

Prospecção e seleção de *Lactobacillus* a partir de amostras de leite cru da microrregião de Toledo-PR para aplicação na indústria queijeira

Prospecting and selection of *Lactobacillus* from raw milk samples from the Toledo-PR microregion for application in the cheese industry

Natalia Alice Bender¹, Ana Luisa Kirsten da Silva², Cleverson Busso³, Renato Eising⁴

RESUMO

Neste estudo, bactérias ácido-láticas (BAL) do gênero *Lactobacillus* foram isoladas e caracterizadas a partir de amostras de leite da microrregião de Toledo-PR, com o objetivo de selecionar cepas adequadas para a produção de queijos. BAL são bactérias Gram-positivas, catalase-negativas, endósporos-negativas e, em sua maioria, sem motilidade. O método de isolamento envolveu a inoculação de amostras de leite em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e a seleção de colônias com base em características morfológicas. Dos 250 isolados obtidos, 68 foram identificados como catalase-negativos, e 59 como Gram-positivos. Algumas cepas apresentaram motilidade, apesar da característica geralmente não móvel dessas bactérias, resultando na seleção de mais três cepas para análises posteriores. Os testes de fermentação de lactose demonstraram que 31 cepas produziram ácidos orgânicos a partir da lactose, indicando suas propriedades fermentativas. Além disso, todas as 31 cepas foram capazes de crescer na presença de 1% de NaCl, com uma redução na capacidade de fermentação em concentrações mais elevadas de sal. No final dos testes, foram selecionadas 16 cepas com características de interesse. Os próximos passos incluem testes de tolerância a pH e temperatura, bem como análises moleculares para uma identificação precisa a nível de espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação, *Lactobacillus*, produtos lácteos, testes bioquímicos.

ABSTRACT

In this study, lactic acid bacteria (LAB) of the genus *Lactobacillus* were isolated and characterized from milk samples from the Toledo-PR microregion, with the aim of selecting suitable strains for cheese production. LAB are Gram-positive, catalase-negative, endospore-negative bacteria and, for the most part, without motility. The isolation method involved inoculating milk samples on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar and selecting colonies based on morphological characteristics. Of the 250 isolates found, 68 were identified as catalase-negative, and 59 as Gram-positive. Some strains showed motility, despite the generally non-motile characteristic of these bacteria, resulting in the selection of three more strains for further analysis. Lactose fermentation tests demonstrated that 31 strains produced organic acids from lactose reduced its fermentative properties. Furthermore, all 31 strains were able to grow in the presence of 1% NaCl, with a reduction in fermentation capacity at higher salt concentrations. At the end of the tests, 16 strains with characteristics of interest were selected. Next steps include pH and temperature tolerance testing, as well as molecular analyzes for accurate species-level identification.

KEYWORDS: Fermentation, *Lactobacillus*, dairy products, biochemical tests.

¹ Bolsista Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: nataliaalicebender@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2104223792077602.

² Bolsista da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: luisakirsten26@gmail.com. ID Lattes: 2727504315955207

³ Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias em Biociências. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: cleversonbusso@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5986131313813011.

⁴ Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias em Biociências. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: renatoeising@utfpr.edu.br. ID Lattes: 6674593941272595.

INTRODUÇÃO

A fermentação de alimentos é um processo utilizado há séculos ao redor do mundo, tanto como uma forma de preservação de alimentos perecíveis como para adicionar características organolépticas desejáveis por meio da ação de microrganismos (Schoustra *et al.*, 2022). Existem diversos tipos de fermentação, que está diretamente relacionada ao metabolismo do microrganismo utilizado. Dentre elas, está a fermentação ácido-lática, que envolve a utilização de bactérias ácido-láticas.

Bactérias ácido-láticas (LAB) são um conjunto de *coccus* ou *bacillus* gram-positivos, catalase-negativas, não-esporulantes e sem motilidade, apesar de haver algumas exceções reportadas na literatura em relação à motilidade. Elas também são caracterizadas por sua capacidade de fermentar a lactose em ácido lático. Além do ácido lático, essas bactérias podem produzir uma ampla variedade de ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido propiônico, entre outros (Kajikawa, Suzuki, Igimi, 2018; Bangar *et al.*, 2022; Yi *et al.*, 2022).

Bactérias ácido-láticas (LAB) são muito utilizadas na fermentação de produtos lácteos, como os queijos. Nesse tipo de produto, elas são responsáveis por características de sabor, textura e aroma, e podem variar de acordo com o clima, altitude, alimentação animal e qualidade do leite cru utilizado (Erhardt *et al.*, 2023).

