

Isolamento e resistência ao resfriamento e congelamento de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo minas artesanal

SANTOS, L.M.N.L.¹; TRINDADE, S.M.¹; FARIA, R.L.R.¹; VINDEROLA, G.²; FERREIRA, J.M.S.¹; MAGALHÃES, J.T.¹

RESUMO

De queijos minas padrão artesanal provenientes de diferentes localidades de Minas Gerais, foram isoladas bactérias do ácido láctico. A pré-identificação das bactérias foi baseada em testes fenotípicos, como morfologia da célula, coloração de gram, ausência de catalase, esporos e mobilidade. Foram recuperados 21 isolados, dos quais 4 foram testados para a viabilidade em leite desnatado a 4°C durante 28 dias. Observou-se uma redução da carga microbiana de um ciclo log nos 14 primeiros dias em todos os isolados, mas após este período, eles voltaram a crescer. Os isolados mais resistentes ao resfriamento foram o M28 e QS9 e por isso, foram submetidos ao congelamento a -20°C por 30 dias. O isolado M28 apresentou a melhor resposta. Demonstrou-se assim, que o resfriamento e o congelamento não comprometeu a viabilidade celular dos isolados, o que pode favorecer seu emprego em produtos probióticos.

Palavras-chave: Bactéria do ácido láctico, estocagem, queijo minas artesanal, sobrevivência em baixa temperatura.

INTRODUÇÃO

O queijo minas artesanal é considerado um patrimônio histórico e cultural do estado de Minas Gerais, e trata-se de um dos principais produtos da agroindústria familiar mineira, sendo um alimento de consumo tradicional em todo o estado. Para ser caracterizado como queijo Minas

¹ Universidade Federal de São João del-Rei – Campus Centro-Oeste Dona Lindu – Laboratório de Microbiologia – CEP 35501-296 - Divinópolis – MG

² Universidad del Litoral – Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-COINCET) - Bv. Pellegrini 2750 (3000) Santa Fé – Argentina
livianepo2@gmail.com

Artesanal, o processo de produção deve seguir algumas normas, definidas na Lei estadual nº 14.185 de 2002, bem como ser fabricado a partir do leite cru, apresentar cor e sabor próprios, massa uniforme, sendo isento de corantes e conservantes¹.

Há muito tem sido relatado os benefícios do consumo de determinados tipos de alimentos para a saúde do indivíduo. Alguns desses alimentos contêm microrganismos que contribuem para o equilíbrio fisiológico do hospedeiro^{2,3}. Tais alimentos são conhecidos como probióticos, cuja definição se refere a suplementos alimentares com bactérias vivas que quando ingeridas, produzem efeitos benéficos ao hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota normal⁴. Trabalhos mostram a relevância das bactérias do ácido láctico, principalmente espécies de *Lactobacillus* isoladas de vários ambientes, como sendo as principais bactérias com efeitos probióticos^{5,6}. Vale ressaltar que uma cepa para ser considerada probiótica deve ficar viável por longo período até seu consumo, isto é, sobreviver aos processos tecnológicos do alimento e à estocagem, tolerar o baixo pH gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, bem como possuir capacidade de adesão no trato gastrointestinal, trazendo benefícios à saúde comprovados^{7,8,9}.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos isolar de queijo minas padrão artesanal bactérias do ácido láctico e verificar a viabilidade dos isolados frente ao resfriamento e ao congelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Os microrganismos foram isolados de queijos minas padrão artesanal oriundos de cidades do interior de Minas Gerais. Cerca de 25g das amostras foram homogeneizadas em 225 ml de salina e após diluições seriadas foi realizado o plaqueamento em ágar MRS, as quais ficaram incubadas a 37°C durante 48h em anaerobiose. Após a incubação, colônias em uma mesma placa apresentando morfologias diferentes foram coletadas e incubadas em caldo MRS a 37°C por 24h.

As bactérias lácticas foram identificadas segundo o manual de Bergey¹⁰ como sendo gram-positivas, catalase negativas, não móveis e não esporulantes. Somente as bactérias com forma de bastonete foram estocadas a -80°C em caldo MRS suplementado com glicerol (20%v/v) para posterior uso.

