

CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO COALHO ARTESANAL DA PARAIBA, NORDESTE, BRASIL.

MEDEIROS, R.S.¹; ARAUJO, L.M.¹; GONÇALVES, M.M.B.P.²; NETO, V.Q.³

¹ Universidade Federal de Campina Grande(UFCG)/Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR)-Patos(PB)-Doutoranda;

² Universidade Nova de Lisboa (UNL)/Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT)-Lisboa (PT) – Orientadora;

³ Universidade Federal de Campina Grande(UFCG)/Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR)-Patos(PB)- Co-orientador.

INTRODUÇÃO

No Nordeste, a produção de queijo de coalho artesanal representa uma atividade econômica importante na cultura e na renda familiar (Menezes et al., 2010). Originalmente produzido nos estados do Nordeste do Brasil a partir de leite cru, o queijo de coalho atualmente vem conquistando espaço e interesse nas outras regiões do Brasil. O queijo de coalho é obtido através da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado em até dez dias (BRASIL, 2001).

O Estado da Paraíba possui mais de 50 municípios produtores de queijos artesanais, como queijo de Coalho e/ou queijo de manteiga. Essa produção concentra-se a maior parte na mesorregião Sertão, distribuídos nas suas sete microrregiões, Catolé do Rocha, Cajazeiras, Sousa, Itaporanga, Patos, Piancó e Serra do Teixeira. Desta forma, esta mesorregião concentra a maior parte da produção de queijo de Coalho da Paraíba (<http://www.sertaobras.org.br/blog/2011/04/07/queijos-artesanais-sofrem-restries-em-cajazeiras-pb/> acessado em 01/06/15).

As Bactérias Ácido Lácticas (LAB), encontradas no leite e no queijo cru, podem ser originadas naturalmente da microbiota lácticas ou adicionadas intencionalmente durante o processo de fabricação de queijos. Essas bactérias podem estar associada a propriedades como sabor, textura e aroma aos produtos lácteos, sendo amplamente empregadas como culturas iniciadoras em diversos produtos dessa indústria (Carr et al., 2002). O interesse na microbiota de queijo de leite cru e outros produtos lácteos tradicionais ainda desperta interesse devido a necessidade de identificação de novas estirpes de LAB (Wouters et al., 2002). O objetivo da presente pesquisa foi isolar e identificar as bactérias ácido lácticas provenientes de amostras de queijo Coalho artesanais produzidos no Sertão da Paraíba.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Amostragem

As 15 amostras do queijo de Coalho produzidas com leite sem pasteurização foram coletadas em queijeiras e comércio local no período de junho de 2013 a agosto de 2014, em quatro das sete microrregiões que compõe a Mesorregião do Sertão Paraibano: Cajazeiras, Souza, Patos e Itaporanga. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo para o Laboratório de Microbiologia que pertence ao Laboratório Multiusuário de Pesquisas Ambientais (LAMPA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, Paraíba, Brasil.

2.2. Preparação das amostras e isolamento das Bactérias Acido-Láticas (LAB).

Pesou-se 25 g de cada amostra em balança semi analítica (Shimadzu), e posteriormente, homogeneizadas em aparelho tipo Stomacher (Seward, 400), por 3 minutos, com 225 ml de solução estéril de citrato de sódio 2% (Vetec). As diluições decimais das amostras foram realizadas em solução peptonada a 0,1% (Merck) estéril⁶. Dessas diluições semeou-se 1,0 ml em placas de Petri, em duplicata, com adição de aproximadamente 20 mL dos meios de cultivos seletivos estéreis De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e M17 (Himedia). Nas placas contendo o ágar MRS adicionou-se uma sobrecamada. Os meios de cultura foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante com as seguintes modificações: M17 - foi acrescido de púrpura de bromocresol (0,04g/L) e - MRS - foi adicionado púrpura de bromocresol (0,04g/L) e carbonato de cálcio (5,0g/L), ambos para facilitar a visualização de halos amarelos em torno das colônias, indicadores da produção de ácidos⁷. As placas de Petri contendo o meio MRS foram incubadas a temperatura de 30 °C/48 h (LAB mesófilas) e as que continham o ágar M17 foram incubadas a 30 °C/48h (LAB mesófilas) e 42 °C/48h (LAB termófilas) em condições de anaerobiose⁸.

