

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/53046

IB/ 81889

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

**“SELEÇÃO E UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS
PRODUTORAS DE DIACETIL EM LEITES FERMENTADOS”**

ELIANE MELO BROLAZO

Orientadora: Profa. Dra. **ALDA LUIZA SANTOS LERAYER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Eliane Melo Brolazo</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre
em Genética e Biologia Molecular – Área de
Concentração: Microbiologia.

Profa. Dra. Alda Luiza Santos Lerayer

**CAMPINAS
2003**

UNIDADE	05/84887
Nº CHAMADA	UNICAMP
	B287A
V	EX
TOMBO BC	53046
PROC.	16 124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	12.100
DATA	08/04/03
Nº CPD	

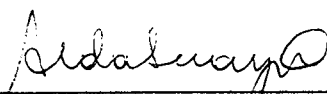
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B787s **Brolazo, Eliane Melo**
 Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados/ Eliane Melo Brolazo. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2002.

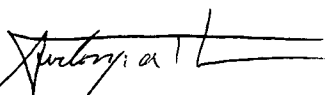
Orientadora: Alda Luiza Santos Lerayer
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

I. Bactéria. 2. Leite fermentado. I. Lerayer, Alda Luiza Santos.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título.

Formaram parte da Banca:



Prof. Dra. Alda Luiza Santos Lerayer
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL
Instituto de Biologia – UNICAMP
Orientadora



Prof. Dr. Airton Vialta
Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL
Membro

Prof. Dr. Domingos Silva Leite
Instituto de Biologia – UNICAMP
Membro



Prof. Dr. Tomomasa Yano
Instituto de Biologia – UNICAMP
Membro

Campinas, 15 de janeiro de 2003

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida;

À FAPESP, pelo financiamento concedido na forma de Projeto de Auxílio a Pesquisa;

À orientadora deste trabalho, Dra. Alda Luiza S. Lerayer, que com sua energia e disposição, não me deixou desanimar ou desistir, mesmo quando nada parecia dar certo;

Ao Dr. Airton Vialta, coordenador do TECNOLAT – ITAL, que sempre esteve pronto para resolver qualquer dificuldade no decorrer deste trabalho. Obrigada também pela paciência ao fazer a correção na banca prévia, sem deixar escapar aqueles pequenos detalhes;

À Dra. Elza Graef Marasca, pesquisadora do Tecnolab - ITAL, pelas correções nas inúmeras versões deste trabalho, desde o início do projeto até a transformação em uma Dissertação de Mestrado;

Às pesquisadoras Dra. Ariene Van Dender e Izildinha Moreno, responsáveis pelos laboratórios de físico-química e microbiologia respectivamente, do TECNOLAT, onde este trabalho foi desenvolvido, que sempre estiveram disponíveis para esclarecer minhas dúvidas, discutir os resultados e me ajudaram a tirar o melhor proveito deles;

Aos pesquisadores Gilson Manfio e Cleber R. Rabelo, pela importante colaboração nos experimentos de biologia molecular;

À pesquisadora Marisa Padula do CETEA – ITAL, pela imprescindível participação nas análises cromatográficas;

Aos amigos Giselle, Lígia, Rafael e Omar, pela amizade e grande ajuda em diferentes fases deste trabalho. Muito obrigada!

Ao pessoal do Laboratório de físico-química e da Planta Piloto do TECNOLAT, Adriana, Rose e José Rubens, pela amizade e auxílio durante os processamentos e análises físico-químicas do *buttermilk*.

Aos amigos do ITAL Bárbara, Cris Jaqueline, Dé, Fabiana, Fernanda, Giselle, Janaína, Juliana, Lu Omairi, Margareth, Michele, Omar, Thelma, Vanessa e Vânia, que de uma forma ou de outra, tornaram as horas de trabalho no laboratório divertidas. Valeu!

Aos profs. Domingos Silva Leite, Silvia Gatti e Tomomasa Yano do Depto de Microbiologia e Imunologia – IB - UNICAMP, que foram meus primeiros professores de microbiologia, pelo carinho, orientações e ensinamentos nas várias etapas da minha vida na UNICAMP.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Aspectos gerais da bebida láctica denominada <i>buttermilk</i>	4
3.2. Metabolismo das bactérias lácticas.....	7
3.3. Microrganismos produtores de diacetil.....	10
3.3.1. Lactococos.....	10
3.3.2. Melhoramento genético para produção de diacetil.....	13
3.3.3. Enterococos.....	20
4. METODOLOGIA.....	24
4.1. Seleção de microrganismos produtores de diacetil.....	24
4.2. Processamento da bebida láctica fermentada.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1. Seleção de linhagens produtoras de diacetil isoladas de queijo Minas Frescal artesanal e queijo Prato industrializado.....	47
5.2. Classificação taxonômica das linhagens produtoras de diacetil.....	54
5.2.1. Caracterização fenotípica.....	54
5.2.2. Caracterização bioquímica e enzimática por sistema miniaturizado.....	57
5.3. Caracterização molecular.....	60
5.4. Determinação do potencial de patogenicidade.....	63
5.5. Quantificação de diacetil produzido pelas linhagens isoladas de queijo Minas Frescal.....	67

5.6. Resultados da produção da bebida láctica fermentada.....	69
5.6.1. Processamento preliminar – Determinação do teor de gordura.....	69
5.6.1.1.Determinações microbiológicas.....	70
5.6.1.2. Determinações físicas e químicas.....	70
5.6.1.3. Análise sensorial.....	71
5.6.2. Processamento inicial.....	71
5.6.2.1.Determinações microbiológicas.....	72
5.6.2.2. Determinações físicas e químicas para caracterização da bebida.....	74
5.6.2.3. Análises sensoriais da bebida com açúcar.....	76
5.6.3. Processamento final.....	78
5.6.3.1.Determinações microbiológicas.....	78
5.6.3.2. Determinações físicas e químicas para caracterização das bebidas.....	81
5.6.3.3. Análises sensoriais das bebidas com açúcar.....	84
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8. ANEXOS.....	95

LISTA DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. Representação esquemática do metabolismo de lactose e glicose por bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas	9
FIGURA 2. Via metabólica de formação de diacetil por <i>Lc lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	12
FIGURA 3. Descrição esquemática dos passos utilizados para selecionar o mutante MC010	18
FIGURA 4. Fluxograma de produção de <i>buttermilk</i>	41
FIGURA 5. Fluxograma de identificação de bactérias lácticas produtoras de diacetil	48
FIGURA 6. Perfil de migração do DNA amplificado com <i>primer</i> REP	60
FIGURA 7. Perfil de migração do DNA amplificado com <i>primer</i> ERIC	61
FIGURA 8. Perfil de migração do DNA amplificado com <i>primer</i> BOX	62
FIGURA 9. Dendograma dos resultados obtidos com os <i>primers</i> REP, ERIC e BOX	63
FIGURA 10. Teste de hemólise em placa de ágar sangue	64
FIGURA 11. Teste de produção de gelatinase em ágar gelatina nutriente	65
FIGURA 12. Teste para presença de termonuclease	66

LISTA DE TABELAS

	página
TABELA 1. Microrganismos utilizados	24
TABELA 2. Características morfológicas, atividade de catalase e produção de acetoína/diacetil	50
TABELA 3. Caracterização bioquímica das linhagens selecionadas	53
TABELA 4. Caracterização fenotípica das linhagens selecionadas	56
TABELA 5. Classificação taxonômica obtida pelo sistema BBL <i>Crystal</i> , das linhagens produtoras de diacetil pelo teste de VP	58
TABELA 6. Quantidade de diacetil presente nas amostras de leite fermentado com as linhagens Q1 a Q9 e com o fermento comercial CH-N22, utilizado como controle positivo	67
TABELA 7. Resultados da análise microbiológica	70
TABELA 8. Resultados análises físicas e químicas	70
TABELA 9. Avaliação microbiológica da matéria prima e das bebidas fermentadas no processamento inicial	72
TABELA 10. Contagem diferencial	73
TABELA 11. Resultado das análises físicas e químicas do leite padronizado	74
TABELA 12. Resultados das análises físicas e químicas da bebida fermentada com açúcar	75
TABELA 13. Análises físicas e químicas do <i>buttermilk</i> sem açúcar	76
TABELA 14. Porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição da amostra de <i>buttermilk</i> para os atributos avaliados e valor médio atribuído a cada característica analisada (média)	77
TABELA 15. Avaliação microbiológica da matéria prima e dos dois tipos de <i>buttermilk</i> produzidos	79

TABELA 16. Contagem diferencial	80
TABELA 17. Resultados das análises físicas e químicas do leite padronizado	81
TABELA 18. Resultados das análises físicas e químicas das bebidas sem açúcar	82
TABELA 19. Resultados das análises físicas e químicas das bebidas com açúcar	82
TABELA 20. Quantidade de diacetil presente nas amostras de <i>buttermilk</i> Tradicional e Modificado no primeiro dia após o processamento e com 28 dias de estocagem	83
TABELA 21. Porcentagens de aceitação indiferença e rejeição das amostras de <i>buttermilk</i> avaliadas	84
TABELA 22. Gostos apresentados pelos consumidores em relação à amostra de <i>buttermilk</i>	84
TABELA 23. Desgostos apresentados pelos consumidores em relação à amostra de <i>buttermilk</i>	85

SELEÇÃO E UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRODUTORAS DE DIACETIL EM LEITES FERMENTADOS

Autora: Eliane Melo Brolazo
Orientadora: Alda Luiza Santos Lerayer

RESUMO

As linhagens de bactérias lácticas produtoras de diacetil são importantes na produção de queijos e leites fermentados, onde são responsáveis pela produção do diacetil um composto volátil aromático. A produção inadequada desse composto por linhagens lácticas é uma das principais causas de problemas de qualidade do *buttermilk*, uma bebida com baixo teor de gordura, muito consumida na Europa, mas ainda desconhecida no Brasil. Este trabalho visou selecionar linhagens da coleção de linhagens do ITAL quanto à capacidade de produzir diacetil. As linhagens selecionadas foram avaliadas por meio de técnicas bioquímicas e de biologia molecular para a confirmação da classificação taxonômica e para verificar a existência de homologia entre as mesmas.

Em uma segunda etapa, como as linhagens selecionadas não eram da biovariedade *diacetylactis*, como esperado inicialmente, foram realizados processamentos de *buttermilk* com dois fermentos lácticos comerciais, sendo um deles composto por um mutante *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, com produção de diacetil aumentada. O objetivo destes testes foi avaliar comparativamente a qualidade da bebida, caracterizá-la, como também desenvolver um novo tipo de produto para o mercado brasileiro.

SELECTION AND USE OF DIACETYL PRODUCING LACTIC BACTERIA IN FERMENTED MILKS.

Author: Eliane Melo Brolazo

Advisor: Alda Luiza Santos Lerayer

SUMMARY

The diacetyl producing lactic bacterial strains are important in cheese and fermented milk production, where they are responsible for the production of the volatile aromatic compound diacetyl. The inadequate production of this compound by lactic bacteria is one of the main causes of quality problems in buttermilk, a low fat beverage widely consumed in Europe, but as yet unknown in Brazil. This study aimed at selecting strains from the culture collection at ITAL according to their diacetyl producing capacity. The selected strains were evaluated by molecular biology and biochemical techniques to confirm their taxonomic classification and check for the existence of homology between them.

In a second stage, since the selected strains were not of the bio-variety *diacetylactis*, as originally expected, buttermilk was processed with two commercial lactic yeasts, one of which was the mutant *Lc. lactis* ssp.*lactis* biovar. *diacetylactis* with increased diacetyl production. The objective of these trials was to evaluate the quality of the beverage in a comparative way and characterize it, as well as developing a new type of product for the Brazilian market.

1. INTRODUÇÃO

A partir de julho de 1994 ocorreu um expressivo aumento do consumo de leite e derivados no Brasil, em particular dos mais nobres, como o leite longa vida (340%) e iogurte (162%), basicamente em decorrência da estabilidade econômica e da queda real dos preços. Apesar deste crescimento, o consumo de leite e/ou bebidas lácticas *per capita* em 1997 foi de 136 litros por habitante, 84 litros inferior ao recomendado pela FAO (Bortoleto, 1998). De acordo com dados do IBGE, o aumento do poder de consumo da população no período estimulou a venda de produtos que não são de primeira necessidade, como o iogurte, havendo um crescimento na sua produção de 113%, no período de 1994 a 2000. A partir de 1996 o Brasil passou a importar iogurte e outros produtos lácticos fermentados e, em 2000, o volume foi de 2 milhões de litros (Bortoleto, 1998).

Os produtos que possuem maior valor agregado têm apresentado maior crescimento. O consumidor tornou-se mais exigente, fazendo um balanço da relação custo/benefício de suas compras (Manzione, 1998). As razões para o baixo consumo de bebidas lácticas são em parte culturais, como a falta de hábito e imagem de que este tipo de produto seja supérfluo, além é claro do preço e poder de compra do consumidor (Ferreira, 1997).

A conquista de mercado deve ser feita através de produtos que chamem a atenção do consumidor para hábitos saudáveis ou que proporcionem benefícios à saúde. As bactérias lácticas possuem, reconhecidamente, diversas propriedades benéficas e terapêuticas, tornando necessário a pesquisa e desenvolvimento desses novos produtos lácticos.

A bebida fermentada tipo *Buttermilk*, ainda inexistente no país, é um importante candidato à conquista deste espaço, pois tem sabor refrescante, o que é desejado pelo consumidor brasileiro e adequado ao nosso clima. Por ser um produto fermentado, tem uma vida de prateleira maior, o que o torna mais prático e conveniente, além de já vir pronto para o consumo. Tem alto valor nutricional, pois é rico em proteínas, vitaminas e cálcio, cuja absorção é facilitada em produtos fermentados devido à formação do lactato de cálcio a partir do caseinato de cálcio e do ácido láctico, tornando-o útil na prevenção da osteoporose. Devido a seus baixos teores de lactose, que é consumida pelos microrganismos durante a fermentação, esta bebida torna-se também adequada a indivíduos que são intolerantes a ela. Possui baixo teor de gordura e alto teor protéico sendo, portanto, um alimento muito saudável. Ademais, agrega valor ao leite, pois pode ser produzido por pequenos e médios produtores, incrementando o desenvolvimento das economias regionais por meio da introdução de um novo produto no mercado brasileiro (Lerayer, 2001).

2. OBJETIVOS

- 1- Seleção e classificação taxonômica das linhagens produtoras de diacetil pertencentes à coleção de culturas do ITAL.
- 2- Desenvolvimento do produto *Buttermilk*, contendo microrganismos produtores de diacetil e sua aceitação de mercado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais da bebida láctica fermentada denominada *Buttermilk*.

A origem das bebidas obtidas a partir da fermentação do leite remonta à antiguidade. Registros históricos mostram que leites de búfala, ovelha, égua e cabra já eram utilizados para a produção de bebidas fermentadas, iogurtes e queijos por volta de 2.000 anos a.C., na Ásia e Europa Oriental (Marshall, 1993).

A fermentação, o método mais antigo conhecido para a preservação do leite, desenvolveu-se independentemente em várias partes do mundo, com utilização de diferentes espécies de microrganismos, o que proporcionou uma grande variedade de produtos. Atualmente, existem por volta de 400 nomes genéricos para leites fermentados, entre artesanais e industrializados, e muitos deles são denominações diferentes para o mesmo produto. De maneira geral, pode-se classificar os leites fermentados de acordo com o microrganismo que predomina na fermentação. Um destes tipos de bebida é produzido por leveduras, como o Kefir e o Koumiss, bastante consumidos na Europa Oriental e Rússia, em cuja fermentação são produzidos, além de ácido láctico, álcool e dióxido de carbono; outro tipo é fermentado por bactérias lácticas e um terceiro, por fungos que, também fazem fermentação láctica, cujo produto mais conhecido é o Villi, consumido principalmente na Finlândia (Tamime, 1999).

A maioria das bebidas lácticas fermentadas é produzida por bactérias lácticas, que são divididas em três grupos: mesófilas, que crescem melhor em temperaturas entre 21°C e 40°C, termófilas, que têm temperatura ótima de crescimento ao redor de 45°C e

terapêuticas, que trazem algum benefício extra à saúde do consumidor, podendo pertencer ao grupo das mesófilas ou termófilas (Tamime, 1999).

