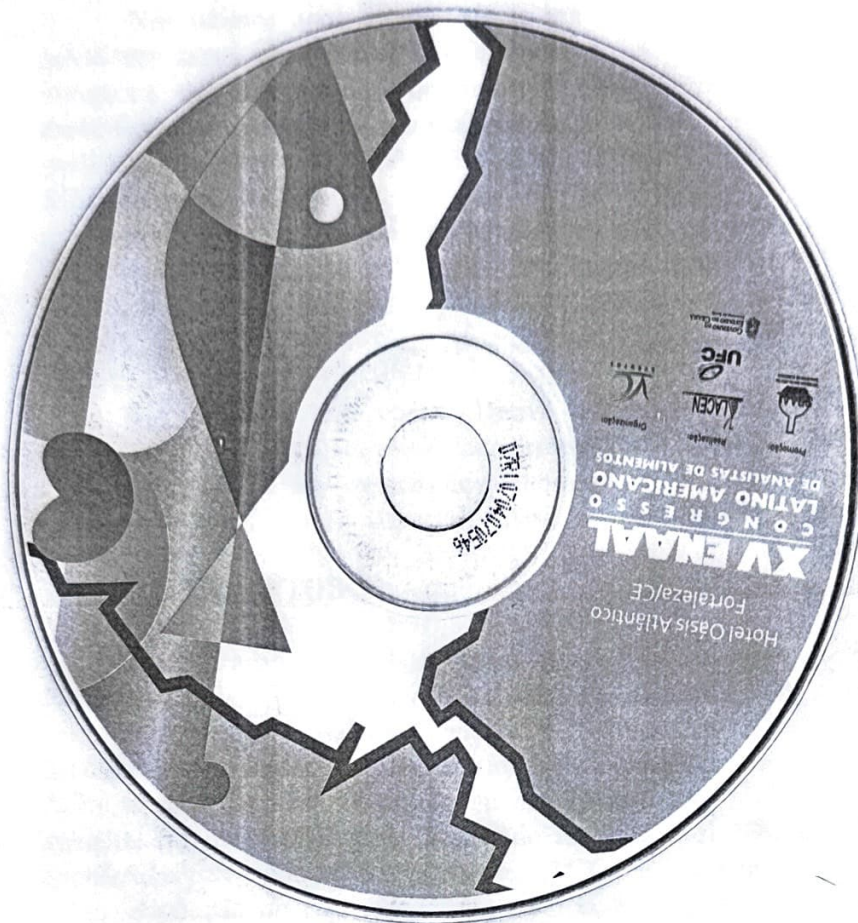


DOC Nº AT 02003



CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS DE COALHO COMERCIALIZADOS NO CEARÁ

Laura Maria Bruno¹, Juliane Döering Gasparin Carvalho², Ana Amélia Martins Queiroz³, Ana Karine Furtado de Carvalho³, Cristiane Pereira de Lima³.

¹Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, ²Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, ³Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, e-mail: lmb Bruno@cnpat.embrapa.br

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisadores em todo o mundo têm se preocupado em selecionar cepas pertencentes à microbiota láctica natural do leite cru e de queijos artesanais de suas regiões, de modo a obter fermentos iniciadores e adjuntos especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos (CARVALHO et al., 2006; DURLU-OSKAYA et al., 2001; MEDINA et al., 2001).

Após o isolamento, a identificação e o estudo de propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas são realizados com o intuito de se obter dados para desenvolver culturas que sejam apropriadas para elaboração de um determinado tipo de queijo, visando a preservação de suas características (CARVALHO et al., 2006; DURLU-OSKAYA et al., 2001; MEDINA et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades tecnológicas de capacidade de acidificação, capacidade proteolítica e capacidade de produção de aroma de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos de Coalho comercializados no Ceará e que fazem parte da coleção de culturas da Embrapa Agroindústria Tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 19 bactérias ácido lácticas, pertencentes aos gêneros *Enterococcus* e *Sirepiococcus*, isoladas de amostras de queijos de Coalho, comercializados em Fortaleza, Ceará. Estes microrganismos fazem parte da coleção de bactérias ácido lácticas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical. Antes da submissão aos testes, os microrganismos foram ativados em meio LDR (leite desnatado reconstituído) 10% a 35°C por 24 horas, transferidos para caldo MRS e incubados a 35°C por 24 horas.