2.3. Isolamento e Purificação das colônias de LAB.

Após a incubação, as colônias foram contadas com o auxílio do contador de colônias (Phoenix) e as placas que apresentavam entre 25 a 250 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa foram selecionadas para isolamento e purificação. De cada meio de cultura (MRS e M17) e temperatura foram selecionadas 10 colônias. As colônias foram retiradas das placas com o auxílio da alça de platina estéril e transferidas para 10 mL de caldo MRS e M17, respectivamente, e incubadas a 30 °C e 42 °C, por 24 h, para crescimento de BAL mesófilas e termófilas (Silva et al., 2007).

Após o crescimento em caldo, o cultivo foi plaqueado pelo método de estrias em placas contendo ágar MRS e M17 e incubadas a 30 °C e 42 °C, respectivamente, por um período de 48 horas em condições de anaerobiose. Em seguida, as colônias viáveis foram submetidas ao teste de catalase e a coloração de Gram e visualizadas em microscópio óptico com lente objetiva 100x e óleo de imersão. Foram consideradas como características lácticas as

colônias Gram positivo na forma de cocos, bacilos ou bacilos cocóides e catalase negativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de LAB cultivados nos meios específicos e nas temperaturas de incubação a 30 °C(mesófilas) e 42 °C(termófilas) apresentaram uma população elevada de LAB (Tabela 1), variando de 10^8 a 10^{11} . A microrregião de Itaporanga foi a que apresentou maior número de UFC/g de queijo de Coalho ($2,3 \times 10^{11}$) de LAB, com destaque para as colônias mesófilas que cresceram no meio M17, com 10^{11} . Cajazeiras foi a microrregião que apresentou menor numero de UFC/g, com 10^8 .

Tabela 1. Média de LAB (UFC/g) isolado de queijo de coalho artesanal produzido na Mesorregião do Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.

MICRORREGIÃO	MEIOS DE CULTIVO E TEMPERATURA		
	MRS	M17(30 °C)	M17(42 °C)
Cajazeiras-R2	$5,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
Sousa-R3	$4,5 \times 10^8$	$4,9 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^8$
Patos-R4	$4,2 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
Itaporanga-R6	$4,6 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^{10}$

As características morfológicas das LAB encontram-se na tabela 2. Foram observadas as características morfológicas, a reação das colônias ao teste de Gram e ao teste da catalase, selecionando as colônias Gram positivas, catalase negativas e com forma de cocos, bacilos ou bacilo cocóide. O meio de cultura M17 apresentou uma elevada seletividade para a forma cocóide, onde 91,87% dos isolados eram cocos, 7,18% eram bacilos e 0,93% era bacilo cocóide. No meio MRS foi observado o crescimento, em sua maioria, de colônias na forma bastonete, com 81,87%, bacilo cocóide com 18,12% enquanto que nenhuma colônia cocóide cresceu nesse meio.

Tabela 2. Características morfológicas das Bactérias Ácido lácticas isoladas de queijo Coalho produzido na Mesorregião do Sertão Paraibano.