Um tipo específico de bebida láctica fermentada é o *buttermilk*, produzido tradicionalmente a partir do líquido que é separado do creme na fabricação da manteiga, que no Brasil é chamado de leiteiro. Há uma variedade de bebidas derivadas do *buttermilk* tradicional, com diferentes índices de gordura e sólidos totais, em consequência da variação na composição da cultura láctica. O subproduto da fabricação da manteiga pode ser acidificado artificialmente ou através de fermentação, quando é então conhecido como *buttermilk* natural ou verdadeiro, ou ainda *buttermilk* fermentado ou cultivado. Nos Estados Unidos o leiteiro não é utilizado para a fabricação desta bebida, mas como ingrediente na produção de queijos e sorvetes. Na região Norte da Europa, o *buttermilk* fermentado é uma bebida muito popular, substituindo com frequência o consumo de leite fresco. Também é consumido como uma bebida refrescante ou com cereais (Marshall, 1987).

Nos últimos anos, com o aumento da produção e melhoria dos sistemas de qualidade nas indústrias, problemas com o desenvolvimento do sabor e aroma relacionados aos altos níveis de Cu^{2+} e fosfolípidos no leiteiro, que dificultavam a padronização na fabricação do *buttermilk*, além da inconstante disponibilidade do leiteiro para a produção, levaram a mudanças nos procedimentos de fabricação.

Atualmente, grande parte do *buttermilk* comercializado é produzida a partir de leite com baixos teores de gordura. Para obtenção de um produto final com boa estabilidade, o controle do teor de gordura é importante e não pode ser inferior a 0,3%. Um teor de gordura de 1% eleva significativamente a estabilidade do produto. Outro fator relevante na

estabilidade é a temperatura do produto na estocagem, que não deve ser maior que 8°C (Nursten, 1997).

O *buttermilk* fermentado tem consistência cremosa e suave sabor ácido e um sabor e aroma agradáveis (Kurmann, 1984). Seu aroma característico é dado pelo diacetil, uma substância volátil particularmente importante neste tipo de bebida.

A reação predominante para a obtenção do *buttermilk* é a transformação da lactose em ácido láctico, o produto final do metabolismo homofermentativo de certas bactérias lácticas, e responsável pelo sabor refrescante da bebida. Componentes voláteis, produzidos enzimaticamente e presentes em menor concentração, determinam o sabor e aroma característicos do produto, enquanto a produção de proteínas ou polissacarídeos confere a consistência apropriada (Nursten, 1997).

Nos leites fermentados em geral, e no *buttermilk* em particular, a formação de diacetil e acetaldeído é importante. Um parâmetro de qualidade do *buttermilk* fermentado é dado pela concentração de diacetil. Os fermentos lácticos deste tipo de bebida são selecionados com base na capacidade de produção deste composto.

As culturas lácticas podem ser compostas de uma ou mais espécies de microrganismos que, além da via de fermentação da lactose, apresentam vias metabólicas secundárias por meio das quais produzem compostos responsáveis pelas características típicas de sabor e consistência das diferentes bebidas lácticas fermentadas (Nursten, 1997). A cultura láctica do *buttermilk* é composta por *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis*, por *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* e por *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (Kurmann *et al.*, 1992).

A produção de diacetil e de acetoína no processo de fermentação é influenciada por vários fatores, entre eles a temperatura, pH, concentração de citrato, presença de íons metálicos como o cobre (Cu^{2+}) e das condições de imobilização celular (Monnet *et al.*, 1994).

3.2. Metabolismo das bactérias lácticas

As bactérias lácticas são microrganismos Gram positivos e imóveis, que fermentam espontaneamente a lactose, produzindo ácido láctico e outros compostos orgânicos (Wood & Holzapfel, 1995). Bioquimicamente, a fermentação é um processo metabólico onde carboidratos são parcialmente oxidados para obtenção de energia na ausência de um aceptor externo final de elétrons, ou seja, na ausência de oxigênio. Como a oxidação é incompleta, pouca energia é produzida, comparativamente à respiração. Os produtos finais da fermentação podem ser compostos orgânicos diferentes, dependendo do microrganismo fermentador (Salmien & Von Wright, 1993).

A principal fonte de energia das bactérias lácticas é proveniente do metabolismo de carboidratos, sendo usada para manter o potencial energético da célula (Poolman, 1993; Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996) e aproximadamente 5% do açúcar fermentado é usado como fonte de substratos para reações de síntese (Novak *et al.*, 1998). O crescimento exponencial desta bactéria parece ser “programado” para acontecer somente em meios complexos, ricos em açúcar, como o leite.

O potencial genético de *Lactococcus lactis* para crescer em diferentes carboidratos pode ser estimado pela presença de genes biodegradadores e transportadores relevantes, determinados após o sequenciamento de seu genoma (Konings, 1999). Esta bactéria possui

genes que lhe permite crescer nos vinte compostos usados como única fonte de carbono: glicose, frutose, N-acetil glucosamina, xilose, ribose, manose, gluconato, maltose, lactose, galactose, manitol e diferentes β -glicosídeos (Bolotin *et al.*, 1999).

As bactérias lácticas dividem-se em homofermentativas, que produzem a partir de carboidratos fermentescíveis, prioritariamente (90-95%) ácido láctico como produto final (*Streptococcus mutans*, *Str. thermophilus*, enterococos, lactococos, pediococos, *Lactobacillus casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* e outras espécies de lactobacilos do grupos I) e em heterofermentativas (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. fermentarum* e outros lactobacilos do grupo III, segundo Gasson & de Vos, 1994) que, além deste metabólito produzem outros, principalmente CO₂ e etanol (Figura 1). As bactérias homofermentativas quebram a lactose em galactose e glicose, que através de vias metabólicas diferentes são transformadas em gliceraldeído 3P, a partir do qual se forma o fosfoenolpiruvato, depois transformado em piruvato, originando lactato ou ácido láctico. Neste processo, são gastos inicialmente 2 ATPs, são produzidos outros 4 ATPs e cada molécula de gliceraldeído, uma proveniente da galactose e outra da glicose, forma um piruvato, que produz duas moléculas de lactato. O saldo final é de 2 ATPs e 4 moléculas de ácido láctico, que é excretado para o meio (Desmazeaud & Roissart, 1994).

No metabolismo heterofermentativo, devido a diferentes sistemas enzimáticos, são formadas quantidades equimolares de ácido láctico, CO₂ e de etanol. Esta diferença de produtos finais proporciona características de sabor e aroma variados, dependendo da combinação de microrganismos utilizados na composição da cultura láctica.

O piruvato é importante porque reconstitui o NAD⁺ em NADH, funcionando como um aceptor de elétrons, oxidando a molécula no lugar do O₂ ausente. Além disso, o

piruvato pode ser metabolizado em diferentes vias enzimáticas, produzindo compostos importantes para as características finais do produto, tais como o diacetil por meio da enzima α -acetolactato sintetase (Desmazeaud & Roissart., 1994). O catabolismo do carbono pelos lactococos tem sido estudado em detalhes e submetido a várias estratégias de engenharia metabólica. Uma delas é o redirecionamento do fluxo do piruvato (de Vos, 1996).

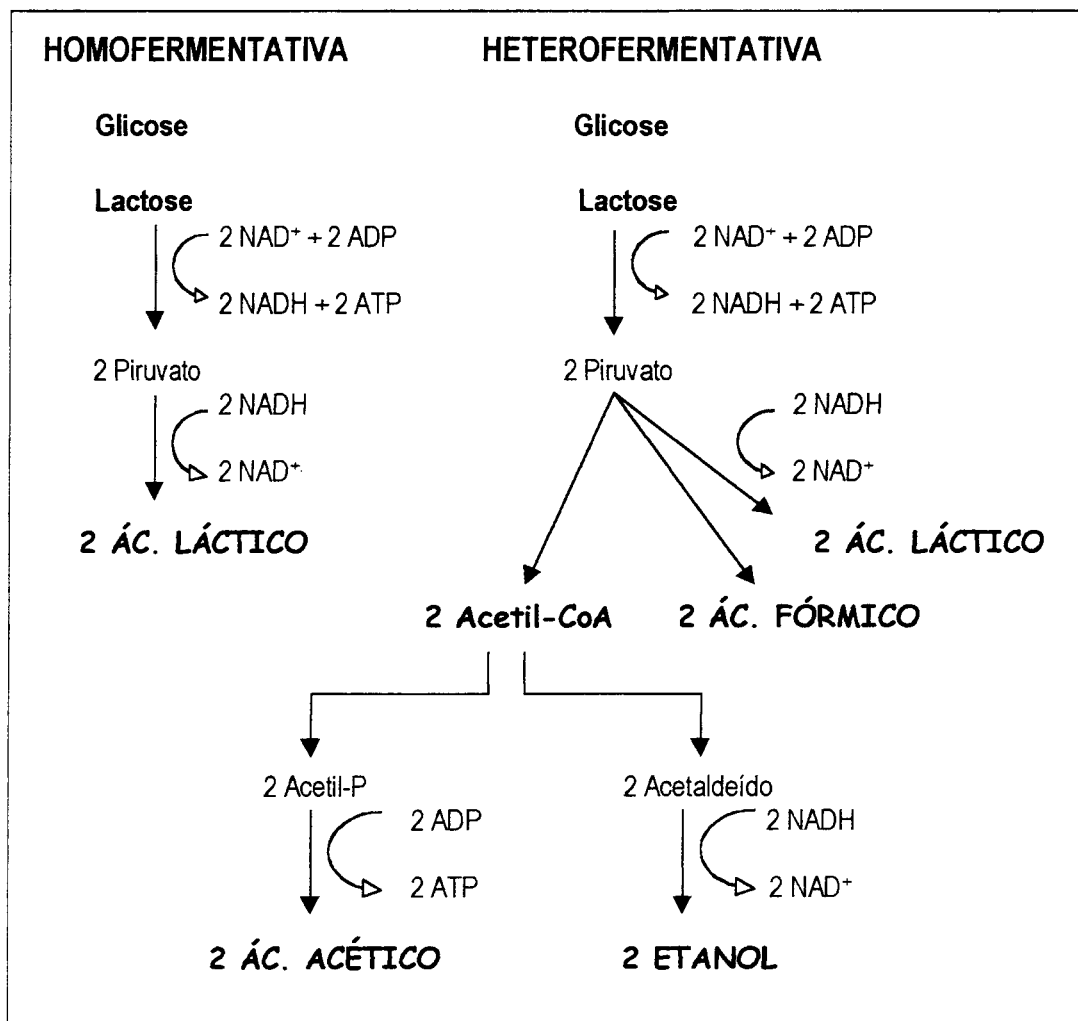


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da lactose e glicose por bactérias lácticas homofermentativas e heterofermentativas.

3.3. Microrganismos produtores de diacetil

3.3.1. Lactococos

O diacetil, um dos produtos que podem ser originados a partir do piruvato, é um componente aromático desejável em alimentos lácticos e outros. Ele confere sabor e aroma desejados e contribui para a sensação de frescor destes produtos. É particularmente produzido por linhagens de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc* sp., a partir do citrato, juntamente com a fermentação da lactose (Hugenholtz, 1993). Esta fermentação produz principalmente α -acetolactato (ALA) que pode ser convertido por descarboxilação oxidativa em diacetil (Figura 2).

Os lactococos produtores de diacetil apresentam um gene plasmidial que codifica a enzima citrato permease, que facilita a entrada do citrato na célula, gerando uma nova fonte de piruvato, da qual são produzidos compostos que compõem o aroma, sabor e a textura do produto fermentado (Wood, 1995).

Estudos realizados com espécies do gênero *Leuconostoc* demonstraram que o metabolismo da lactose é mais eficiente na presença de citrato, favorecendo e acelerando o crescimento destes microrganismos. O citrato serve como um aceptor de elétrons, substituindo o acetilfosfato, que pode ser transformado em acetato e produzir energia para formação de ATP. No caso dos lactococos, o crescimento das linhagens que possuem o gene da citrato permease também é favorecido, mas o mecanismo na homofermentação ainda não é conhecido (Hugenholtz *et al* 1993).

Após a entrada na célula, o citrato é convertido em oxaloacetato, e este em piruvato e CO₂. O dióxido de carbono participa da composição da textura do produto fermentado, enquanto que o piruvato pode seguir vários caminhos enzimáticos, dentre eles o que leva à

formação de diacetil. Os compostos mais importantes formados a partir do piruvato são o acetaldeído e o α -acetolactato (Desmazeaud *et al.*, 1994). Na maioria das culturas lácticas em que o citrato está presente, ele é completamente degradado (Kneifel, 1992). Em algumas culturas mistas observou-se que o consumo de citrato foi maior que 100%, sugerindo que uma parte do ALA (α - acetolactato) é resultante do piruvato proveniente da fermentação da lactose e não apenas do citrato presente no meio (Monnet, 1994).

A formulação de uma determinada cultura para produtos lácticos fermentados frescos ou para diferentes tipos de queijo é baseada nas suas características fisiológicas e tecnológicas. Nos leites fermentados tipo *buttermilk*, característico pelo sabor de manteiga, as culturas *Lac. lactis* subsp. *lactis* e sua biovar. *diacetylactis* produzem ácido láctico e diacetil, respectivamente, enquanto que *Leuconostoc* é adicionado, entre outros motivos, por produzir outros compostos aromáticos. A primeira função dos lactococos na produção do *buttermilk* é a fermentação da lactose para a produção do ácido láctico, através do metabolismo homofermentativo. No leite, os lactococos podem produzir 0,8% de L(+) lactato e o pH do meio pode chegar a 4,5 depois de um crescimento de 15h a 20h, à temperatura ambiente. A viabilidade das células bacterianas tende a cair rapidamente sob condição de baixo pH, o que limita a produção do ácido láctico neste ponto (Platteuw, 1995).

À medida que o pH decresce durante a fermentação, as bactérias crescem mais lentamente, a utilização de citrato aumenta e é produzido um acúmulo de piruvato, a partir do qual são formados compostos neutros. Para a célula, a produção de diacetil serviria como destoxificação do piruvato, que pode chegar a ser um inibidor do crescimento celular.

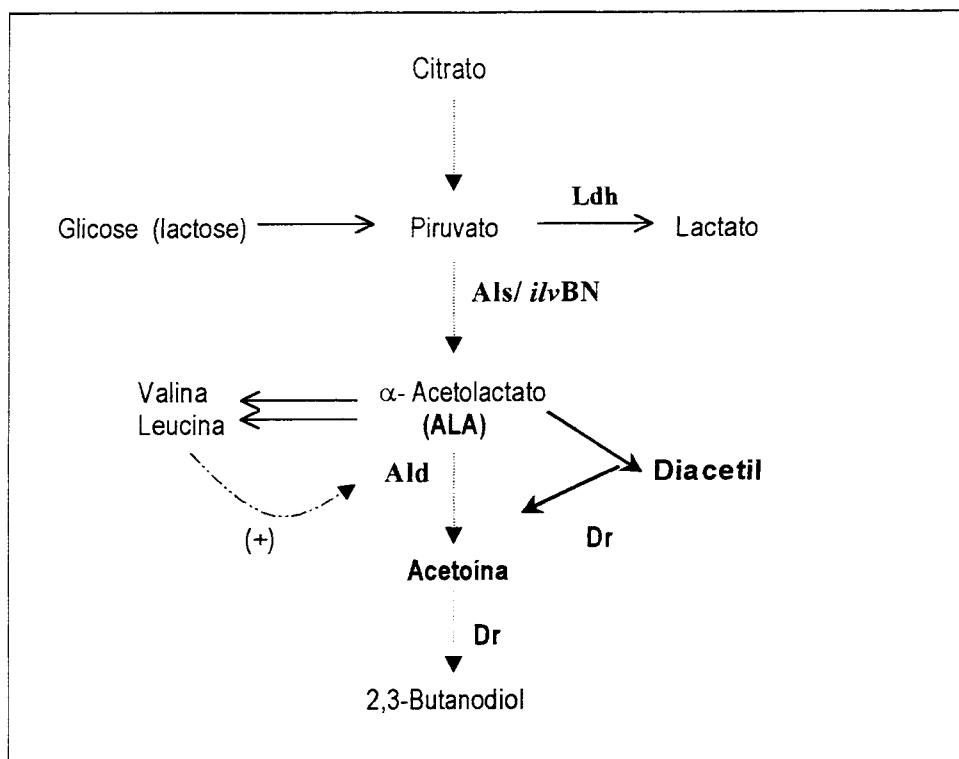


Figura 2. Via metabólica de formação de diacetil por *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis*. 1 Ldh= lactato desidrogenase; Als= acetolactato sintetase; Ald= acetolactato descarboxilase; Dr= diacetil redutase; linha contínua = reações de biossíntese; linha pontilhada = ativação alostérica (Curic, 1998).

A proteólise que ocorre durante a fermentação é um fator adicional que influencia as propriedades finais do *buttermilk*. Em geral, a atividade proteolítica das culturas mesófilas é comparável à das produtoras de iogurtes, entretanto a acidificação é menos pronunciada (Kneifel, 1992).