Dentre o grupo das bactérias ácido-láticas, estão os *Lactobacillus*, que desempenham um papel de suma importância em alimentos fermentados, consequentemente são vastamente utilizados na biotecnologia. Esse gênero de bactérias é dominante na produção de queijo com leite cru por sua capacidade de crescer sob severas condições seletivas e gerar desejáveis propriedades sensoriais devido às suas atividades proteolíticas, além de produzirem aromas e sabores específicos, devido aos pequenos peptídeos e aminoácidos voláteis (Ehsani *et al.*, 2018).

Levando isso em conta, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar *Lactobacillus* presentes na microrregião de Toledo-PR visando sua aplicação no desenvolvimento e produção de um novo tipo de queijo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram obtidas 10 amostras de leite cru de produtores conveniados ao Projeto de Queijos Finos do Biopark, na microrregião de Toledo-PR. As amostras foram coletadas diretamente do resfriador em frascos esterilizados e transportadas para o laboratório em caixas térmicas com gelo. Os frascos foram mantidos em congelador até o início das análises.

Isolamento de bactérias ácido-láticas do leite

Para o isolamento da microbiota do leite cru, foi utilizado o meio de cultivo ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), um meio de cultura seletivo projetado para favorecer o crescimento de *Lactobacillus* para estudo laboratorial. Para isso, cada amostra foi inoculada em uma placa de Petri utilizando a técnica de *pour plate* com 1 mL da amostra diluída a 10^{-1} em solução salina (0,9% NaCl). As placas foram incubadas em estufa a

32°C durante 72h em condições de microaerofilia. Vinte e cinco colônias com características semelhantes às de bactérias ácido-láticas foram isoladas, também em ágar MRS, e incubadas novamente nas mesmas condições para análises posteriores (Wassie, Wassie, 2016).

Teste de catalase

Os microrganismos que possuem a enzima catalase têm a capacidade de efetuar a quebra do peróxido de hidrogênio. Esse processo de decomposição resulta na formação de oxigênio e água, que pode ser visualizado pela produção de bolhas quando uma alça contendo bactérias é combinada com uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em uma lâmina de microscópio (Adikari, 2021).

Coloração de Gram

O método da coloração de Gram baseia-se na capacidade das bactérias Gram-positivas de reter o corante cristal violeta em suas paredes celulares durante a exposição a uma solução de etanol-acetona, enquanto as bactérias Gram-negativas não o fazem. Esse método envolve a sequência de tratamento de um esfregaço bacteriano fixado por calor com os reagentes cristal violeta, lugol, etanol-acetona e fucsina básica. Bactérias que retêm a coloração violeta são identificadas como Gram-positivas, enquanto aquelas que aparecem rosa são chamadas de Gram-negativas (Provida, 2023).

Teste de motilidade

A motilidade é um fenômeno que se manifesta pela capacidade do microrganismo de se locomover. Esse método consiste na observação macroscópica de uma zona de crescimento difuso que se propaga a partir da linha de inoculação feita utilizando uma agulha bacteriológica em 2/3 de um meio de cultivo semi-sólido, neste caso, foi utilizado o caldo Motilidade, Indol e detecção de produção de H₂S (caldo SIM). Os tubos foram incubados em estufa a 32°C durante 6 dias para observação do crescimento (Shields; Cathcart, 2011).

Teste de fermentação da lactose

O teste consistiu na inoculação dos microrganismos selecionados em tubos contendo Caldo Lactose com o indicador de pH púrpura de bromocresol, incubados em estufa a 32°C por uma semana em triplicatas. O resultado se deu pela mudança ou não da coloração do líquido (Gunkova *et al.*, 2021).

Teste de tolerância a NaCl

A capacidade de crescer sob diferentes concentrações de NaCl foi testada inoculando-se os isolados em caldo lactose contendo o indicador de pH de púrpura de bromocresol ajustado com diferentes concentrações de NaCl (1%, 3%, 5% e 7% m/v) e incubado a 32°C por uma semana em triplicatas (Adikari *et al.*, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 250 microrganismos isolados, 68 cepas (27,2%) demonstraram a característica desejada de serem catalase-negativas. Após a identificação de Gram, 59 dessas cepas (23,6% do total) foram classificadas como Gram-positivas, enquanto 9 foram identificadas como Gram-negativas. As investigações subsequentes foram direcionadas especificamente para as cepas Gram-positivas.

