

Utilização de duas estirpes de bactérias do ácido láctico com propriedades anti-listéria e anti-clostrídio no fabrico de queijo fresco

Márcia C. Costa, Susana Ribeiro, Maria de Lurdes Enes Dapkevicius, Célia C.G. Silva*

CITA-A, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal

* celia@uac.pt

Palavras chave: bactérias do ácido láctico; listéria; queijo; bacteriocinas

RESUMO

Actualmente os consumidores estão cada vez mais atentos ao risco que constitui a presença de microrganismos patogénicos e aditivos químicos nos alimentos, estimulando-se assim o interesse pela procura de conservantes naturais. As bacteriocinas, produzidas pelas bactérias do ácido láctico (BAL), podem ser consideradas conservantes naturais que preenchem estes requisitos. O presente trabalho teve como objectivo a aplicação de BAL produtores de bacteriocinas, no fabrico de queijo fresco. Nesse sentido, foram seleccionados dois isolados (L2B21K3 e L3A21K6) com actividade antibacteriana contra a *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*. Estes isolados foram identificados como *Enterococcus faecalis*. Foram avaliadas a β -hemólise, gelatinase, termonuclease e produção de histamina, observando-se um resultado negativo para todos os factores de virulência testados. De forma a avaliar a produção de bacteriocinas, estes isolados foram utilizados como culturas de arranque na produção de queijo fresco. Foram avaliados vários parâmetros (crescimento das BAL, pH e acidez titulável) durante o fabrico e armazenamento do queijo. A actividade anti-microbiana foi realizada pelo método de difusão em agar com os extractos neutralizados livres de células. Observou-se o crescimento dos dois isolados durante todo o processo atingindo-se a fase estacionária às 48 horas. Os valores de pH mantiveram-se estáveis durante todo o processo (6,2 – 6,6), embora se tenha observado um aumento da acidez titulável para um dos isolados (L2B21K3). Este isolado apresentou actividade antibacteriana no queijo desde a introdução da coalhada nos cinchos (0 horas) e durante o armazenamento do queijo (4°C), enquanto que o segundo isolado (L3A21K6) apenas apresentou actividade detectável após 48 horas. Estes resultados demonstram que a inclusão de BAL no fabrico de queijo fresco pode ser eficaz na prevenção do crescimento de microrganismos patogénicos.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) ocorrem naturalmente nos alimentos e por essa razão a sua utilização na indústria alimentar pode ser considerada como segura (“generally recognised as safe” - GRAS). Dentro das BAL, o género *Enterococcus* pode ser encontrado em muitos

produtos alimentares, em especial nos produtos lácteos como é o caso de queijos tradicionais produzidos com leite cru [1]. Algumas dessas estirpes têm a capacidade de produzir bacteriocinas, designadas de enterocinas [2]. As bacteriocinas são péptidos ou proteínas sintetizadas pelas bactérias, com um largo espectro de actividade contra outras espécies que incluem as bactérias patogénicas como a *Listeria monocytogenes* [3,4]. Esta bactéria provoca uma grave infecção alimentar que afecta essencialmente as mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com o sistema imunitário comprometido. Leite e queijos são considerados os alimentos de maior risco, embora possam ocorrer surtos com outros tipos de alimentos como as saladas e vegetais prontos para o consumo. A eliminação de microrganismos patogénicos utilizando meios naturais em substituição de conservantes adicionados, constitui uma tendência actual imposta pelas preferências dos consumidores. Dessa forma, a aplicação de BAL produtoras de bacteriocinas na indústria alimentar, nomeadamente na produção de queijo, pode constituir uma vantagem a ser explorada.

O principal objectivo do presente trabalho consistiu na avaliação de dois isolados BAL produtores de bacteriocinas, obtidos de um queijo tradicional - queijo do Pico, produzido a partir de leite cru. Foi avaliada a capacidade dos dois isolados para produzir bacteriocinas contra a *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de forma a aumentar a segurança.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizados neste estudo dois isolados de bactérias do ácido láctico - *Enterococcus faecalis* (L2B21K3 e L3A21K6), identificados pelo sistema API 20 Strep (bioMerieux, France). Estas BAL foram previamente isoladas do queijo do Pico (queijo artesanal) e seleccionadas por apresentarem actividade anti-microbiana contra duas estirpes alvo de referência, *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 e *Clostridium perfringens* ATCC 8357.