Para verificar a resistência destas bactérias durante o resfriamento, utilizou-se a metodologia descrita por Zacarías et al¹¹ com modificações. Os isolados foram crescidos em caldo MRS durante 24h a 37°C e 10µL dessa cultura foram adicionados em 1,5 ml de caldo MRS, o qual foi incubado nas mesmas condições anteriores. Após crescimento, as culturas foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 min, 4°C), lavadas duas vezes com tampão PBS pH7,4. Os precipitados foram homogeneizados em 500µL do mesmo tampão e em seguida, adicionados em 15ml de leite desnatado reconstituído a 10% (w/v) com pH6,5. Estes foram estocados a 4°C por 28 dias. As contagens foram realizadas em triplicata pelo plaqueamento de aliquotas da cultura em ágar MRS no tempo zero e semanalmente até que se completassem os 28 dias. Dois isolados foram testados para a resistência a estocagem a -20°C. As contagens foram realizadas no tempo zero e com 30 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

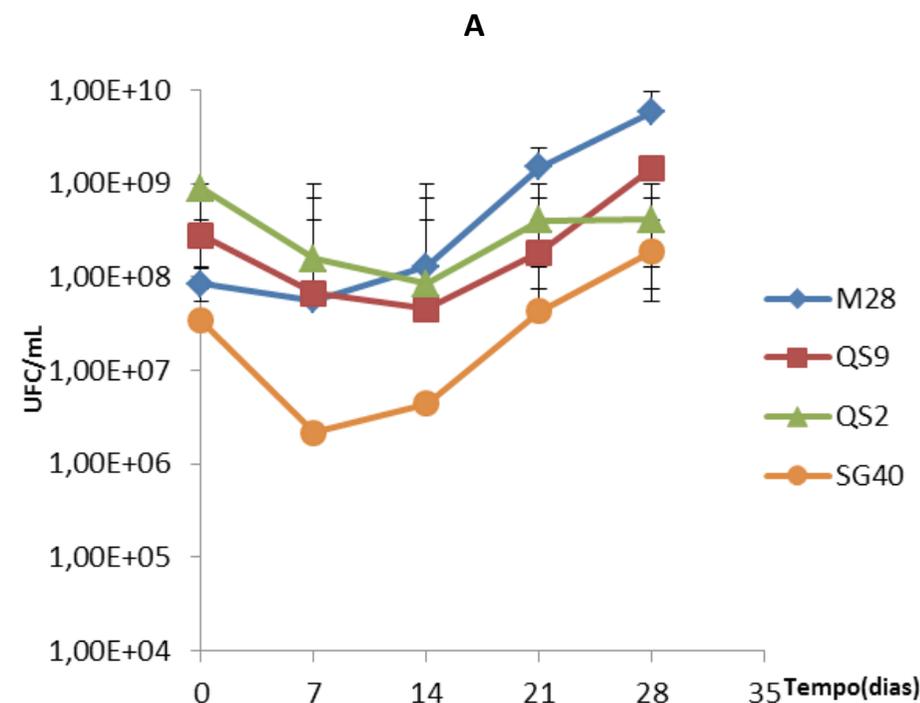
Foram isolados dos queijos vinte e uma bactérias e destas, quatro provenientes de diferentes amostras foram selecionadas para os testes de resfriamento e congelamento. Na figura 1A observa-se que as células sofreram uma pequena redução da carga microbiana (aproximadamente um ciclo log) nos primeiros 14 dias, voltando a crescer após este período, demonstrando assim, uma fase de adaptação àquele ambiente. O isolado M28 apresentou melhor resistência ao resfriamento e os isolados QS9 e QS2 tiveram o mesmo comportamento até 21 dias, porém enquanto QS2 parou seu crescimento após este período, QS9 continuou a crescer. Desta forma, M28 e QS9 atingiram cerca de 10⁹ células/ml após os 28 dias de estocagem.