Em uma cultura láctica bem balanceada, as bactérias do gênero *Leuconostoc* são importantes para fornecer as características reológicas e sabor e aroma do produto fermentado. No caso do *buttermilk* o *Leuconostoc mesenteroides* subsp *cremoris* converte

o citrato em diacetil e acetoína através da enzima citrato liase, que é induzida por condições de baixo pH. Além da produção de compostos aromáticos, essa bactéria é adicionada ao produto por degradar o acetaldeído formado durante a fermentação com linhagens de *Lactococcus* que, contrariamente ao iogurte, é indesejável no *buttermilk* (Hugenholtz *et al.*, 1993; Henriksen *et al.*, 1999).

Os microrganismos normalmente não produzem diacetil em excesso e, quando são incubados durante muito tempo, esse composto tende a desaparecer (Parada, 1985). Assim, a concentração de diacetil nos produtos lácticos frescos diminui rapidamente durante a estocagem, sendo esta uma das principais causas da irregularidade da qualidade do produto e de sua curta vida de prateleira. Isto pode ser explicado pela presença de uma redutase, enzima que transforma irreversivelmente o diacetil em 2,3 butanodiol, produzida principalmente por *Leuconostoc*. Uma das estratégias usadas por algumas empresas com o objetivo de aumentar e estabilizar o sabor e aroma do *buttermilk* durante sua estocagem visou justamente o isolamento de linhagens de *Leuconostoc* com atividade de diacetil redutase fortemente atenuada, com o uso de técnicas de mutagênese clássica (Henriksen *et al.*, 1999).

3.3.2. Melhoramento genético para produção de diacetil

Visando o redirecionamento metabólico do carbono para obter maior produção de diacetil, foram utilizadas até o momento três conversões enzimáticas diferentes, conseguidas por meio de estratégias genéticas (de Vos, 1996). Na primeira delas, sugeriu-se que mais diacetil pode ser produzido pelo aumento da quantidade da enzima envolvida na transformação do piruvato a α -acetolactato (ALA). O principal passo para tal é a inativação

da enzima lactato desidrogenase (Ldh), codificada por genes cromossômicos. O isolamento de mutantes defectivos nesta enzima, capazes de acumular quantidades maiores de piruvato que, por sua vez, é transformado a ALA, leva à produção de quantidades maiores de diacetil independentemente da presença de citrato (Parada, 1985).

As linhagens Ldh^- , resultantes da completa inativação do gene *ldh*, são perfeitamente viáveis e mostram uma flexibilidade metabólica aumentada (Platteuw *et al.*, 1995). As enzimas que catalisam esta reação são a α -acetolactato sintetase (Als), codificada pelo gene *als*, com baixa afinidade pelo piruvato e amplamente distribuída entre as linhagens de *Lac. lactis* (Snoep *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1994) e uma ácido acetohidroxi sintetase (Ahs), codificada pelo gene *ilvBN*, que está envolvido na biossíntese de aminoácidos ramificados; ela possui afinidade moderada pelo piruvato e é inibida por controle em *feed back* pelos aminoácidos produzidos (Godon *et al.*, 1993; Benson *et al.*, 1996).

O fluxo de diacetil foi também modificado para aumentar a expressão de α -acetolactato sintetase (Als). Isto foi conseguido através da introdução deste gene em um plasmídio multicópia sob controle do promotor forte *lacA*. Quando introduzido em linhagens deficientes em Ldh, mais de 80% do piruvato foram convertidos em ALA, o precursor do composto aromático diacetil (Platteuw *et al.*, 1995; de Vos, 1997). No entanto, após super expressão dos genes *ilvN* e *als* em *Lac. lactis* MG1363, o diacetil não foi super produzido devido a presença de uma α -acetolactato decarboxilase (Ald) ativa, que degrada predominantemente o diacetil em acetoina (Figura 3).

Estudos mais aprofundados da síntese e do papel duplo da α -acetolactato desidrogenase (Ald) e aminoácidos nesta etapa e na formação de acetoina levaram a uma

técnica que seleciona novos mutantes defectivos em Ald, valiosos na produção de diacetil (Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997; de Vos *et al.*, 1998). Alguns mutantes naturais de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, deficientes na enzima Ald, foram aplicados com sucesso na indústria de laticínios durante alguns anos. Trata-se das linhagens D1, da coleção da Chr. Hansen, Dinamarca, e Ru-4, da coleção do NIZO, Holanda (Hugenholtz & Starrenburg, 1992). No entanto, especulou-se que ambos os mutantes defectivos Ald eram, de fato, a mesma linhagem (Monnet *et al.*, 1994). Pelo fato dessas linhagens também serem sensíveis a bacteriófagos, não existindo substitutos adequados no caso de uma infecção, houve necessidade de construir linhagens alternativas defectivas.

Assim, a nova estratégia objetivou obter linhagens de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* que fossem defectivas nesta enzima codificada pelo gene *aldB*, com conseqüente aumento da produção de diacetil, tendo sido o método de seleção fortemente facilitado pelo uso de ferramentas da engenharia genética (Henriksen *et al.*, 1999).

Apesar da bactéria *Lac. lactis* ter potencial para sintetizar 20 aminoácidos, nucleotídeos purínicos e pirimidínicos e pelo menos quatro cofatores (ácido fólico, menaquinona, riboflavina e tiorredoxina) (Bolotin *et al.*, 1999), ela é nutricionalmente exigente e a presença de um gene para a síntese de um determinado metabólito não significa que uma linhagem onde o gene foi encontrado não necessitará deste metabólito no meio de crescimento. O meio sintético para *Lac. lactis* deveria conter pelo menos seis aminoácidos (isoleucina, valina, leucina, histidina, metionina e ácido glutâmico) e sete vitaminas (biotina, piridoxina, ácido fólico, riboflavina, niacinamida, tiamina e ácido pantotênico) (Anderson & Elliker, 1953; Jensen & Hammer, 1993; Coccagn – Bousquet *et al.*, 1995). O leite não contém compostos pirimidínicos suficientes para permitir o crescimento de *Lac. lactis*, sendo necessária a biossíntese *de novo* (Dickely *et al.*, 1995).

Por outro lado, os genes cromossômicos que codificam a biossíntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina são encontrados em linhagens de *Lac. lactis* de origem vegetal (Godon *et al.*, 1992). Portanto, a auxotrofia para histidina e aminoácidos de cadeia ramificada, apresentada por algumas culturas de origem láctica, como a linhagem de *Lac. lactis* IL1403, é devida a mutações adquiridas no processo evolutivo (Delorme *et al.*, 1992; Godon *et al.*, 1993).

A estratégia para obtenção de um mutante *aldB* foi, portanto, baseada na dupla função da enzima Ald, na biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada e no catabolismo do piruvato, assim como no papel da leucina na regulação do operon *leu-ilv-aldB*. Na presença apenas de leucina, sem isoleucina ou valina, a enzima Ald é ativada e degrada o ALA disponível, preferencialmente a acetoina do que a valina, causando, desta forma, uma inanição ou falta de valina. Assim, somente as células que possuem uma mutação no gene *aldB* farão a conversão de ALA para valina. Estas células terão um fenótipo de resistência à leucina (Leu^R) (Goupil *et al.*, 1996).

No entanto, o mecanismo regulatório para leucina ocorre somente se o operon *leu-ilv* for funcionalmente ativo, isto é, nas linhagens prototróficas para isoleucina, valina (IV) ou isoleucina, leucina, valina (ILV); assim, o método descrito para seleção de um mutante Ald pode ser aplicado após a introdução de genes que codifiquem a biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (ou seja, contendo os fragmentos *leu-ilv* ou somente *ilv*) e a seleção do fenótipo ILV ou IV. O protocolo se baseia, portanto, na capacidade da linhagem parental em sintetizar valina, perdida pela maioria dos lactococos (Henriksen *et al.*, 1999).

Dessa forma, a estratégia utilizada por Curic (1998) foi a introdução do plasmídeo pMC004, contendo os genes que codificam a biossíntese da valina, ou seja, o fragmento do

operon *leu-ilv* originado da linhagem prototrófica *Lac. lactis* NCDO2118, em linhagens auxotróficas industriais IVL, que resulta num fenótipo prototrófico para isoleucina. Plaqueando-se as linhagens num meio quimicamente definido suplementado com leucina mas não com valina ou isoleucina, mutantes espontâneos resistentes à leucina foram obtidos e selecionados para a ausência da enzima Ald (Curic *et al.*, 1999).

Os mutantes deficientes sofreram posteriormente cura do plasmídio introduzido (Figura 3), que foi confirmada por hibridização *Southern* e *Western blot*, sendo também comprovado que o mutante denominado MC010 não mais expressava a enzima. Desta forma, exceto pela diminuição da enzima Ald, a linhagem de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MC1010 obtida era geneticamente idêntica ao seu tipo selvagem parental. A disponibilidade do plasmídio contendo genes que codificam a biossíntese da isoleucina e da valina generaliza a estratégia e seleção de mutantes espontâneos deficientes na enzima Ald para qualquer linhagem de *Lac. lactis* passível de transformação.

De acordo com de Vos (1999), os resultados obtidos por estas estratégias indicam que mudanças significativas nos produtos metabólicos finais podem ser obtidas mas nenhuma linhagem combinou as três alternativas genéticas conjuntamente, ou seja, a inativação da lactato desidrogenase, a super produção de α -acetolactato sintetase e a inativação da α -acetolactato descarboxilase. Salienta que quando estas linhagens foram construídas, observou-se um gargalo tecnológico em relação à estabilidade do diacetil, que pode ser degradado pela enzima diacetil redutase. Por outro lado, testes tecnológicos efetuados com o mutante super produtor de diacetil MC010, em *buttermilk* e queijo *Cheddar* evidenciaram maior produção e estabilidade do diacetil, tanto em relação às

linhagens parentais testadas como aos mutantes obtidos por outros grupos de pesquisa (Henriksen *et al.*, 1999).

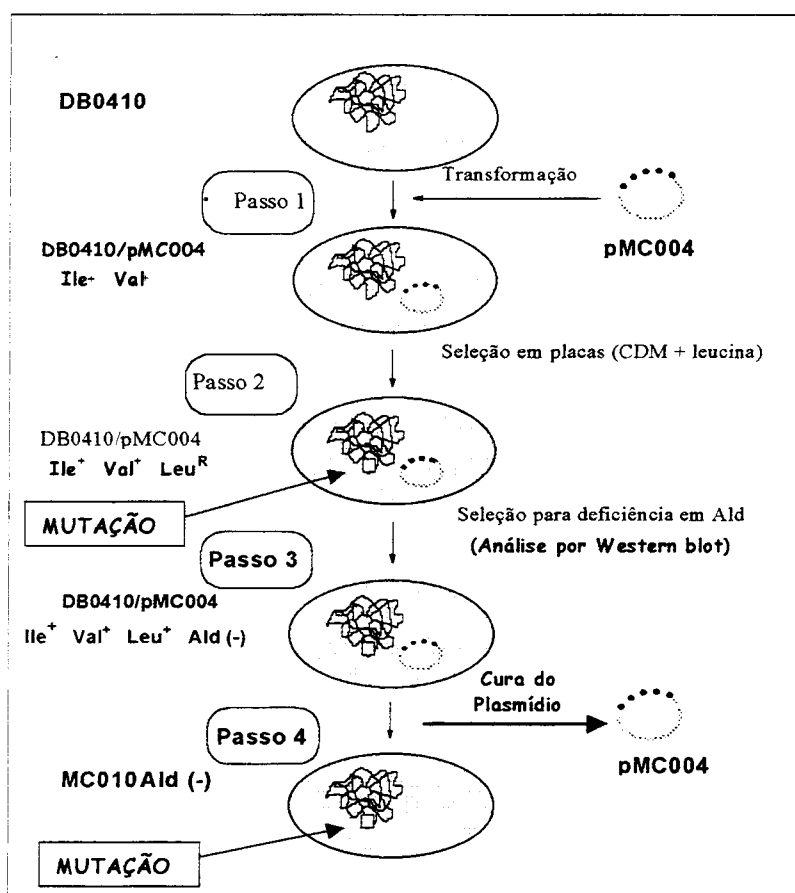


Figura 3. Descrição esquemática dos passos utilizados para selecionar o mutante MC010, deficiente na enzima α -acetolactato descarboxilase (Ald). DB0410: linhagem selvagem de *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis*; pMC004: plasmídeo contendo os genes que codificam a biossíntese de isoleucina e valina; Ile⁺ Val⁺: linhagem prototrófica para isoleucina e valina; CDM: meio de cultivo quimicamente definido; Leu^R: fenótipo resistente à leucina (Curic, 1999).

A mutação que originou a deficiência da enzima Ald ocorreu espontaneamente e a linhagem curada do plasmídeo não contém DNA estranho, segundo análise do genoma da linhagem mutada, realizada por Curic (1999) podendo, portanto, ser considerada como de grau alimentar (*food – grade*).

Entretanto, por ter sido usada uma técnica de genética molecular, sua aplicação dependerá das regulamentações a que são submetidos os organismos geneticamente modificados no Brasil (Lei 8.974/95) e da análise de diversos órgãos governamentais com Ministério da Saúde, ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) e CTNBio (Conselho Nacional de Biossegurança). Nos EUA esta linhagem não é considerada como sendo geneticamente modificada, havendo vários produtos que a utilizam sendo comercializados neste país.

Este mutante espontâneo é, portanto, a primeira bactéria láctica modificada geneticamente colocada efetivamente no mercado. Está sendo comercializado também em outros países incluindo Chile, Peru, Bolívia e Venezuela, onde também se reconhece que seu genoma é idêntico ao já existente na linhagem parental. O benefício para o consumidor, da existência de altos níveis de diacetil nos queijos e alguns leites fermentados, reflete no aumento e maior duração do sabor e aroma (*flavour*), assim como o aumento da vida de prateleira dos produtos.

Existem diversas possibilidades de utilização das bactérias produtoras de diacetil em produtos lácticos fermentados no Brasil, desde a intensificação de sabor de queijos como Minas frescal e Prato, até o desenvolvimento de novos tipos de leites fermentados, tais como o *buttermilk*, ainda inexistentes no país.

3.3.3. Enterococos

Dentre as possíveis utilizações de linhagens produtoras de diacetil, está a fabricação de leites fermentados tipo *buttermilk*, um produto ainda não disponível no Brasil. O desenvolvimento da bebida láctica fermentada tipo *buttermilk* e sua aceitação no mercado consumidor também fazem parte dos objetivos deste trabalho e serão discutidos mais a frente.

O diacetil é um composto que confere aroma e sabor característicos a diversos produtos lácticos; por isso, a seleção de bactérias lácticas produtoras de diacetil possibilita a disponibilização de novas linhagens para uso na indústria de laticínios, com maior variabilidade genética e possivelmente com sistemas naturais de resistência a bacteriófagos.

Os produtos lácticos industrializados no Brasil são produzidos a partir de leite pasteurizado, com severa diminuição da microbiota natural, e a fermentação é realizada por microrganismos que compõem os fermentos comerciais, o que garante a qualidade sanitária e as características típicas de aroma e sabor. À medida que os fermentos comerciais são mais difundidos entre os produtores, devido à eficiência e superioridade das linhagens que os compõem, diminuem, por outro lado, a diversidade bacteriana, e dificultam o isolamento de linhagens típicas brasileiras, uma vez que a maior parte dos fermentos são desenvolvidos por empresas multinacionais.

O grupo das bactérias lácticas, foi descrito em 1919, por Orla Jensen (Priest, 1993) como um agrupamento dos gêneros (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*). São bactérias Gram positivas, não esporuladas, catalase-negativas e estritamente fermentativas. Esta classificação é válida até hoje, mas com o advento de novas técnicas que auxiliam a classificação taxonômica, anteriormente baseada no estudo

da morfologia, fisiologia e do metabolismo bacteriano, novos gêneros foram incluídos neste grupo, formado atualmente por doze gêneros bacterianos. Os *Streptococcus* foram subdivididos em três novos gêneros: *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Esta subdivisão foi baseada em características fenotípicas (capacidade de crescimento em determinadas condições), bioquímicas e moleculares (Salmien & Von Wright, 1993; Jay, 2000).

Historicamente, as linhagens do gênero *Streptococcus* eram identificadas sorologicamente de acordo com a classificação de Lancefield (Priest, 1993), o que facilitava a identificação dos microrganismos patogênicos. Hoje em dia esta classificação tem menor importância, mas as bactérias anteriormente denominadas *Streptococcus*, que possuem o antígeno D, também denominados estreptococos fecais, são os atuais *Enterococcus*. Os estreptococos lácticos do grupo N pertencem ao novo gênero dos *Lactococcus*, com espécies bastante utilizadas na indústria de laticínios (Salmien & Von Wright, 1993). Dos estreptococos propriamente ditos, apenas o *St. thermophilus* é utilizado na fermentação do leite e forma com *Lactobacillus acidophilus* e *Lb. bulgaricus*, as culturas mistas utilizadas na produção de iogurtes (Tamime, 1999).