Avaliação da capacidade de acidificação – Uma alíquota de 1% da cultura previamente ativada em caldo MRS foi transferida para meio LDR (10%), suplementado com 0,3% de extrato de levedura e 0,2% de glucose, e incubada a 35°C por 24 horas. Em seguida uma alíquota de 1% da dessa cultura foi inoculada em 200ml de LDR e incubada a 35°C. Após os tempos de 0, 6 e 24 horas, amostras de 20ml foram retiradas, assepticamente, para determinação de pH (DURLU-OSKAYA, et al., 2001), em pHmetro Digimed DM20. O controle do experimento foi realizado pela incubação de 200ml de meio LDR, sem inóculo.

Avaliação da capacidade proteolítica – Uma alíquota de 1% da cultura previamente ativada foi transferida para meio LDR pasteurizado (63°C/30 minutos) e incubada a 35°C. Após 16 horas, 3ml dessa cultura foi retirado e misturado a 3ml de água destilada e 10ml de ácido tricloroacético 0,72N e homogeneizado durante 5

minutos. Depois de um repouso de 15 minutos, a mistura foi filtrada. Do filtrado foi recolhido uma quantidade de 2ml, a qual foi adicionado 4ml de uma solução de carbonato de sódio (15%) e pirofosfato de sódio (2%), aquecida a 40°C e 1,2ml do reagente fenol Folin-Ciocalteu. Em seguida, a densidade ótica foi medida a 650nm em espectrofotômetro Varian CARY 50. A atividade proteolítica foi expressa em µg de tirosina por ml de amostra por hora, usando tirosina como padrão. O branco foi realizado utilizando filtrado de meio LDR pasteurizado, sem inóculo (HULL, 1947).

Avaliação da capacidade de formação de aroma – foi determinada em um tubo de ensaio contendo 2,5ml da cultura ativada em meio LDR, 2,5ml de solução de NaOH 10N e 1ml de solução de creatina (1%). Após agitação do tubo por 20 minutos, o aparecimento de coloração rósea indicou a formação de diacetil e acetil metil carbinol, representado a positividade do teste (FURTADO, 1990).

Identificação das espécies de bactérias ácido lácticas - A identificação das espécies para os diferentes gêneros encontrados foi realizada utilizando o sistema API 20 Strep (BioMérieux) para estreptococos, enterococos e microrganismos semelhantes. O teste de termorresistência, no qual uma alíquota de 1 % de cada isolado foi inoculada em LDR (10 %) estéril e em seguida submetida à tratamento térmico de 60°C/ 30 minutos, foi utilizado para a identificação de *Streptococcus thermophilus*. A positividade do teste foi verificada pelo crescimento após a incubação a 42°C por 24-48h (HARDIE; WHILEY, 1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da capacidade de acidificação das culturas estão apresentados na Tabela 1. Segundo Cogan et al. (1997), culturas boas produtoras de ácido são aquelas que reduzem o pH do leite de seu valor normal (~ 6,6) para 5,3 em 6 horas. Este critério foi atendido apenas por três isolados de *Streptococcus* e por nenhum dos *Enterococcus*, demonstrando que estas culturas não são boas produtoras de ácido. Embora outros pesquisadores tenham isolado microrganismos bons produtores de ácido da microbiota de outros queijos (COGAN et al., 1997; DURLU-OZKAYA, et al. 2001, MEDINA et al., 2001), Carvalho et al., 2006 também encontraram resultados semelhantes com isolados de bactérias ácido lácticas de queijos de Coalho. A seleção de microrganismos pouco acidificantes pode ocorrer devido à própria característica do queijo de Coalho de apresentar o pH elevado, em torno de 6,0 (NASSU et al., 2001).

Tabela 1: Isolados que reduziram o pH do leite de 6,5 para 5,3 após incubação de 6h e, para 4,6, após incubação de 24h, a 35°C.

Microrganismo	Total avaliado	Nº de isolados que reduziram o pH para	
		≤ 5,3	≤ 4,6
<i>Streptococcus</i>	10	3	7
<i>Enterococcus</i>	9	0	2

No entanto, após 24 horas de incubação, a maior parte dos isolados de *Streptococcus* foi capaz de reduzir o pH do leite de 6,5 para 4,6, que é o ponto isoelétrico da caseína (Tabela 1). Esta característica de não reduzir o pH do leite em demasia, demonstra que os microrganismos avaliados apresentam potencial para serem usados como fermento láctico endógeno para fabricação de queijo de Coalho.