2.2 Factores de virulência

A actividade hemolítica dos dois isolados foi determinada em meio de agar-sangue [5]. A produção da enzima gelatinase foi determinada de acordo com a metodologia de Terzic-Vidojevic *et al.* [6]. A produção da enzima DNase foi pesquisada no meio *DNase Test Agar* [7]. A produção de histamina foi determinada com recurso a um meio diferencial [8].

2.3 Fabrico do queijo fresco

Foi realizado um prévio crescimento em leite UHT magro durante 48 horas a 30°C, antes da inoculação (1%) em leite pasteurizado. Após incubação a 32°C durante 20 min, procedeu-se à elaboração dos queijos pelos métodos tradicionais. Leite meio-gordo pasteurizado contendo 0,02% CaCl₂ e 1% NaCl, aquecido a 32°C foi inoculado com as culturas BAL (1%) e adicionado o coalho (LMF 1/15.000, 0,2g/L). Após 40 min a coalhada foi cortada em cubos de 2 cm, aumentando-se a temperatura para 37°C. Após 25 min escorreu-se o soro e colocou-se a coalhada nos respectivos cinchos. Os queijos foram armazenados à temperatura de 4°C.

2.4 Crescimento e actividade antimicrobiana

Foram retiradas amostras de queijo com 5 g às 0, 6, 24 e 48 horas de refrigeração (4°C). Procedeu-se à contagem por plaqueamento em meio de KF (incubação a 30°C, por 48 horas). Foi realizado o estudo da actividade antimicrobiana no queijo utilizando-se a *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 como estirpe alvo de referência. As amostras de queijo foram centrifugadas a 7000 g durante 5 min e os sobrenadantes neutralizados com a adição de tampão fosfato (0,2 M, pH 7) e filtrados (0,22 µm). Estes sobrenadantes foram congelados até à realização do teste pelo método de difusão em agar [9]. Foi igualmente testado o queijo fresco pelo mesmo método, introduzindo-se directamente uma alíquota nos poços. Todas as experiências foram realizadas em duplicado e os testes em triplicado.

2.5 Determinação da acidez titulável e pH

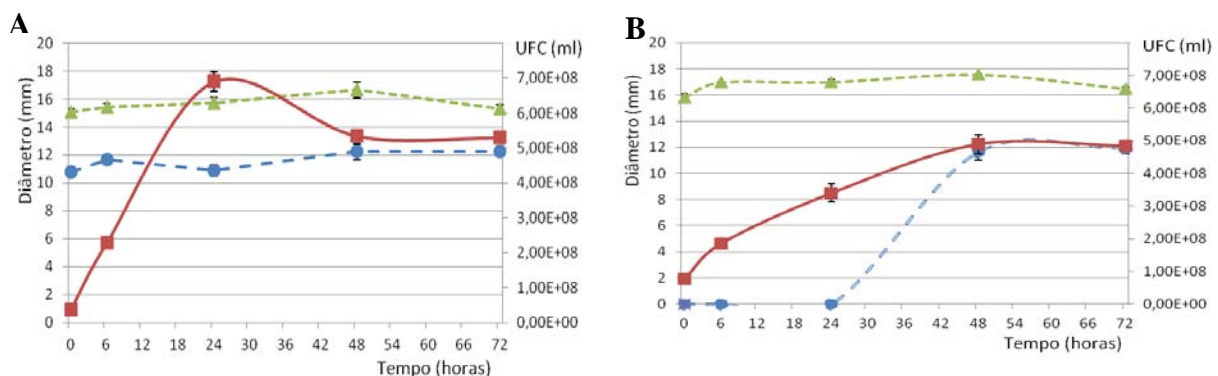
Foram realizadas amostragens de queijo às 0 horas (na altura de colocação nos cinchos) e após 6, 24 e 48 horas de refrigeração (4°C) para medição do pH e a acidez titulável [10].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois isolados BAL apresentaram resultados negativos para os factores de virulência testados. Os compostos anti-bacterianos produzidos pelos dois isolados testados foram inactivados por enzimas proteolíticos (e.g. proteinase K), demonstrando a natureza proteica característica das bacteriocinas. Estes são no entanto, insensíveis à quimosina presente no coalho, o que permite a sua utilização no queijo. Os queijos preparados com os isolados BAL apresentaram valores iniciais de pH de 6,4, baixando ligeiramente para 6,2 ao fim de 72 horas. No entanto, registou-se um aumento da acidez (ácido láctico) para o queijo produzido com o isolado L2B21K3 (de 0,04 g/100g para 0,1 g/100g). Não se observaram alterações na acidez nos queijos controle e produzidos com o isolado L3A21K6 (0,05 g/100g).