As vias metabólicas para a produção de diacetil e acetoína (descritas anteriormente) são comuns a todo o grupo das bactérias lácticas, capazes de produzir estes compostos a partir do citrato e que, de maneira geral, estão associadas aos habitats ricos em nutrientes, como leites, carnes e vegetais, mas também são membros da microbiota intestinal e vaginal normal dos mamíferos (Salmien & Von Wright, 1993).

Os produtos lácticos industrializados no Brasil são produzidos com leite pasteurizado, ou seja, com severa diminuição da microbiota natural, e a fermentação é

realizada por microrganismos selecionados que compõem os fermentos comerciais, o que garante a qualidade sanitária e as características típicas de aroma e sabor mas provoca a diminuição da diversidade bacteriana. Este tipo de fermento selecionado também é mais susceptível aos fagos, pois geralmente é composto por linhagens definidas. O isolamento e seleção de bactérias lácticas a partir de queijos artesanais possibilitam a disponibilização de novas linhagens para uso na indústria de laticínios, com maior variabilidade genética e possivelmente com sistemas naturais de resistência a bacteriófagos.

A principal fonte de novas linhagens fermentadoras é o próprio leite cru ou os queijos produzidos de maneira artesanal a partir deste tipo de leite, em regiões onde os animais leiteiros não tenham contato com fermentos comerciais.. Devido à importância da microbiota do leite na produção de determinadas características, alguns queijos artesanais europeus são produzidos a partir de leite cru e recebem um registro de certificação de origem (RDO – Registered Designation of Origin) (Gomez *et al.*, 1999).

A seleção de microrganismos que compõem os fermentos lácticos comerciais é sempre feita visando a obtenção de linhagens que apresentem boas características tecnológicas, como velocidade de acidificação, compatibilidade com as outras espécies que compõem o mesmo fermento e boa capacidade de produção de diacetil, o composto volátil responsável pelo aroma típico da manteiga, do *buttermilk* e de alguns tipos de queijos (Kurmann *et al.*, 1992).

Os lactococos são considerados integrantes da microbiota natural do leite, podendo ser isolados também de material vegetal. Apenas a biovariedade *diacetylactis* é capaz de produzir CO₂ e diacetil a partir do citrato, enquanto que os enterococos são considerados indicadores de contaminação fecal nos alimentos e na água, pois a principal fonte deste

gênero de microrganismos é o trato gastrointestinal de animais e humanos (Robinson, 1990; Jay, 2000).

Além de fornecerem os compostos voláteis que participam da composição do aroma e sabor dos produtos fermentados, alguns microrganismos que compõem a microbiota do leite também apresentam características que os tornam interessantes como probióticos, ou seja, culturas vivas que trazem efeitos benéficos quando ingeridas por animais e humanos. Os microrganismos considerados probióticos são capazes de colonizar o trato digestivo do hospedeiro, melhorando o balanço entre as espécies que vivem neste ambiente, prevenindo infecções por microrganismos patogênicos.

Já existem disponíveis no mercado preparações de diversas espécies de bactérias lácticas consideradas probióticas, vendidas com suplemento alimentar, entre elas, linhagens selecionadas de *Enterococcus faecium*, como a SF68, cujo uso tem sido estudado no tratamento de desordens intestinais, já que apresenta efeito inibitório do crescimento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Enterobacter* sp, sendo uma alternativa ao uso de antibióticos no tratamento da diarreia. Outro estudo demonstrou o efeito preventivo de diarreias e mucosites desta mesma linhagem em pacientes tuberculosos, que necessitam de longos tratamentos com antibióticos que provocam o desequilíbrio da microbiota intestinal (Franz *et al*, 1999).

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção de Microrganismos Produtores de Diacetil

1- Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados, pertencentes à coleção de culturas do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios – TECNOLAT, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL (Campinas, SP), incluíam 54 linhagens isoladas de queijo Prato industrializado e nove linhagens isoladas de queijo tipo Minas Frescal provenientes da região de Itajubá, MG, produzidos de modo artesanal (Tabela 1).

Tabela 1. Microrganismos utilizados

NOME/Nº LINHAGENS	ESPÉCIE	ORIGEM	UTILIZAÇÃO
A	<i>Enterococcus</i> sp	Queijo Prato da marca A	Teste de produção de diacetil
B	<i>Enterococcus</i> sp	Queijo Prato da marca B	Teste de produção de diacetil
C	<i>Enterococcus</i> sp	Queijo Prato da marca C	Teste de produção de diacetil
D	<i>Enterococcus</i> sp	Queijo Prato da marca D	Teste de produção de diacetil
Q (1 a 9)	<i>E. faecium</i> (identificadas neste trabalho)	Queijo tipo Minas Frescal artesanal	Teste de produção de diacetil
<i>Lac. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> A	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Wiesby, Alemanha	Controle positivo Teste diacetil
<i>Lac. lactis</i> subsp <i>lactis</i> 81	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 81	Wiesby, Alemanha	Controle negativo teste diacetil
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratório de Microbiologia - ITAL	Controle positivo teste de hemólise e DNase
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Laboratório de Microbiologia - ITAL	Controle positivo teste da gelatinase

2- Manutenção e conservação dos microrganismos

Os microrganismos da coleção de culturas do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios foram criopreservados a - 70 °C e - 20°C em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, Merck - Alemanha) adicionado de 20% de glicerol. Foram congeladas várias cópias de cada microrganismo isolado e a cada experimento uma delas era descongelada, para garantir que sempre se tratava da mesma cultura, evitando-se repiques consecutivos e possíveis contaminações ou perdas das culturas iniciais.

3- Isolamento das linhagens

Antes de cada experimento, as culturas eram ativadas em caldo BHI e reisoladas em meio sólido (Ágar BHI, Merck - Alemanha) sendo incubadas a 30° C por 48 horas. Após o crescimento, colônias isoladas foram analisadas quanto à morfologia por microscopia, para verificação da pureza. O mesmo procedimento foi realizado antes do congelamento das culturas.

4- Classificação taxonômica das bactérias

4.1. Características morfológicas

A morfologia celular e a reação das linhagens à coloração de Gram foram observadas em Microscópio Zeiss (1.000 X), após a coloração de esfregaços dos cultivos ativados em caldo BHI.

4.2. Atividade da catalase (Harrigan & MacCance, 1976)

As linhagens foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 21°C por 24 horas. Após incubação, 1,0 mL da cultura teste foi transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado 1,0mL de peróxido de hidrogênio 3,0%, preparado no momento do teste. A formação de efervescência, provocada pela liberação de oxigênio livre, foi indicativa da atividade de catalase.

4.3. Produção de acetoína e/ou diacetil por teste de Voges-Proskauer (VP)

Método modificado por Barritt em 1936 (Harrigan & MacCance, 1976).

As culturas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 21°C por 24 a 48 horas. Após incubação, 1,0mL da cultura teste foi transferido para outro tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 0,5mL de α -naftol a 6,0% e 0,5mL de hidróxido de potássio 16%. Após agitação, o desenvolvimento de um anel de coloração vermelha foi indicativo de reação positiva, ou seja, produção de acetoína ou de algum outro composto do grupo acetilmetilcarbinol.

4.4. Hidrólise de arginina (Harrigan & MacCance, 1976).

As culturas foram inoculadas em caldo arginina e incubadas a 21°C por 24 a 48 horas. Após incubação, 1,0mL da cultura teste foi transferido para outro tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1,0mL de reagente de Nessler. Após agitação do tubo, o desenvolvimento de coloração laranja foi indicativa da presença de amônia formada a partir da hidrólise da arginina

4.5. Determinação da fermentação de citrato

Visando confirmar a utilização de citrato para a produção de diacetil, foi utilizado o método químico qualitativo desenvolvido pelo Centro Tecnológico de Valdivia, Chile. As linhagens foram inoculadas em leite desnatado 10% e incubadas por 72 horas. Após a incubação, 0,25 mL da cultura foi transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 1,25 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina. Após agitação, o desenvolvimento de coloração branca foi indicativo da utilização de citrato, enquanto a coloração amarela a marrom indicou reação negativa.

O período de incubação de 72 horas a 21°C foi padronizado para este teste, pois foi observado que os resultados intermediários se definiam e, a partir dele, não se observavam outras alterações. Com períodos de incubação menores, várias culturas, inclusive o controle positivo, apresentavam resultados intermediários (coloração amarelada no tubo após reação). Após este período foi observado que a coloração adquirida com a adição dos reagentes permanecia estável, sem alteração, sendo possível avaliar com segurança os resultados positivos e negativos.

4.6. Características fisiológicas e bioquímicas (Harrigan & MacCance, 1976).

4.6.1. Capacidade de crescimento em diferentes temperaturas

As culturas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 10°C, 40°C e 45°C por 24 a 48 horas. Após incubação, foram observadas as características de crescimento das linhagens quanto à presença ou não de turvação, tipo de sedimento formado e desenvolvimento ou não de película superficial.

4.6.2. Tolerância ao cloreto de sódio

As culturas foram inoculadas em caldo BHI acrescido de 4% ou 6,5% de NaCl e incubadas a 21°C por 24 a 48 horas. As características de crescimento foram observadas após incubação.

4.6.3. Tolerância ao pH alcalino

As culturas foram inoculadas em caldo BHI com pH ajustado para 9,2 e 9,6 e incubadas a 21°C por 24 a 48 horas. As características de crescimento foram observadas após incubação.

4.7. Crescimento em meio KF (Difco, EUA)

As linhagens foram plaqueadas na superfície de meio KF (meio seletivo para enterococos) e incubadas a 30°C, por 24 a 48 horas. Após incubação, a presença de colônias vermelhas foi indicativa de enterococos.

4.8. Caracterização bioquímica e enzimática por sistema miniaturizado

4.8.1. Sistema de Galerias API (bioMérieux, França)

As linhagens foram semeadas por esgotamento em ágar BHI e incubadas a 30°C por 24 horas. A partir das colônias obtidas, fez-se uma suspensão concentrada das células em tubos com 1 mL de solução fisiológica. A concentração de células foi ajustada de acordo com a escala de McFaland número 5. Esta suspensão foi transferida para o tubo de meio para fermentação, o API 50 CHL. Este meio foi então inoculado no sistema de galerias API, e incubado em sistema da câmara úmida, a 30°C por 24 horas. Os resultados obtidos

foram submetidos a um programa de identificação, fornecido pelo fabricante, para a identificação dos microrganismos testados.

4.8.2. Sistema “BBL Crystal Gram Positive” (Becton Dickinson, França)

As linhagens foram semeadas por esgotamento em ágar BHI e incubadas por 24 horas a 30°C. As colônias obtidas foram transferidas para o tubo com fluido de inóculo até a concentração atingir a escala de McFaland número 5. Esta suspensão foi então vertida na base preta do sistema, que foi fechada com a tampa que contém os substratos. Os painéis foram incubados por 24 horas a 30°C, em sistema da câmara úmida. Para a identificação das espécies, os resultados foram analisados no software *Crystal Eletronic Codebook* que compõe o sistema.

5- Homologia entre as linhagens selecionadas

A obtenção do DNA genômico foi feita de acordo com o método de extração em pequena escala (Pitcher *et al.* , 1989), com algumas adaptações, como a fricção do sedimento celular com igual volume de pérolas de vidro e incubação com 2,0mg mL⁻¹ de lisozima. a 37 °C por 45 minutos, para facilitar a lise celular. O DNA genômico foi quantificado por eletroforese em gel de agarose e submetido à amplificação (PCR) com *primers* de sequência conhecida (REP, ERIC, BOX, Pharmacia, Inglaterra). Após a amplificação, este material foi submetido à eletroforese em gel de agarose, para a visualização das sequências amplificadas (bandas de DNA). A comparação foi feita através do sistema Gene Compare (Applied, Bélgica) que permite a criação de dendogramas que mostram o grau de similaridade entre as linhagens testadas.

5.1. Extração do DNA genômico

As linhagens foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 30°C por 24 horas. Aliquotas de 1,5mL de cultura foram centrifugadas duas vezes consecutivas (13.000 rpm por 3 minutos) em solução tampão Tris/EDTA pH 8 (TE pH 8). Os sedimentos foram homogeneizados com igual volume de pérolas de vidro para facilitar a lise de células.

Os sedimentos de células foram recolocados em suspensão em tubos contendo 100µL de solução TE pH 8,0, suplementado com 2,0 mg por mL⁻¹ de lisozima e incubados a 37°C por 45 minutos. A cada 15 minutos, os tubos eram agitados para homogeneizar as suspensões. Quando estas ficaram completamente límpidas, foram adicionados 500 µL de solução de guanidina tiosianato 5M. As suspensões contendo o material intracelular permaneceram à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Após este período, foram resfriadas em banho de água a 4°C. Em seguida, foram adicionados 250µL de acetato de amônio 7,5 M e elas foram mantidas a 4°C por mais 10 minutos, após os quais foram adicionados 500µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), seguido de agitação manual e centrifugação (13.000 rpm por 10 minutos) para a precipitação seletiva do material celular.

Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga, ao qual foi adicionado 0,54 vol. (~430 µL) de isopropanol gelado para precipitar o DNA. Os tubos foram invertidos várias vezes para misturar as soluções e novamente centrifugados a 6.500 rpm por 2 minutos. Os precipitados de DNA obtidos foram centrifugados por 3 vezes consecutivas com etanol 70% (v/v) para retirada dos resíduos e secos em estufa à 37°C.

Quando os tubos ficaram completamente secos, adicionaram-se 200µL de TE pH 8,0 e 2µL de RNase A e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após a adição de 40 µL de cloreto de lítio 4M (ou 20µL 8M) para remover as proteínas, acrescentou-se 1 vol (240 µL) de clorofórmio-álcool isoamílico. As fases foram misturadas manualmente até a emulsificação e, então, centrifugadas (6.500 rpm/6min).

Os sobrenadantes foram coletados e os DNAs precipitados com 2 volumes de etanol gelado e novamente centrifugados (13.000 rpm/2min). Os precipitados foram centrifugados por 2 vezes consecutivas com 500 µL de etanol 70% e secos em estufa 37°C. O DNA obtido foi recolocado em suspensão em 20 a 50 µL (dependendo da concentração estimada do DNA) de água Milli-Q e estocado a 4°C.

5.2. Quantificação do material extraído

Para avaliar a pureza e quantificar o DNA, foi realizada a medida da absorbância a 260nm (*GeneQuant*, *Pharmacia Biotec*, Inglaterra) da solução de DNA diluída na proporção de 1:100, em um volume total de 100µL. Devido à imprecisão deste método, a quantificação do DNA também foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% preparado em TEB 1X (Tris, EDTA e Borato). Aliquotas de 2,0µL de corante foram misturadas com 1,0µL das amostras e aplicadas nos géis. A corrida eletroforética foi de 100 Volts, durante 1 hora. Como padrão foram aplicados volumes de 1 µL, 2 µL, 4µL, 8 µL e 16 µL de DNA do fago λ, diluído 1: 20, equivalentes a 25ng, 50ng, 100ng, 200ng e 400ng, respectivamente.

5.3. Ampliação do DNA com *primers* (Pharmacia Biotec, Inglaterra) de seqüências conhecidas

A ampliação do DNA extraído das 9 linhagens de *Enterococcus faecium* e da linhagem comercial de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* foi feita com descrito a seguir.

5.3.1. REP-PCR

As amostras de DNA foram preparadas em concentração de 100ng e volume final de 5µL. O programa de amplificação foi:

6 min. a 95°C

1 min a 94°C

1 min a 40°C

8 min a 65°C

Repetiram-se 30 ciclos de 2 a 4

16 min a 65°C

manutenção a 4°C até os tubos serem retirados do aparelho.