A atividade proteolítica dos isolados está apresentada na Tabela 2. De um total de 19 culturas avaliadas, 79% apresentaram atividade proteolítica baixa,

independentemente do gênero, produzindo até 1,99 μg de tirosina. $\text{ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (linhas 1 e 2 da Tabela 2). Microrganismos muito proteolíticos não são recomendados na fabricação de queijos que serão consumidos frescos, como é o caso do queijo de Coalho, uma vez que a proteólise pode levar ao desenvolvimento de sabor amargo e ao amolecimento da textura, características indesejáveis neste tipo de queijo.

Tabela 2: Atividade proteolítica dos isolados dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, em meio LDR pasteurizado, após 16 horas de incubação a 35°C.

Atividade proteolítica (μg de tirosina. $\text{ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Nº de isolados avaliados	%
(0 - 0,99)	9	47,4
(1 - 1,99)	6	31,6
(2 - 2,99)	2	10,5
(>3,00)	2	10,5
Total = 19		100,0

A capacidade de produção de aroma foi verificada pela formação de diacetil e acetil metil carbinol, após o cultivo das culturas em meio LDR, por 24 horas a 35°C. Os compostos avaliados fazem parte das substâncias responsáveis pelo desenvolvimento do aroma em queijos (FOX et al., 2000). Dos 19 isolados avaliados, 16 apresentaram resultado positivo para este teste, representando 84,2% do total de microrganismos analisados (Tabela 3)

Tabela 3: Capacidade de produção de aroma dos isolados dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, cultivados em LDR por 24 horas a 35°C.

Microrganismo	Nº de isolados avaliados	Isolados Positivos
<i>Streptococcus</i>	10	8
<i>Enterococcus</i>	9	8
Total	19	16

Todos os isolados pertencentes ao gênero *Streptococcus* (10) foram positivos para o teste de termorresistência sendo, portanto, classificados como *Streptococcus thermophilus*. Dentre os microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus*, 66,7% foram identificados como sendo *E. faecium*. Dois isolados não puderam ser identificados com o uso do kit API 20 Strep. Para um outro isolado, confirmado como *Enterococcus*, não foi possível discriminar a espécie, mesmo com o auxílio do kit API 20 Strep. Neste caso, necessita-se de testes mais acurados para identificação da espécie.

CONCLUSÃO

A caracterização das propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas avaliadas neste trabalho mostrou que a maioria dos isolados estudados foram pouco acidificantes, pouco proteolíticas e bons produtores de aroma. Estas características são interessantes para elaboração de um fermento láctico apropriado para a elaboração de queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado.

Os *Enterococcus* fazem parte da microbiota natural do queijo de Coalho artesanal e devem ter uma contribuição significativa nas características do mesmo. No

entanto, para que estes microrganismos sejam adicionados a um fermento láctico é necessária a realização de mais estudos, principalmente no que diz respeito a sua patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J.D.G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R.T.; LIMA, C.P.; VASCONCELOS, N.M.; KUAYE, A.Y. Avaliação da capacidade de produção de ácido por bactérias ácido lácticas isoladas de leite e de queijos de Coalho artesanais produzidos no Ceará. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 306, p. 306-309. Jul./Ago. 2006.

COOGAN, T.M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P.S.; RENANDES, I.; GOMEZ, R.; KALANTZOPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M.C.; RODRIGUES, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 409-421, Aug. 1997.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheesemade from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers. 5:54-97, 2000.

FURTADO, M.M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. Viçosa, 1990. 95p. Dissertação (M.S.) Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. The Genus *Streptococcus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. London: Chapman & Hall, 1995. V.2

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hidrolisis of the proteins in milk. **Journal of the Dairy Science**, v. 30, p. 881-884, Jul. 1947.

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. 559-563, Apr. 2001

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J. R.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1**. Embrapa, Fortaleza, CE, p. 1-28, dez., 2001. Disponível em: . <<http://www.cnpat.embrapa.br>>. Acesso em: 20/03/2004.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem as fontes financiadoras: Banco Mundial – PRODETAB e CNPq (Processo 476700/2004-03).