Em um teste subsequente, 32 cepas (12,8% do total) não demonstraram motilidade, embora seja importante mencionar que, de acordo com a literatura (Kajikawa, Suzuki e Igimi, 2018), uma pequena proporção de *Lactobacillus* pode apresentar motilidade. Portanto, três cepas que exibiam características microscópicas semelhantes ao gênero *Lactobacillus* foram consideradas em análises adicionais.

No teste de fermentação de lactose, 31 cepas (12,4% do total) apresentaram resultado positivo. Em relação ao teste de tolerância ao cloreto de sódio (NaCl), todas as 31 cepas foram capazes de crescer na presença de 1% de NaCl, mas esse número diminuiu para 26 cepas (10,4%) em 3% de NaCl e para 17 cepas (6,8%) em 5% de NaCl. No teste com 7% de NaCl, 10 cepas demonstraram uma fermentação vigorosa, enquanto 6 cepas exibiram uma fermentação fraca e uma cepa não demonstrou nenhuma atividade de fermentação.

Conseqüentemente, um total de 16 cepas (6,4% do total) foram selecionadas como potenciais candidatas para serem utilizadas como culturas starter na produção de queijo, com base em suas características de serem catalase-negativas, Gram-positivas, apresentarem capacidade de fermentação da lactose e tolerância ao sal.

CONCLUSÃO

Os testes de tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) representaram a etapa final do processo seletivo, culminando na escolha de 16 cepas que exibiram as características desejadas. É importante observar que, embora a concentração de NaCl em queijos possa variar em uma faixa considerável, de 0,5% a até 7% (El-Bakry, 2012), a seleção priorizou microrganismos com a maior tolerância ao sal, a fim de garantir que essas cepas apresentassem um desempenho robusto e adaptável para aplicação em uma ampla variedade de queijos.

Após a conclusão dessa fase de seleção, serão conduzidos testes abrangentes para a caracterização bioquímica das cepas, incluindo avaliações de tolerância a diferentes temperaturas, resistência em várias faixas de pH, capacidade de fermentação de diversos açúcares e, em seguida, a identificação em nível de espécie será realizada por meio de análises de biologia molecular com o *primer* 16S. Esse processo envolverá a comparação dos dados genéticos obtidos com informações disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Dessa forma, a escolha das cepas de microrganismos para potenciais candidatas para a produção de queijo envolveu um rigoroso processo de seleção, visando garantir sua adaptabilidade e desempenho em diversas condições de produção de queijo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark, da Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA) (processo BIO2020031000036) e da Diretoria de Relações Empresariais e Comunitárias da UTFPR (Edital 06/2022), Campus Toledo, pelo presente trabalho.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não houve conflito de interesses na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ADIKARI, A. M. M. U. *et al.* Isolation, identification and characterization of *Lactobacillus* species diversity from *Meekiri*: traditional fermented buffalo milk gels in Sri Lanka. **Heliyon**, v. 7, 2021.

BANGAR, S. P. *et al.* Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. **Food Bioscience**, v. 46, 2022.

EHSANI, A. *et al.* Probiotic white cheese production using coculture with *Lactobacillus* species isolated from traditional cheeses. **Vet World**, v. 11, n. 5, p. 726–730, 2018.

EL-BAKRY, M. Salt in Cheese: A Review. **Current Research in Dairy Sciences**, v. 4, 2012.

GUNKOVA, P. I. *et al.* Carbohydrate Fermentation Test of Lactic Acid Starter Cultures. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 852, 2021.

KAJIKAWA, A.; SUZUKI, S.; IGIMI, S. The impact of motility on the localization of *Lactobacillus agilis* in the murine gastrointestinal tract. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 58, 2018.

PROVIDA. Técnica de Gram. 2023. Disponível em:
<<http://www.provida.ind.br/site/index.php/bacterias/bacterias/122-tecnica-de-gram.html>>
Acesso em 19/09/2023.

SCHOUSTRA, S. *et al.* Microbiological safety of traditionally processed fermented foods based on raw milk, the case of Mabisi from Zambia. **LTW – Food Science and Technology**, v. 171, 2022.

SHIELDS, P.; CATHCART, L. Motility Test Medium Protocol. **American Society for Microbiology**, 2011.

XIII Seminário de Extensão e Inovação
XXVIII Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR

Ciência e Tecnologia na era da Inteligência Artificial: Desdobramentos no Ensino Pesquisa e Extensão
20 a 23 de novembro de 2023 - Campus Ponta Grossa, PR



SEI-SICITE
2023



WASSIE, M.; WASSIE, T. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, 2016.

YI, Y. *et al.* Current status and potentiality of class II bacteriocins from lactic acid bacteria: structure, mode of action and applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 387-401, 2022.