As seqüências dos *primers* utilizados para o REP-PCR foram as seguintes:

REP 2-I cód. 2943 (da extremidade 5' para a 3' - 18 nucleotídeos)

ACG ACT TAT CAG GCC TAC

• REP cód. 2942 (da extremidade 5' para a 3' - 18 nucleotídeos)

AAA ACG ACG ACA TCA GGC

5.3.2. *ERI-PCR*:

As amostras de DNA foram preparadas na concentração de 100ng e volume final de 5µL. O programa de amplificação foi:

7 min. a 95°C,

1 min a 94°C,

1 min a 52°C,

8 min a 65°C

Repetiram-se 30 ciclos de 2 a 4

16 min a 65°C

manutenção a 4°C até os tubos serem retirados do aparelho

Para o ERIC-PCR as seqüências dos *primers* utilizados foram as seguintes:

- ERIC 2 cód 2945 (da extremidade 5' para a 3' - 22 nucleotídeos)

AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G

- ERIC IR cód 2944 (da extremidade 5' para a 3' – 22 nucleotídeos)

ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C

5.3.3. *BOX-PCR*

As amostras de DNA foram preparadas na concentração de 100ng e volume final de 5µL. O programa de amplificação foi:

7 min. a 95°C;

1 min a 94°C,

1 min a 53°C,

8 min a 56°C

Repetiram-se 30 ciclos de 2 a 4

um ciclo final de extensão a 65°C por 16 min

manutenção a 4°C.

Para BOX-PCR o *primer* utilizado foi seguinte:

BOX AIR cód. 2946 (da extremidade 5' para 3' - 22 nucleotídeos)

CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G

6- Determinação do potencial de patogenicidade das linhagens de enterococos produtoras de diacetil

6.1. Atividade de hemolisinas

As linhagens foram inoculadas em estrias na superfície de ágar BHI suplementado com 5% de hemácias de carneiro desfibrinadas (Biotério Boa Vista, Campinas) e incubadas a 37°C por 48h. Após incubação, a formação de halos ao redor das colônias foi indicativa da atividade de hemolisinas (α hemólise - parcial e β hemólise - total). Como controles positivo e negativo, foram utilizadas linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Lac. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*, respectivamente.

6.2. Produção de gelatinase

As linhagens foram inoculadas em tubos contendo ágar gelatina nutriente (Merck, Alemanha) e incubadas a 21°C por 7 dias. Após incubação, a presença de liquefação do meio foi indicativa de reação positiva para a produção de gelatinase. Como controle positivo foi utilizada uma linhagem de *Bacillus cereus* e como controle negativo meio de cultivo não inoculado.

6.3. Atividade de termonucleases

Ágar Bacto - DNase Test (Difco, EUA) suplementado com 0,83% de azul de toluidina 1% foi depositado em placas de Petri. Após solidificação e secagem do ágar, foram feitos vários poços com o auxílio de um pipeta *Pasteur* esterilizada. Cada poço foi inoculado com 50 µL de cultivos ativos em caldo BHI, previamente tratados em água fervente por 15 minutos. Após incubação a 37°C por 24h, os meios foram analisados quanto à presença de zonas de coloração rosa ao redor dos poços, indicativas de atividade de termonuclease.

7- Determinação do teor de diacetil das linhagens selecionadas

As linhagens isoladas de queijo Minas frescal foram inoculadas em leite desnatado 10% e incubadas a 21°C por 16 horas para a determinação do teor de diacetil produzido.

Para a quantificação de diacetil, foi seguida a metodologia descrita por Richelieu *et al.* (1997) para determinação de ácido alfacetoláctico e compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a um analisador automático de espaço livre (*headspace*). O método consiste na adição de 1 mL da amostra fermentada em frasco de 20 mL contendo 0,5mL de solução tampão fosfato pH 7,0 e extração dos voláteis presentes na amostra com auxílio de um Analisador de Espaço livre HP 7694E. Os frascos foram aquecidos a 60°C durante 20 minutos e 1,0 mL do espaço livre do frasco foi automaticamente injetado em um cromatógrafo a gás, HP 5890, operando com detetor de ionização de chama nas seguintes condições:

- Coluna capilar HP-FFAP com comprimento de 50 m e diâmetro interno de 0,20mm

- Temperaturas: coluna: inicial: 80°/2 minutos
 Razão: 30°C/min
 Final: 140°/6 minutos
 Vaporizador: 180°C
 Detetor: 250°C

- Injeção *split*

Condições *Headspace*

- Aquecimento do frasco: 60°C
- *Loop*: 110°
- Linha de Transferência (*Transfer line*): 110°C
- Tempo de análise (*GC cycle time*): 10 minutos
- Tempo de aquecimento do frasco (*Vial eq. Time*): 20 minutos
- Tempo de pressurização (*Pressurization time*): 0,30 minuto
- Tempo de enchimento do *Loop* (*Loop fill time*): 0,20 minuto
- Tempo de equilíbrio do *loop* (*loop eq. Time*) : 0,15 minuto
- Tempo de injeção (*Inject time*): 1 minuto
- Pressão do frasco (*Vial press*): 17,9 psi
- Pressão do gás de arraste (*Carr. Press*): 27,8 psi

O diacetil foi quantificado por padronização externa, utilizando-se 1 mL de leite, 0,5 mL de solução tampão e concentrações conhecidas de diacetil (Sigma, EUA). O limite de detecção do método foi de 0,4mg de diacetil/L de produto.

4.2. Processamento da bebida láctica fermentada

1- Microrganismos utilizados

As culturas lácticas comerciais utilizadas eram compostas por linhagens selecionadas de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* e por *Lac. lactis* subsp. *cremoris*. São eles:

a) Probat 606 Visbyvac (Wiesby GmbH & Co., Alemanha), utilizado em experimento preliminar para definir condições de fabricação e definição dos parâmetros de análise sensorial;

b) CH-N22 (Chr Hansen do Brasil, Valinhos, São Paulo)

c) XF 12 (Chr Hansen, Milwaukee, EUA), contendo a linhagem mutante MC010, de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, com produção aumentada de diacetil.

O fermento Probat 606 foi gentilmente cedido pela B.V. Representações Com. Prod. para Laticínios Ltda (SP) enquanto os fermentos CH-N22 e XF 12 foram gentilmente cedidos pela Chr. Hansen do Brasil (Valinhos, SP).

2- Manutenção e conservação das culturas

Os fermentos Probat 606 e CH-N22, que estavam na forma liofilizada, foram adicionados a 2L de leite desnatado e esterilizado. Estas misturas foram então homogeneizadas e aliquoteadas para obtenção de volumes de inóculos suficientes para os processamentos, ou seja, alíquotas que contivessem microrganismos na proporção final em relação ao volume de leite padronizado utilizado em cada processamento igual a 2%. Estes foram então congelados a - 20°C.

O fermento XF 12 foi recebido congelado, sendo então descongelado, aliquotado de maneira a obter-se a proporção final em relação ao volume de leite utilizado nos processamentos (2%) e novamente congelado. Como este fermento contém microrganismos geneticamente modificados (OGM), sua manipulação foi feita de acordo com as determinações da CTNBio, ou seja em regime de contenção, para evitar que estes microrganismos modificados geneticamente tivessem acesso ao ambiente. Todo o material utilizado (vidrarias e material descartável para análise sensorial) foi autoclavado ou submetido a lavagem com solução de hipoclorito para eliminação dos microrganismos presentes.

3- Processamentos de leite fermentado tipo *buttermilk*

Foram feitos testes preliminares com o fermento comercial Wiesby, para definição do teor de gordura do leite (0,3%; 0,6% e 1%) mais adequado para a produção da bebida. Para tal, quantidades de 2000 mL de leite desnatado (Molico, Nestlé) e reconstituído foram acrescidas de três diferentes teores de gordura (creme de leite Vigor), pasteurizadas (65°C/30 min), resfriadas a 20°C, inoculadas com o fermento e incubadas a 21-23°C durante um período de 16 horas. A bebida foi então avaliada quanto ao pH, acidez, confirmação do teor de gordura, além de características microbiológicas e sensoriais, a fim de ajustarem-se os parâmetros experimentais.

Após a definição daqueles parâmetros, foi realizado um processamento inicial de *buttermilk*, utilizando-se apenas o fermento tradicional (Figura 4), para caracterização da bebida e sua aceitação pelo consumidor. Neste processamento foi utilizado o leite desnatado reconstituído (Molico, Nestlé), acrescido de 0,6% gordura (Creme de leite

Vigor), como definido nos testes preliminares. O leite em pó foi reconstituído em água mineral (Serra Negra) e pasteurizado a 65°C por 30 minutos.

O leite pasteurizado foi inoculado com 2% do fermento comercial (Probat 606 Visbycvac) e incubado a 21-23°C durante um período de 16 horas, quando o valor de pH atingiu 4,52. Imediatamente após a homogeneização, o leite coagulado foi separado em duas porções, a maior das quais (15 litros) foi acrescida de 10% de açúcar para a análise sensorial. A bebida foi então resfriada a 4°C e envasada em garrafas plásticas de 1 litro, para armazenamento em câmara frigorífica a 4°C e estudo da vida de prateleira. Periodicamente, foram tomadas amostras da bebida formulada (com açúcar) e da não formulada para a avaliação das características físicas, químicas e microbiológicas. Assim, essas análises foram efetuadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias do processamento. A análise sensorial foi feita apenas com o produto formulado, no primeiro dia após o processamento.

O processamento final foi realizado com leite padronizado como já descrito, que foi dividido em 2 porções de 20 litros, acrescidas dos fermentos comerciais CH-N22 (Chr Hansen do Brasil, Valinhos, São Paulo) e XF 12 (Chr Hansen, Milwaukee, EUA), contendo a linhagem mutante MC010 de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, com produção aumentada de diacetil, incubadas a 21-23°C durante um período de 14 horas, quando o valor de pH atingiu 5,0. Imediatamente após a homogeneização, cada leite fermentado foi dividido em duas porções, uma das quais foi acrescida de 10% de açúcar para a análise sensorial. A bebida foi então resfriada a 4°C, e envasada em garrafas plásticas de 1 litro. Periodicamente, foram tomadas amostras da bebida com e sem açúcar, para a avaliação das características físicas, químicas e microbiológicas. Assim, essas análises foram efetuadas após 1, 14 e 28 dias do processamento. A análise sensorial das duas bebidas foi

feita com os produtos com e sem açúcar, no primeiro e no 28 ° dia após o processamento.

Todos os processamentos de *buttermilk* foram realizados na planta piloto do TECNOLAT, em regime de contenção, de acordo com as normativas editadas pela CTNBio.

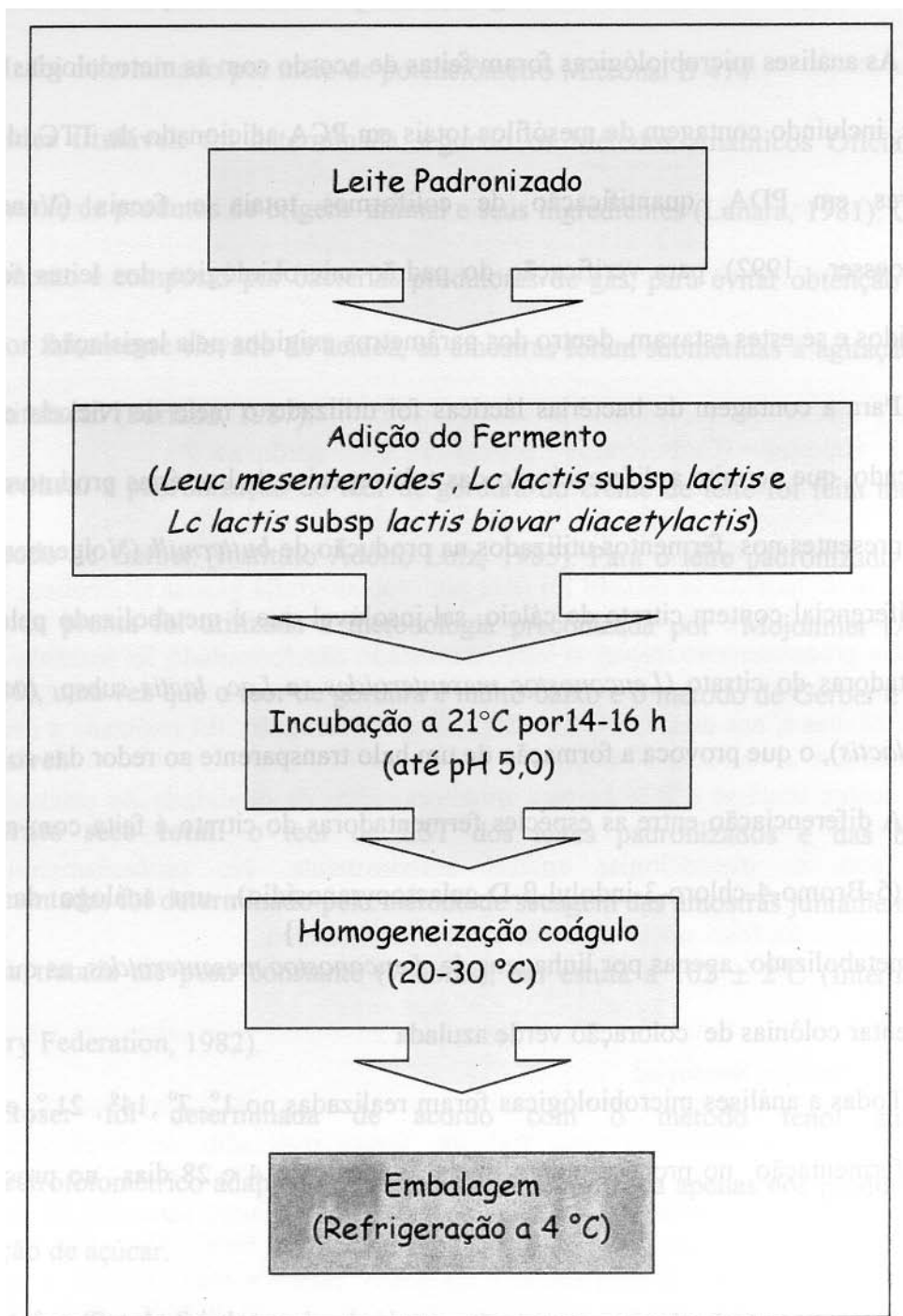


Figura 4. Fluxograma de produção de *buttermilk*

3.1. Determinações Microbiológicas

As análises microbiológicas foram feitas de acordo com as metodologias de análises oficiais, incluindo contagem de mesófilos totais em PCA adicionado de TTC, de bolores e leveduras em PDA, quantificação de coliformes totais e fecais (Vanderzant & Splittstoesser, 1992), para verificação do padrão microbiológico dos leites fermentados produzidos e se estes estavam dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

Para a contagem de bactérias lácticas foi utilizado o meio de Nickels e Leesment modificado, que permite a diferenciação das três espécies de bactérias produtoras de ácido láctico presentes nos fermentos utilizados na produção de *buttermilk* (Volgensen, 1987). O meio diferencial contém citrato de cálcio, sal insolúvel que é metabolizado pelas espécies fermentadoras do citrato (*Leuconostoc mesenteroides* e *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), o que provoca a formação de um halo transparente ao redor das colônias.

A diferenciação entre as espécies fermentadoras do citrato é feita com a adição de X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosídio), um análogo da galactose, que é metabolizado apenas por linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, as quais passam a apresentar colônias de coloração verde azulada.

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no 1º, 7º, 14º, 21º e 28º dias após a fermentação no processamento inicial e após 1, 14 e 28 dias no processamento final.

3.2. Determinações Físicas e Químicas:

- **pH:** foi determinado por meio de potenciômetro Micronal B 474
- **Acidez titulável:** foi determinada segundo os Métodos Analíticos Oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (Lanara, 1981). Como o fermento é composto por bactérias produtoras de gás, para evitar obtenção de um valor falsamente elevado de acidez, as amostras foram submetidas à agitação antes da titulação (Furtado, 1987).
- **Gordura:** a padronização do teor de gordura do creme de leite foi feita mediante método de Gerber (Instituto Adolfo Lutz, 1985). Para o leite padronizado e para bebida pronta foi utilizada a metodologia preconizada por Mojonier (AOAC, 1980), uma vez que o teor de gordura é muito baixo e o método de Gerber é menos sensível.
- **Extrato seco total:** o teor de EST dos leites padronizados e das bebidas fermentadas foi determinado pelo método de secagem das amostras juntamente com areia tratada até peso constante (7 horas), em estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (International Dairy Federation, 1982).
- **Lactose:** foi determinada de acordo com o método fenol sulfúrico espectrofotométrico adaptado de Acton (1977). Realizada apenas nos produtos sem adição de açúcar.
- **Proteína Total:** foi determinada de acordo com o método da International Dairy Federation (1962).

- **Carboidratos (açúcares redutores e não redutores):** foram determinados pelo método de Lane-Eynon (Lanara, 1981), realizado nos produtos com adição de açúcar.
- **Valor calórico** foi calculado a partir dos valores obtidos das determinações dos teores de gordura, proteínas e carboidratos ou lactose (das bebidas formuladas e não formuladas, respectivamente).

$$\text{Calorias} = (\text{Carboidratos} + \text{proteínas}) \times 4 + \text{gordura} \times 9$$

- A determinação de diacetil foi feita por cromatografia gasosa (Richelieu, 1997).