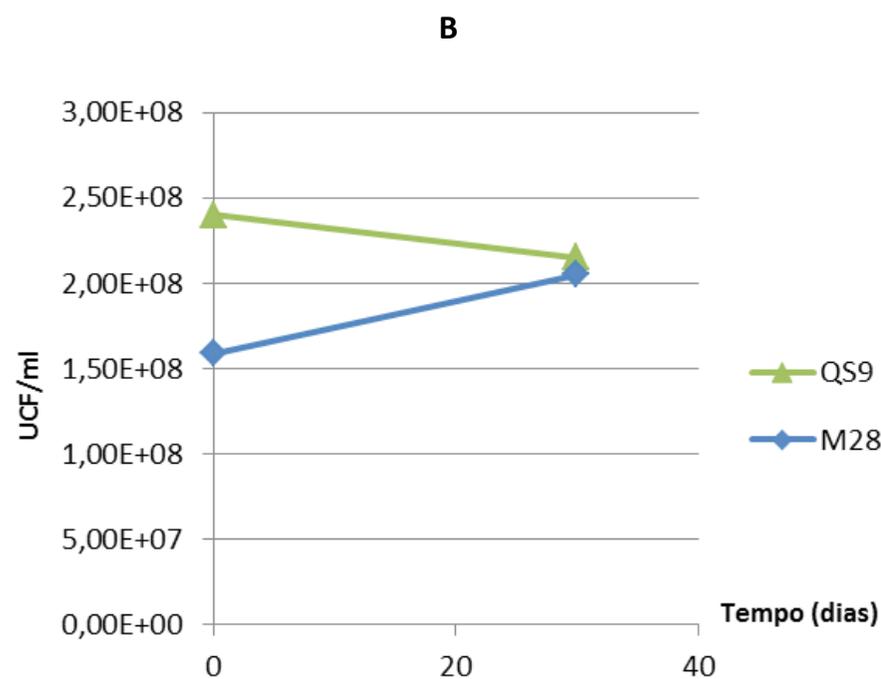
Os dois isolados que obtiveram melhor resposta ao resfriamento (M28 e QS9) foram submetidos ao congelamento a -20°C (Figura 1B). O isolado M28 também foi o que apresentou melhor resistência, pois continuou seu crescimento durante a estocagem.

O congelamento e resfriamento são técnicas amplamente utilizadas na indústria de probióticos para manter a viabilidade celular¹². Entre os fatores que vão influenciar a sobrevivência celular estão o pH do meio e a temperatura na qual ele é conservado.

A permeabilidade do oxigênio no recipiente é outro fator que pode diminuir a viabilidade celular durante o resfriamento e o congelamento, como demonstrado por Kurtmann et al.¹³ Por isso, é importante realizar a refrigeração ou congelamento em recipiente totalmente vedado, com volume completo para que não haja diminuição da viabilidade celular.

Figura 1. Sobrevivência de bactérias lácticas ao resfriamento a 4°C (A) e ao congelamento a -20°C (B).





CONCLUSÕES

O armazenamento das bactérias lácticas em leite desnatado reconstituído a 10% com pH 6,5 em 4°C por 28 dias e em 20°C por 30 dias é indicado, uma vez que não eliminou nem comprometeu a viabilidade das bactérias. Os isolados mais resistentes ao resfriamento foram M28 e QS9, sendo o M28 resistente também ao congelamento. Estes isolados são candidatos a prosseguirem os testes para verificarem seu potencial probiótico.

REFERÊNCIAS

- (1) Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) do Governo de Minas Gerais. Extraído de (<http://www.ima.mg.gov.br/acontece-no-ima/1321-programa-queijo-minasartesanal-comemora-10-anos->), acesso em 28 de maio de 2013.
- (2) Schrezenmeir, J.; Vrese, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73,(suppl),p.361-4, 2001;
- (3) Moraes, F.P. e Colla, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3(2), p.109-122, 2006

- (4) Oliveira, S., M.N.K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 38, p. 1-21, 2002.
- (5) Milesi, M.M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, C.A., Hynes, E. Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. **Food Research International**, v. 42, p.1186-1196, 2009.
- (6) 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.
- (7) Ouwenhand, A., Salminen, S., Isolauri, E. Probiotics: overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.
- (8) Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.1410-1417, 2005.
- (9) Champagne, C., & Gardner, N. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p.61-84, 2005.
- (10) Hensyl, W. R. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9ªed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1994.
- (11) M.F. Zacarías, A. Binetti, M. Laco, J. Reinheimer, G. Vinderola Preliminary technological and potential probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal** v.21, p.548-555, 2011.
- (12) Fonseca, F., Béal, C., Mihoub, F., Marin, M., & Corrieu, G. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. **International Dairy Journal**, v.13, p.917-926, 2003.
- (13) Kurtmann, L.; Carlsen, C.U.; Risbo, J.; Skibsted, L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate. **Cryobiology**, v.58, p. 175-180, 2009.