Na figura 1 estão representadas as curvas de crescimento no queijo fresco dos dois isolados testados, bem como a actividade anti-listéria do queijo e dos extractos de queijo neutralizados. Os dois isolados cresceram no queijo a 4°C, atingindo a fase estacionária às 48 horas, com o aumento de 1 unidade log UFC/mL (aprox. $5 \cdot 10^8$ UFC/mL).

Figura 1. Cinética do crescimento das estirpes L2B21K3 (A) e L3A21K6 (B) no queijo a 4°C (■) e produção de bacteriocinas (diâmetro dos halos de inibição do crescimento de listéria) do extracto neutralizado (●) e do queijo (▲). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duas réplicas.



O isolado L2B21K3 apresentou um crescimento mais rápido e actividade anti-listéria nos extractos neutralizados desde a introdução da coalhada nos cinchos (0 horas). O segundo isolado (L3A21K6) apresentou um crescimento inicial mais lento e actividade anti-listéria detectável no extracto após 48 horas de armazenamento (4°C). Todas as amostras de queijo testadas mostraram possuir elevada actividade anti-microbiana desde o início, o que pode ser atribuído ao efeito conjunto das bacteriocinas e do ácido láctico. Recentemente, a utilização de bacteriocinas no controle da contaminação por listéria nos alimentos tem suscitado o interesse na pesquisa de BAL produtoras de bacteriocinas em produtos artesanais, sendo algumas dessas estirpes também pró-bióticas [2,4,11]. No nosso trabalho, foi demonstrada a presença de bacteriocinas durante as fases iniciais de produção de queijo fresco. O isolado L2B21K3, com uma produção de bacteriocinas inicial elevada, apresentou igualmente uma elevada capacidade de acidificação, podendo ser assim utilizado como cultura de arranque no fabrico de queijos maturados. Já o isolado L3A21K6 com uma produção não detectada de ácido láctico durante a refrigeração a 4°C tem um elevado potencial para ser utilizado na produção de queijo fresco. O presente estudo constituiu uma primeira avaliação da capacidade dos isolados seleccionados produzirem bacteriocinas no queijo, sendo no futuro estudada a sua acção na redução de listéria no queijo, bem como as possíveis propriedades probióticas.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que a inclusão de BAL produtoras de bacteriocinas no fabrico de queijo fresco pode ser eficaz na prevenção do crescimento de microrganismos patogénicos como a *Listeria monocytogenes*. A descoberta de novas bacteriocinas com elevada actividade contra bactérias indesejáveis pode constituir uma vantagem a ser explorada pela indústria alimentar na criação de produtos sem conservantes e com actividade probiótica.

Agradecimentos

Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projecto PTDC/AGR-ALI/104385/2008.

Referências

- [1] JM Kongo, AJ Ho, FX Malcata, M Wiedmann, J Appl Microbiol, 2007, 89, 267-274.
- [2] R Cebrián, A Baños, E Valdivia, R Pulido, M Maqueda, Food Microbiol, 2012, 30, 59-67.
- [3] BD Bello, L Cocolin, G Zeppa, D Field, PD Cotter, C Hill, Int J Food Microbiol, 2012, 153, 58-65.
- [4] S Mills, C Stanton, C Hill, RP Ross, Annu Rev Food Sci Technol, 2011, 2, 299-329.
- [5] IA Asteri, N Robertson, DM Kagkli, P Andrewes, G Nychas, Int Dairy J, 2009, 19, 595–604.
- [6] A Terzic-Vidojevic, K Veljovic, M Tolinacki, M Nikolic, M Ostojic, Genetika, 2009, 41, 117-136.
- [7] H Gupta, RK Malik, Lait, 2007, 87, 587-601.
- [8] HMLJ Joosten, MD Northold, Appl Environ Microb, 1989, 55, 2356-2359.
- [9] JR Tagg, AR McGiven, Appl Microbiol, 1971, 21, 943.
- [10] RS Kirk, R Sawyer, Pearson's Composition and Analysis of Foods, 9th ed., 1981, Longman, UK.
- [11] C Franz, M Huch, A Hikmate, W Holzappel, A Gálvez, Int J Food Microbiol, 2011, 151, 125-140.