No processamento inicial, o leite fermentado não formulado foi mantido estocado a 4°C por 28 dias e, nos dias 7, 14, 21 e 28 após a fermentação, foi realizada a determinação de pH, acidez titulável e lactose para monitoramento da qualidade do produto, todas de acordo com as metodologias citadas anteriormente. No processamento final, o monitoramento foi feito no 14 e 28 dias após a fermentação.

3.3. Análise Sensorial

As análises sensoriais deste trabalho foram realizadas no Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística (Lafise) do ITAL. A avaliação sensorial foi feita através dos órgãos dos sentidos, principalmente do gosto, olfato e tato, quando o alimento ou bebida é ingerido. Os métodos de avaliação sensorial são subjetivos e baseados na resposta aos estímulos.

Para a determinação do teor de gordura mais adequado à produção do *buttermilk*, foi realizado um teste de ordenação, no qual uma série das três amostras foi apresentada

simultaneamente para um grupo de consumidores de iogurte, que analisaram as amostras apresentadas colocando-as em uma ordenação decrescente de acordo com suas preferências.

No processamento inicial, foi feito um teste de aceitabilidade do consumidor para o qual a bebida foi preparada com 10% de açúcar. A amostra foi servida em copos plásticos transparentes descartáveis, à temperatura de 7 – 10°C, a cada um dos 50 degustadores que compunham a equipe recrutada entre funcionários e estagiários do ITAL que são consumidores de iogurte. As amostras foram avaliadas quanto à aparência, aroma, sabor de diacetil, sabor ácido, sensação de frescor, cremosidade e corpo por meio de escala hedônica de nove pontos (9= gostei muitíssimo, 8= gostei muito, 7= gostei, 6= gostei pouco, 5= não gostei nem desgostei, 4= desgostei pouco, 3= desgostei, 2= desgostei muito e 1= desgostei muitíssimo), solicitando-se a descrição de gostos e desgostos associados à amostra. A amostra foi identificada com código de três dígitos aleatórios. O teste foi conduzido em cabines individuais iluminadas com lâmpadas fluorescentes e equipadas com o sistema computadorizado Compusense Five 4.0 para coleta e análise dos dados. As análises sensoriais foram realizadas no primeiro dia após processamento.

No processamento final, o teste de aceitabilidade foi realizado com os dois produtos, o primeiro fermentado com linhagens de microrganismos tradicionais e o segundo com microrganismos geneticamente modificados, seguindo-se os mesmos procedimentos já descritos de apresentação dos produtos a um grupo de 50 consumidores de iogurte. (Meilgaard, 1987).

A análise sensorial do produto fermentado por microrganismos geneticamente modificados recebeu autorização do CONEB (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde) através do parecer nº 392/2001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de linhagens produtoras de diacetil isoladas de queijo Minas Frescal artesanal e de queijo Prato industrializado

O primeiro objetivo do trabalho foi selecionar e identificar linhagens produtoras de diacetil para serem utilizadas na produção de *Buttermilk* conforme o Fluxograma exposto na Figura 5.

SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DIACETIL

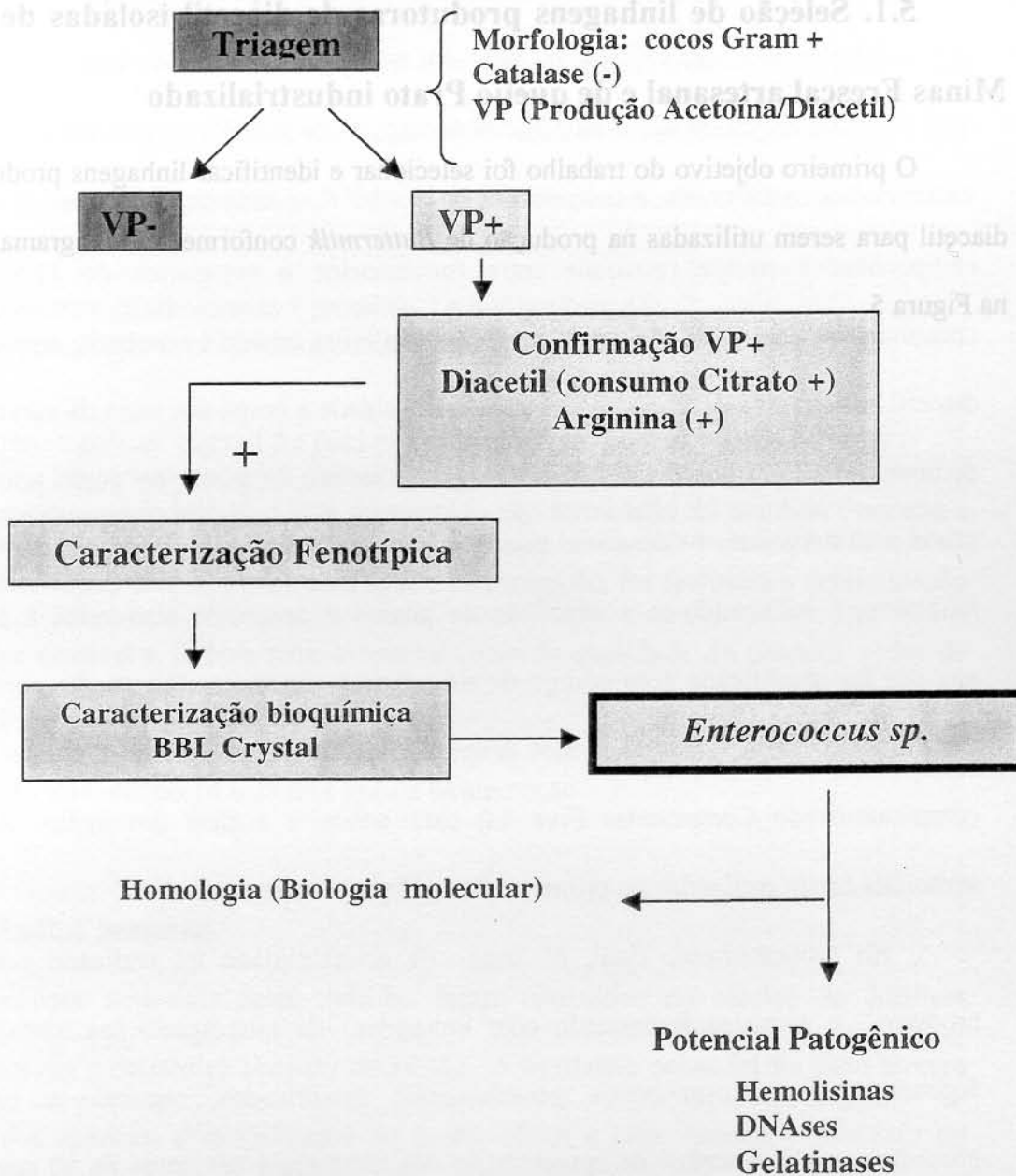


Figura 5. Fluxograma de identificação de bactérias produtoras de diacetil

Os Queijos tipo Minas Frescal utilizados para obtenção das culturas produtoras de diacetil foram produzidos de maneira artesanal, a partir de leite cru, sem a adição de fermentos comerciais e apresentavam bons aspectos sensoriais, ou seja, o sabor e aroma típicos, aspecto homogêneo e não rendado (sem coliformes que provocam aspecto "rendado"), indicativos de boa qualidade sanitária.

Paralelamente ao trabalho de seleção de linhagens produtoras de diacetil, no laboratório de microbiologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios – TECNOLAT, foi realizado um estudo de maturação de queijo tipo Prato, através da avaliação das populações microbianas presentes e envolvidas neste processo. Quatro marcas de Queijo Prato industrializado, comercializadas no mercado formal foram analisadas e destes queijos (Marcas A, B, C, e D) foram isoladas 54 culturas de cocos Gram positivos, catalase negativos que cresceram em meio seletivo para enterococos (Ágar KF), que foram submetidas ao mesmo processo de seleção de produtoras de diacetil (Figura 5).

A triagem inicial, para a avaliação da pureza das culturas, foi feita considerando os seguintes parâmetros: a verificação das características morfológicas, atividade de catalase, e produção de acetoina/diacetil pelo teste de Voges-Proskauer (Tabela 2).

Tabela 2. Características morfológicas, atividade de catalase e produção de acetoina /diacetil.

LINHAGEM	MORFOLOGIA	CATALASE	VP
A 44 (Queijo Prato marca A)	Cocos Gram positivos	-	+
A 45	Cocos G +	-	-
A 109	Cocos G +	-	-
A 110	Cocos G +	-	-
A 216	Cocos G +	-	-
A 217	Cocos G +	-	-
A 218	Cocos G +	-	-
A 304	Cocos G +	-	-
A 305	Cocos G +	-	-
A 306	Cocos G +	-	-
A 308	Cocos G +	-	-
A 428	Cocos G +	-	-
A 429	Cocos G +	-	-
A430	Cocos G +	-	-
B 40 (Queijo Prato Marca B)	Cocos G +	-	+
B 41	Cocos G +	-	+
B109	Cocos G +	-	-
B 110	Cocos G +	-	+
B 111	Cocos G +	-	-
B 312	Cocos G +	-	+
B 313	Cocos G +	-	-
B 314	Cocos G +	-	+
B 315	Cocos G +	-	+
B 316	Cocos G +	-	+
B 428	Cocos G +	-	+
B 429	Cocos G +	-	-
B 430	Cocos G +	-	-
C 36 (Queijo Prato Marca C)	Cocos G +	-	-
C 37	Cocos G +	-	+
C 106	Cocos G +	-	-
C 107	Cocos G +	-	-
C 108	Cocos G +	-	-
C 210	Cocos G +	-	-
C 211	Cocos G +	-	-
C 212	Cocos G +	-	-
C 213	Cocos G +	-	-
C 312	Cocos G +	-	-
C 313	Cocos G +	-	-
C 314	Cocos G +	-	-
D 43 (Queijo Prato marca D)	Cocos G +	-	-
D 44	Cocos G +	-	-

Continuação

LINHAGEM	MORFOLOGIA	CATALASE	VP
D 45	Cocos G +	-	-
D 83	Cocos G +	-	-
D 84	Cocos G +	-	-
D 216	Cocos G +	-	-
D 314	Cocos G +	-	+
D 315	Cocos G +	-	-
D 316	Cocos G +	-	+
D 317	Cocos G +	-	+
D 319	Cocos G +	-	-
D 538	Cocos G +	-	-
D 564	Cocos G +	-	+
D 570	Cocos G +	-	+
Q1 (Queijo Minas frescal artesanal)	Cocos G +	-	+
Q2	Cocos G +	-	+
Q3	Cocos G +	-	+
Q4	Cocos G +	-	+
Q5	Cocos G +	-	+
Q6	Cocos G +	-	+
Q7	Cocos G +	-	+
Q8	Cocos G +	-	+
Q9	Cocos G +	-	+
<i>Lac. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> A	Cocos G +	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (controle positivo catalase)	Cocos G +	+	#

Resultados:

Catalase positiva: formação de bolhas de gás

Catalase negativa: ausência de bolhas de gás

VP Positivo: formação de anel vermelho, que indica a produção de acetoina.

VP Negativo: formação de anel marrom.

O símbolo # indica não realização do teste com esta linhagem.

Todas apresentaram morfologia de cocos Gram positivos e resultados negativos no teste de catalase, indicando que não possuíam esta enzima, tratando-se assim de bactérias lácticas que são todas catalase negativas (Desmazeaud & Roissart, 1994).

Nove culturas isoladas de queijo Minas Frescal tipo artesanal apresentaram resultados positivos no teste de Voges-Proskauer (VP), indicando produção de acetoina e/ou diacetil, enquanto que dentre as provenientes dos queijos Prato, apenas 15 foram selecionadas como produtoras de acetoina/diacetil. O teste foi repetido para confirmação destes resultados iniciais, tendo sido incluído, também, o teste químico qualitativo (fermentação do citrato), para verificar se estas linhagens haviam consumido o citrato presente no meio de cultivo.

Por meio do teste de VP verificou-se a produção de qualquer tipo de acetilmetilcarbinal formado a partir da glicose presente no meio onde o microrganismo foi cultivado. Ao adicionar um álcali, o acetilmetilcarbinal presente é oxidado na forma de diacetil. Este teste foi realizado segundo a modificação proposta por Barritt (1936) que, além do hidróxido de potássio, utiliza o α -naftol (Harrigan & MacCance, 1976). Os resultados positivos correspondem à formação de anel vermelho na superfície no meio líquido. Como controle negativo foi utilizada uma cultura *Lac. lactis* comercial e como controle positivo, uma cultura de *Lac. lactis* biovar. *diacetylactis*.

Estas culturas foram então avaliadas quanto ao consumo de citrato, sendo este um teste indireto de produção de diacetil. As linhagens positivas neste teste, apresentaram coloração branca no tubo de ensaio após a adição dos reagentes, indicando que fermentaram o citrato presente no leite para a produção desses compostos aromáticos, enquanto que as linhagens Q1 e Q3 apresentaram coloração intermediária, indicando fermentação incompleta.

Os resultados da confirmação da produção de acetoina e/ou diacetil pelo teste de Voges-Proskauer (VP) e do teste químico qualitativo (fermentação do citrato) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização bioquímica das linhagens selecionadas

LINHAGENS	VP	DIACETIL
A 44	+	+
B 40	+	+
B 41	+	+
B 110	+	+
B 312	+	+
B 315	+	--
B 316	+	+
B 428	+	+
C 37	+	+
D 314	+	+
D 316	+	+
D 317	+	+
D 564	+	+
D 570	+	+
Q1	+	+
Q2	+	+/-
Q3	+	+/-
Q4	+	+
Q5	+	+
Q6	+	+
Q7	+	+
Q8	+	+
Q9	+	+
<i>Lac. lactis</i> subsp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> A	+	+
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 81	--	--
Meio de cultura	--	--

VP + : formação de anel vermelho, que indica a produção de acetoina.

VP -- : formação de anel marrom.

Diacetil + : coloração branca, com total fermentação do citrato e provável produção de diacetil.

Diacetil +/- : coloração intermediária, fermentação incompleta do citrato.

Diacetil -- : coloração amarela escura, não fermentação do citrato.

5.2. Classificação taxonômica de linhagens produtoras de diacetil

5.2.1. Caracterização fenotípica

Todas as culturas confirmadas anteriormente como produtoras de diacetil foram submetidas aos testes subseqüentes para caracterização fisiológica em relação às características bioquímicas e de crescimento, que também fornecem resultados que auxiliam na classificação taxonômica (Mundt, 1986).

De acordo com Desmaures *et al.* (1998), a caracterização fenotípica para diferenciação entre os gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus*, anteriormente pertencentes a um único grupo dos *Streptococcus*, deve ser feita através de testes de crescimento a diferentes temperaturas (10°C, 40°C e 45°C), tolerância a 4% de NaCl, produção de acetoina por teste de Voges-Proskauer, hidrólise da arginina e produção de ácido a partir da maltose.

Mangin *et al.* (1999) sugerem que a caracterização fenotípica deve ser complementada com teste de crescimento em meio adicionado de 6,5% de NaCl. Além da tolerância ao sal e às temperaturas de crescimento, as linhagens devem ser caracterizadas quanto à resistência ao pH alcalino, nos valores 9,2 e 9,6, de acordo com Moreno *et al.* (1986).

Com base nestas informações obtidas na literatura, realizou-se a caracterização fenotípica das linhagens, acompanhadas das linhagens comerciais *Lac. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* A e *Lac. lactis* subsp *lactis* 81, ambos da marca Wiesby, que foram utilizados como referências para as características típicas do gênero *Lactococcus*.

As características fisiológicas e bioquímicas das linhagens selecionadas como produtoras de diacetil são apresentadas na tabela 4.

As linhagens provenientes dos queijos Minas Frescal artesanal não apresentaram resultados similares às culturas *Lac lactis* 81 e *Lac lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* A utilizadas como referência. As linhagens isoladas destes queijos foram capazes de crescer em meio com pH alcalinizado (9,2 e 9,6), em concentrações de 4,0 e 6,5% de NaCl e em temperaturas de 10°C e 40°C e 45°C.

Segundo Franz & Holzapfel (1999), algumas linhagens de *Lac lactis* isoladas de queijo são capazes de crescer a 45°C, mas as características de crescimento a pH 9,6 e em meio com 6,5% de NaCl não são típicas deste gênero.

As linhagens isoladas dos Queijos Prato também apresentaram resultados semelhantes aos obtidos para as nove linhagens anteriores, ou seja, características típicas do gênero *Enterococcus*, o que era esperado, pois foram isoladas em meio seletivo para este grupo.