MICRORREGIÃO	BACILO		COCOS		BACILO COCÓIDE	
	MRS	M17	MRS	M17	MRS	M17
Cajazeiras	36	4	0	74	4	2
Sousa	24	16	0	64	16	0
Patos	31	3	0	76	9	1
Itaporanga	40	0	0	80	0	0

Os resultados apresentados nesta pesquisa revelam uma grande diversidade de LAB identificadas nas amostras de queijo de Coalho produzido no estado Paraíba. Esta população deve-se ao fato de se tratar de um queijo artesanal, ou seja, processado com leite não pasteurizado. Como a matéria-prima é rica em bactérias lácticas e também não-lácticas, oriunda da glândula mamária, ambiente, água ou manipulação, justifica, portanto, o número elevado de microrganismos no queijo Coalho. **Guedes Neto (2008) encontrou resultado semelhante no queijo de Coalho produzido em Pernambuco.**

O elevado número de colônias mesófilas encontradas nas quatro microrregiões pode ser atribuído a uma possível uniformização no processo de fabricação do queijo, sugestivo do não cozimento da massa. Resultado diferente foi encontrado por Carvalho (2007) que pesquisando sobre a microbiota do queijo de Coalho produzido no Ceará encontrou que as termófilas prevaleceram sobre as mesófilas, que foi atribuída ao cozimento da massa realizado no processamento do queijo de Coalho daquele estado, responsável por modificar a microbiota proveniente da matéria-prima, selecionando bactérias resistentes a temperaturas elevadas.

As LAB isoladas do queijo de Coalho no meio de cultivo M17 confirmaram sua especificidade para cocos. O número elevado de colônias com aspecto cocóide que cresceram no M17 em ambas as temperaturas foram responsáveis por 91,87%. **Resultado semelhante foi verificado por Albuquerque (2010) em sua pesquisa com queijo de Coalho de Pernambuco que encontrou também um percentual aproximado de cocos dentre as LAB. Em outros queijos produzidos com leite não pasteurizado na Europa esse resultado também foi semelhante. Pangallo et al. (2014) encontraram resultados semelhantes em sua pesquisa com queijo Bryndza, que confirmou a identidade do grupo lactococos com o meio M17.**

4. CONCLUSÃO

Com os resultados desta pesquisa conclui-se que:

- A microrregião de Itaporanga foi a que apresentou o maior número de colônias de LAB;
- O meio de cultura M17 apresentou uma elevada seletividade para a forma cocóide;
- O meio MRS apresentou uma elevada seletividade para LAB na forma bastonete.

5. REFERÊNCIAS

- Albuquerque, C. T., 2010. **Perfil microbiano láctico do queijo de coalho artesanal de Cachoeirinha-PE, Brasil.** 78f. Dissertação (Mestrado) curso-Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- **BRASIL.** SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de

identidade e qualidade de Manteiga da Terra, queijo de Coalho e queijo Manteiga. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 jul. 2001. Seção 1, p.13.

- CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.** Campinas, SP. 2007. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 2007.

- Carr, F. J., Chill, D., Maida, N., 2002. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in microbiology.** New York, v. 28, n.4, p. 281-370.

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

- <http://www.sertaobras.org.br/blog/2011/04/07/queijos-artesanais-sofrem-restries-em-cajazeiras-pb/> acessado em 01/06/15.

- GUEDES NETO, L. G., 2008. **Isolamento, Identificação e Avaliação de Características Probióticas de Bactérias Ácido-Láticas isoladas de amostras de queijo de coalho produzidas em Pernambuco – Brasil.** 189f. Tese (Doutorado) Programa de Doutorado em Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

- MENEZES, S.S.M.; CRUZ, F.T.; MENASCHE, R. QUEIJO DE COALHO CASEIRO: a tradição como ativo territorial no município de Porto da Folha. **Ateliê Geográfico**, Goiânia-GO v. 6, n. 3 (Ed. Especial) Out/2012 p. 52-71 Página 52.

- Pangallo, D.; Saková, N.; Korenová, J.; Puskarová A.; Kraková, L.; Valík, L.; Kuchta, T. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. **International Journal of Food Microbiology.** 170 (2014) 38–4.

- Silva, L. F., 2011. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala.** 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Mestre em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, São José do Rio Preto.

- Wouters, J. T.; Ayad, E. H.; Hugenholtz, J.; Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal, Barking**, v. 12, n. 2-3, p. 91-109, 2002.