Tabela 4. Caracterização fenotípica das linhagens selecionadas

LINHAGENS	pH 9,2	pH 9,6	NaCl 4%	NaCl 6,5%	Tem. 10 °C	Tem. 40 °C	Tem. 45°C	Ferm. Maltose	Hidrólise arginina
A 44	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 110	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 312	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 315	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 316	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 428	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 314	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 316	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 317	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 564	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D 570	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> A	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Lac. lactis</i> 81	+	-	+	-	+	+	-	+	+

- Para tolerância aos pHs alcalinos, ao NaCl nas concentrações 4% e 6,5% e temperaturas de crescimento: + indica crescimento normal da linhagem e – ausência de crescimento.
- Para fermentação da maltose, + indica coloração amarela e portanto, a fermentação do carboidrato.
- Para hidrólise da arginina, + significa a formação de coloração laranja, indicativa da presença de amônia proveniente da hidrólise da arginina e – ausência de coloração laranja.

5.2.2. Caracterização bioquímica e enzimática por sistema miniaturizado

As linhagens provenientes dos queijos tipo Minas Frescal, após os testes de crescimento, foram submetidas ao sistema de Galerias API. Os resultados obtidos foram duvidosos para todas, inclusive para a utilizada como padrão, no caso uma linhagem comercial de *Lactococcus lactis*, pois todas foram identificadas, com 60% ou mais de probabilidade, como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. A segunda possibilidade apresentada pelo sistema, com apenas 30% a 40% de probabilidade de acerto, referia-se a espécies pertencentes ao gênero *Lactococcus*, segundo os resultados submetidos a um programa de identificação fornecido pelo fabricante. Estes resultados, somados a características de crescimento atípicas no gênero *Lactococcus* apresentadas pelas linhagens, mostraram a necessidade de utilização de outro sistema para a classificação taxonômica, tendo sido escolhido o sistema BBL Crystal para cocos Gram positivos.

Os resultados obtidos com a utilização deste sistema estão apresentados na Tabela 5, tendo sido a linhagem *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A utilizada como controle. Apesar do sistema de identificação não permitir a classificação até biovariedade, no caso *diacetylactis*, este sistema foi eficiente na identificação das linhagens.

As nove linhagens isoladas dos Queijos Minas Frescal foram, assim, classificadas taxonomicamente como *Enterococcus faecium* pelo sistema BBL Crystal, sendo então submetidas a testes subseqüentes para detectar a presença de fatores diretamente ligados a possível patogenicidade (Eaton & Gasson, 2001; Giraffa *et al*, 1997). As linhagens provenientes dos Queijos Prato também foram identificadas através do sistema BBL Crystal (Tabela 5).

Tabela 5. Classificação taxonômica, obtida pelo sistema BBL Crystal, das linhagens produtoras de diacetil pelo teste de VP

Linhagem	Espécie identificada	Código sistema	Probabilidade
A 44	<i>Enterococcus faecalis</i>	2770713627	97,26%
B 40	<i>Lactococcus garvieae</i>	2751711627	99,99%
B 41	<i>Lactococcus garvieae</i>	3753711627	99,99%
B 110	<i>Enterococcus faecalis</i>	2770713627	97,26%
B 312	<i>Enterococcus faecium</i>	2770713627	97,26%
B 315	<i>Enterococcus faecalis</i>	2751773627	96,78%
B 316	<i>Lactococcus garvieae</i>	2551711627	99,99%
B 428	<i>Lactococcus garvieae</i>	2550711627	91,95%
C 37	<i>Enterococcus faecium</i>	2570677633	99,93%
D 314	<i>Enterococcus faecium</i>	2751677627	65,31%
D 316	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2740671627	62,43%
D 317	<i>Enterococcus faecalis</i>	2750773627	99,99%
D 564	<i>Enterococcus hirae</i>	2751753622	99,95%
D 570	<i>Streptococcus uberis</i>	3657773623	99,93%
Q1	<i>Enterococcus faecium</i>	2570777637	64,54%
Q2	<i>Enterococcus faecium</i>	2550777633	89,52%
Q3	<i>Enterococcus faecium</i>	2550777637	88,54%
Q4	<i>Enterococcus faecium</i>	2550777677	75,55%
Q5	<i>Enterococcus faecium</i>	2174677777	95,95%
Q6	<i>Enterococcus faecium</i>	2570677633	99,93%
Q7	<i>Enterococcus faecium</i>	2370677633	99,15%
Q8	<i>Enterococcus faecium</i>	2550777633	89,52%
Q9	<i>Enterococcus faecium</i>	2570677633	95,95%
<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> A	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2440711623	99,00%

A classificação taxonômica tradicional parte das informações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas obtidas das culturas puras, mas elas nem sempre são suficientes para definir uma espécie, pois são baseadas no fenótipo dos microrganismos (Priest, 1993). Além disto, algumas destas características recebem por parte dos pesquisadores um peso maior que outras na definição da espécie, por exemplo, o crescimento a 45°C das linhagens B40, B41, B316, B428 e D316 caracteriza os *Enterococcus* contrariando os

resultados obtidos com o sistema miniaturizado BBL Crystal, que as classificou como *Lactococcus* (Mundt, 1986).

Estas dificuldades têm sido resolvidas atualmente com a utilização de técnicas de biologia molecular e análises químicas dos componentes celulares como paredes e membranas, que além de auxiliarem na correta identificação dos microrganismos, possibilitam estudos de evolução e da real proximidade entre os gêneros e espécies.

5.3. Caracterização molecular

Como as nove linhagens isoladas dos queijos Minas Frescal pertencem à mesma espécie, foram realizados testes moleculares para verificação de homologia entre elas, utilizando os *primers* REP, ERIC, BOX (Figuras 6, 7 e 8).

GEL REP



Figura 6. Perfil de migração derivado da amplificação do DNA bacteriano com o *primer* REP (Gel de agarose 1%, submetido a eletroforese). Canaletas 1 e 12: padrões de DNA com peso molecular de 100 pares de base. Canaleta 2: DNA amplificado de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A. Canaletas 3 a 11: DNA das linhagens de *E. faecium* Q1, Q5, Q2, Q8, Q6, Q7, Q9, Q4 respectivamente.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

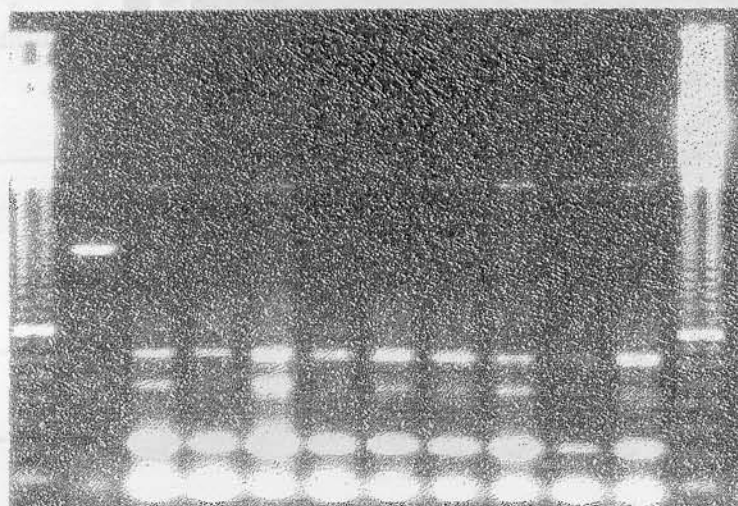


Figura 7. Perfil de migração derivado da amplificação do DNA bacteriano com o primer ERIC (gel de agarose a 1%, submetido a eletroforese). Canaletas 1 e 12: padrões de DNA com peso molecular de 100 pares de base. Canaleta 2: DNA amplificado de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A. Canaletas 3 a 11: DNA das linhagens de *E. faecium* Q1, Q5, Q2, Q8, Q6, Q7, Q9, Q4 respectivamente.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

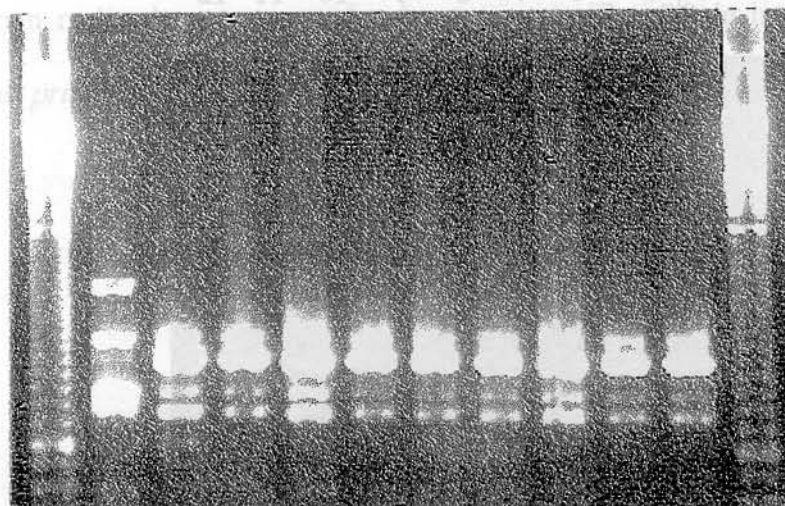


Figura 8. Perfil de migração derivado da amplificação do DNA bacteriano com o primer Box (gel de agarose a 1% submetido a eletroforese). Canaleta 1 e 12: padrões de DNA com peso molecular de 100 pares de base. Canaleta 2: DNA amplificado de *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A. Canaletas 3 a 11: DNA das linhagens de *E. faecium* Q1, Q5, Q2, Q8, Q6, Q7, Q9, Q4 respectivamente.

A análise dos perfis de migração observados nos géis permitiu observar que as nove linhagens de *Enterococcus faecium* apresentaram bandas similares de DNA amplificado, diferindo apenas na intensidade delas. O dendograma (figura 9) construído a partir do resultado dos três géis mostrou que existe uma pequena diferença entre as nove linhagens e uma maior distância taxonômica entre as nove linhagens de *Enterococcus faecium* e a linhagem de *Lactococcus lactis*.

DENDOGRAMA

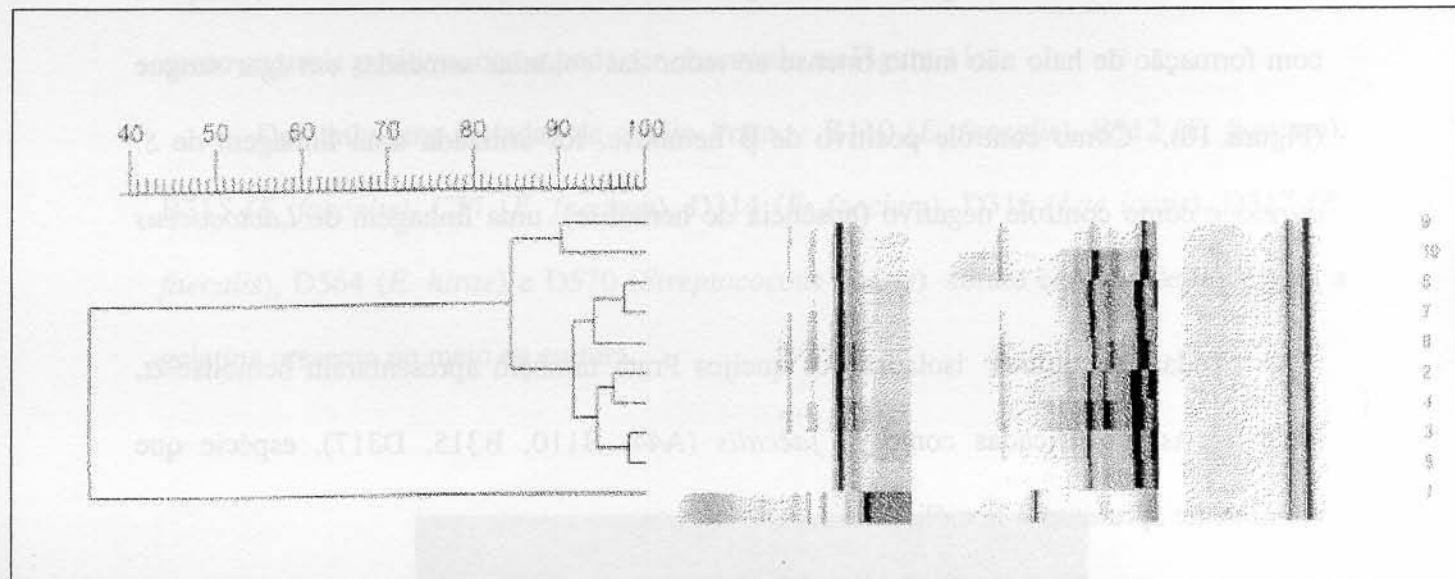


Figura 9- Dendrograma dos resultados obtidos com os três *primers* (REP,ERIC e BOX). Número 1, *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* A . 2 a 10 linhagens de *E. faecium* na seguinte ordem: (2) Q1, (3)Q5, (4)Q2, (5)Q8, (6)Q6, (7)Q7, (8)Q9, (9)Q4.

As linhagens isoladas de queijo Prato serão analisadas quanto à quantidade de diacetil produzido e serão submetidas à caracterização molecular , se necessário.

5.4. Determinação do potencial de patogenicidade

A atividade de α -hemolisina é uma característica comum em *Enterococcus faecium*, mas a atividade da β hemólise é um indicativo de patogenicidade nesta espécie (Eaton & Gasson, 2001; Mundt, 1986). A produção de enzimas capazes de digerir a gelatina é considerada um fator de patogenicidade (Eaton & Gasson, 2001). Além destas, a produção de enzimas termo resistentes capazes de degradar o DNA é também um importante fator de patogenicidade, associado à produção de enterotoxinas (Giraffa *et al*, 1997). Estes três

parâmetros foram utilizados na avaliação do potencial patogênico dos enterococos isolados.

Todas as nove linhagens testadas apresentaram somente atividade da α -hemólise, com formação de halo não muito intenso ao redor das colônias semeadas em ágar sangue (Figura 10). Como controle positivo de β hemólise, foi utilizada uma linhagem de *S. aureus* e como controle negativo (ausência de hemólise), uma linhagem de *Lactococcus lactis*.

Todas as culturas isoladas dos queijos Prato também apresentaram hemólise α , inclusive as identificadas como *E. faecalis* (A44, B110, B315, D317), espécie que comumente apresenta β -hemólise.

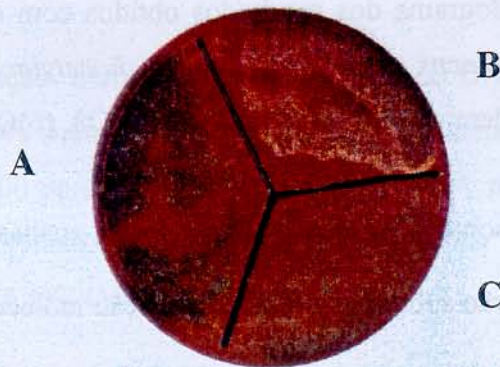


Figura 10. Teste de Hemólise em placa de ágar sangue

A - *E. faecium*, produtor de α hemolisina (hemólise parcial),

B - *S. aureus*, (controle positivo), produtor de β hemolisina (hemólise total)

C - *Lac. lactis*, (controle negativo) não produtor de hemolisinas

As nove linhagens de *Enterococcus faecium* isoladas dos queijos tipo Minas Frescal apresentaram atividade de gelatinase negativa, não sendo capazes de promover a liquefação do meio com gelatina, ao contrário da linhagem de *Bacillus cereus*, utilizada como controle positivo, como pode ser observado na Figura 11.

Das linhagens isoladas de queijo Prato, B110 (*E. faecalis*), B312 (*E. faecium*), B315 (*E. faecalis*), C37 (*E. faecium*), D314 (*E. faecium*), D316 (*Lac lactis*), D317 (*E. faecalis*), D564 (*E. hirae*) e D570 (*Streptococcus uberis*) foram capazes de liqüefazer a gelatina presente no meio de cultura.

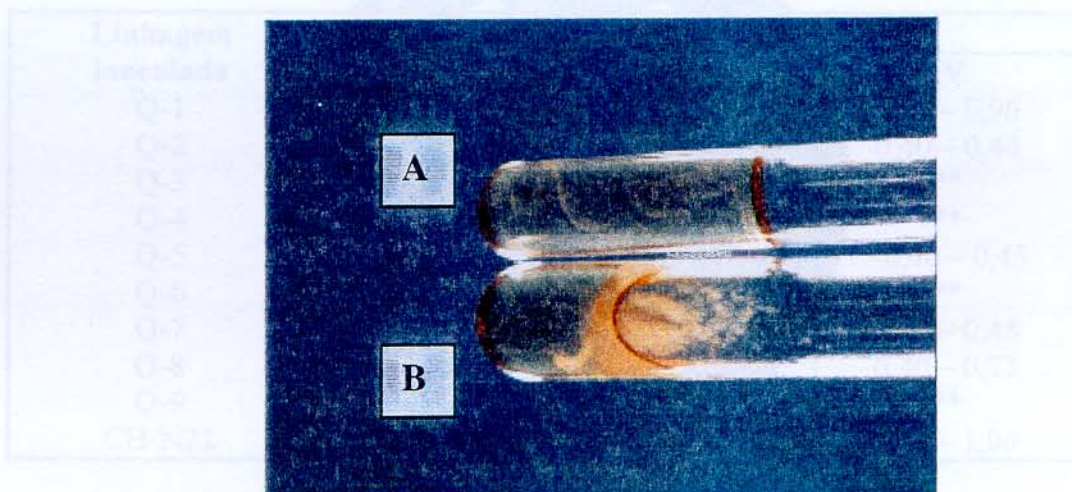


Figura 11. Teste para produção de Gelatinase em ágar gelatina nutriente

A -Tubo inoculado com *E. faecium* não produtor de gelatinase - meio permanece sólido.

B -Tubo inoculado com *Bacillus cereus* (controle positivo) produtor de gelatinase, que liqüefez o meio de cultura.

Da mesma maneira, nenhuma das linhagens testadas apresentou atividade de termonucleases, não sendo verificada a formação de halo róseo ao redor dos poços inoculados com as linhagens, o que indica que elas não produziram enzimas que degradam o DNA e que são termo resistentes. O controle positivo (*S. aureus*) formou halo ao redor do orifício (Figura 12). Esses resultados revelaram que as culturas não são patogênicas.

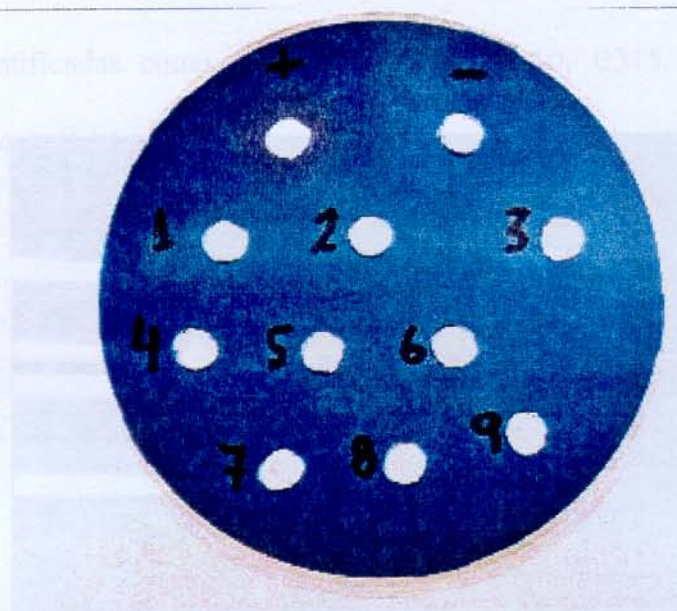


Figura 12. Teste para presença de termonuclease: A reação positiva de termonuclease produzida por linhagem de *S. aureus*, é visualizada no primeiro orifício à esquerda (+), onde se formou um halo de coloração rósea. O orifício à direita, (-) é o controle negativo da reação e nos orifícios numerados de 1 a 9 foram inoculadas as linhagens de *E. faecium*, todas negativas para o teste de termonuclease.

5.5. Quantificação do diacetil produzido pelas linhagens isoladas de queijo Minas Frescal

As amostras de leites fermentados pelas linhagens de *Enterococcus faecium* isoladas de queijo Minas Frescal foram submetidas à análise cromatográfica para identificação e quantificação de diacetil (2,3-butanodiona). Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Quantidade de diacetil presente nas amostras de leite fermentado com as linhagens Q-1 a Q-9 e com o fermento comercial CH-N22 (Chr Hansen do Brasil), utilizado como controle positivo.

Linhagem inoculada	Quantidade de Diacetil (mg/L)*		
	M	DP	IV
Q-1	0,89	0,07	0,81 – 0,96
Q-2	0,41	0,05	0,40 – 0,46
Q-3	<0,4	**	**
Q-4	<0,4	**	**
Q-5	0,40	0,07	<0,40 – 0,45
Q-6	<0,4	**	**
Q-7	0,45	0,02	0,43 – 0,48
Q-8	0,55	0,17	0,40 – 0,73
Q-9	0,4	**	**
CH-N22	0,85	0,19	0,73 – 1,06

M= média, DP= desvio padrão, IV= intervalo de variação

* Valores referentes a três determinações

** Não aplicável

Todas as linhagens selecionadas a partir dos Queijos Minas Frescal artesanais pertencem à espécie *E. faecium*, não são patogênicas e, portanto, têm potencial de aplicabilidade na indústria de laticínios, principalmente a linhagem Q-1, que produz diacetil em quantidades próximas às do fermento comercial Tradicional, utilizado na produção de *buttermilk*. Apesar dos enterococos serem considerados como indicadores de má qualidade sanitária do produto em determinadas situações, vários autores consideram algumas espécies deste gênero como parte integrante da microbiota fermentadora presente no leite.

Alguns queijos artesanais europeus, que são produzidos a partir de leite cru, contêm bactérias do gênero *Enterococcus*, que contribuem para as características de aroma e sabor destes produtos que recebem, inclusive, um registro de certificação de origem (RDO – Registered Designation of Origin) (Gomez *et al.*, 1999). Entre as preparações de diversas espécies de bactérias lácticas consideradas probióticas, já existem linhagens selecionadas de *Enterococcus faecium* (Franz *et al.*, 1999)

Na legislação brasileira para leite e produtos de laticínio, os enterococos não são citados e a possível contaminação fecal é avaliada pela presença, acima dos limites, de coliformes fecais (Resolução- RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001).

5.6. Resultados da produção da bebida láctica fermentada

Como não foi possível selecionar uma linhagem de *Lc lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* boa produtora de diacetil para compará-la com o fermento comercial, foram feitos processamentos apenas com as culturas comerciais para caracterização física, química, microbiológica e sensorial da bebida tipo *buttermilk*.

5.6.1. Processamento preliminar – Determinação do teor de gordura.

A determinação do teor de gordura mais adequado à produção do *Buttermilk* foi realizada através de uma análise sensorial. Foram preparados, através da adição de creme de leite ao leite em pó desnatado reconstituído com água mineral, leites com 0,3%, 0,6% e 1,0% de gordura. O creme de leite utilizado possuía 35,80% de gordura e foi adicionado nas seguintes proporções para a preparação dos leites: para 2 litros de leite com 0,3% de gordura, acrescentou-se 6,37 g; para 0,6% 23,13 g e para 1,0% 45,47 g de creme de leite.

Estes preparados foram então adicionados do Fermento Probat 606 Visbyvac e incubados a 21°C por 14 a 18 horas, até o pH atingir o valor 4,5 quando foram refrigerados e homogeneizados para a realização das análises sensoriais, microbiológicas e físico-químicas.

5.6.1.1. Determinações microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas para avaliação de possíveis contaminantes presentes na água utilizada para a reconstituição de leite e de bolores e leveduras, provenientes principalmente da contaminação ambiental, estão apresentados na tabela 7, que também inclui a contagem total de mesófilos.

Tabela 7 - Resultados da análise microbiológica

AMOSTRA / DIA	Coliformes Totais (NMP/ml)	Bolores e Leveduras (UFG/ml)	Contagem total de mesófilos (UFC/ml)
Leite com 0,3% de gordura	<0,3 NMP/ml	<10	0
Leite com 0,6% de gordura	<0,3 NMP/ml	<10	0
Leite com 1,0% de gordura	<0,3NMP/ml	<10	0

Todas as contagens obtidas estão dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

5.6.1.2. Determinações físicas e químicas

Foram realizadas determinações de pH e acidez para avaliar a produção de ácido láctico pelos microrganismos fermentadores e a determinação de gordura para confirmar se a padronização do leite desnatado através da adição de creme (tabela 8).

Tabela 8- Resultados análises físicas e químicas

Amostra	PH	Acidez titulável	Gordura
Leite com 0,3% de gordura	4,26	80,29°D	0,32%
Leite com 0,6% de gordura	4,30	81,89°D	0,59%
Leite com 1,0% de gordura	4,25	80,29°D	0,92%

5.6.1.3. Análise sensorial

No teste realizado para definição do teor de gordura mais adequado à produção do *buttermilk*, cada consumidor examinou as amostras codificadas e apresentadas em ordem casualizadas e fez uma ordenação decrescente de acordo com sua preferência. Com os valores das somas das ordens para cada amostra foi calculada a estatística de Friedman para 2 graus de liberdade resultando em 0,37.

O valor crítico correspondente a 5% de nível de significância é igual a 5,99. Concluiu-se que não existe preferência significativa entre as três amostras, uma vez que 0,37 (valor equivalente a 2 graus de liberdade) é menor que 5,99.

A tendência do consumidor é buscar produtos saudáveis, com baixo teor de gordura mas, de acordo com Monnet (1994) teores de gordura abaixo de 0,3% podem diminuir a estabilidade do produto. Para evitar que eventuais erros na adição de gordura levassem à diminuição da estabilidade, foi decidido a concentração de 0,6% como a mais adequada para a produção do *buttermilk*.

5.6.2. Processamento inicial

Para definir condições de fabricação e os parâmetros de análise sensorial, foi realizado um processamento utilizando apenas o Fermento Probat 606 Visbycvac, que contem os microrganismos fermentadores tradicionais (não geneticamente modificados), no qual foram obtidos os resultados expostos a seguir.

5.6.2.1. Determinações microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas para avaliação de possíveis contaminações por coliformes, que podem estar presentes na água utilizada para a reconstituição de leite e no açúcar usado na composição da bebida e de bolores e leveduras, provenientes principalmente da contaminação ambiental, estão apresentados na tabela 9 que também inclui a contagem total de mesófilos.

Tabela 9 –Avaliação microbiológica da matéria prima e das bebidas fermentadas no processamento inicial (fermento Probat 606)

AMOSTRA / DIA	Coliformes Totais (NMP/ml)	Bolores e Leveduras (UFG/ml)	Contagem total de mesófilos (UFC/ml)
Leite padronizado	<0,3 NMP/ml	<10	0
BT - 1D	2,3 NMP/ml	<10	$3,1 \times 10^3$
BT - 7D	0,4 NMP/ml	<10	$3,8 \times 10^3$
BT - 14D	0,7 NMP/ml	4×10^2	$3,6 \times 10^3$
BT - 21D	<0,3 NMP/ml	14×10^2	$4,6 \times 10^3$
BT - 29D	<0,3 NMP/ml	6×10^2	$3,0 \times 10^3$
BTA-1D	> 240 NMP/ml	<10	$5,0 \times 10^5$
BTA- 7D	9,3 NMP/ml	6×10^2	$8,1 \times 10^5$
BTA- 14D	0,9 NMP/ml	7×10^2	$2,2 \times 10^3$
BTA- 21D	<0,3 NMP/ml	3×10^2	$2,8 \times 10^3$
BTA- 28D	<0,3 NMP/ml	$1,2 \times 10^3$	$4,8 \times 10^6$

BT- *Buttermilk* produzido com fermento Tradicional

BTA – *Buttermilk* produzido com fermento Tradicional e com 10% de Açúcar

Todas as amostras que apresentaram resultado positivo da presença de coliformes totais, ou seja, crescimento com produção de gás após 24 ou 48 horas de incubação a 35°C, foram transferidas para tubos de caldo *E. coli* (EC), suplementado com 50mg/L de 4-metil-beliferil-β-D-glucoronídeo (EC-MUG), também contendo tubos de Durhan e incubados por 24 horas a 45°C, para verificação da presença de coliformes fecais. Nenhuma das amostras apresentou resultado positivo para a presença de coliformes fecais, sendo que todas as contagens obtidas estão dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

A adição de açúcar provocou um aumento no número de coliformes totais, pois foi utilizado açúcar comercial, que normalmente contém um número relativamente elevado destes microrganismos. Com o decorrer do período de estocagem, notou-se a diminuição da contagem de coliformes devido, principalmente, aos efeitos do aumento na acidificação do produto.

Para avaliar a proporção entre os microrganismos que compõem o fermento no decorrer da estocagem, foi utilizado o meio Nickels e Leesment modificado, que permite a diferenciação das três espécies (Tabela 10).

Tabela 10– Contagem diferencial

AMOSTRA/DIA	<i>Leuconostoc. sp</i> (verdes) (UFG/ml)	<i>Lac. diacetylactis</i> (brancas com halo) (UFG/ml)	<i>Lac. lactis</i> (brancas sem halo) (UFG/ml)
BT - 1D	$5,1 \times 10^{14}$	$1,1 \times 10^{16}$	INC
BT - 7D	$1,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$
BT - 14D	$1,25 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^8$
BT - 21D	$5,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^7$
BT - 28D	$4,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
BTA - 1D	$5,0 \times 10^{14}$	$9,0 \times 10^{15}$	INC
BTA - 7D	$1,1 \times 10^8$	$1,14 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$
BTA - 14D	$3,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8$
BTA - 21D	$3,8 \times 10^8$	$7,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$
BTA - 28D	$1,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$

BT- Buttermilk produzido com fermento Tradicional

BTA – Buttermilk produzido com fermento Tradicional e com 10% de Açúcar

INC – Número incontável de colônias na maior diluição utilizada

Mesmo após 28 dias da fermentação, ou seja, no final da vida de prateleira do produto, as contagens da cada espécie que compõe a cultura láctica do *buttermilk* diminuíram devido à acidificação provocada pelas próprias bactérias lácticas, mas mantiveram-se dentro dos limites legais, ou seja, no mínimo com 10^6 UFC/mL de produto.

5.6.2.2. Determinações físicas e químicas para caracterização da bebida.

Creme de leite

O teor de gordura do creme de leite utilizado como matéria prima para a produção do *buttermilk* foi de 38,11%. Para preparo de 20 litros de leite com 0,6% de gordura, adicionaram-se 315g do creme ao leite.

Leite padronizado

O leite padronizado foi analisado quanto a sua densidade, pH, acidez titulável, extrato seco total, teor de proteínas, lactose e teor de gordura, este último para confirmação da correta adição de gordura, com os resultados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11– Resultados das análises físicas e químicas do leite padronizado

Densidade	pH	Acidez titulável	Teor de lactose	Extrato Seco Total	Teor de Proteínas	Teor de gordura
1,0378	6,69	20,68°D	5,63%	10,03%	3,56%	0,66%

O teor de gordura do leite padronizado ficou ligeiramente acima do desejado, pois a quantidade de creme de leite adicionada ao leite desnatado visava a obtenção de um leite com 0,60% de gordura. A principal dificuldade deste tipo de padronização é a perfeita homogeneização da gordura acrescida ao leite, mesmo em quantidades pequenas como neste caso, porque a estrutura da emulsão, ou seja, a distribuição das micelas de gordura no leite natural, não é formada facilmente.

Bebida láctica fermentada com e sem açúcar.

Para a análise sensorial, a bebida fermentada, após resfriamento e homogeneização, foi acrescida de 10% de açúcar e caracterizada de acordo com os teores de gordura, proteínas, açúcares totais, além de pH e acidez titulável, no 1º dia após a fermentação.

Como o fermento utilizado contém microrganismos produtores de CO₂ (*Leuconostoc mesenteroides*) e este gás se transforma em ácido carbônico (H₂CO₃) consumindo parte da solução de hidróxido de sódio utilizada na titulação para a determinação de acidez, esta análise foi realizada duas vezes, uma antes e outra após 3 minutos de vigorosa agitação, para eliminação do gás e determinação da acidez real, ou seja, da acidez proveniente apenas do ácido láctico produzido na fermentação.

A presença do açúcar (sacarose) impede a determinação direta do teor de lactose, que pode ser então calculado a partir do teor de açúcares totais. Estes resultados estão na Tabela 12. Os teores de açúcares totais são inferiores aos 10% de açúcar adicionado porque este produto não é puro e contém um certo volume de água, que também provocou uma pequena diluição do *buttermilk*, observada na leve diminuição dos teores de proteína e gordura, quando comparamos a bebida com e sem açúcar.

Tabela 12 – Resultados das análises físicas e químicas da bebida fermentada com açúcar

Parâmetros	BTA 1D	BTA 7D	BTA 14D	BTA 21D	BTA 28D
PH	4,43	4,37	4,35	4,40	4,44
Acidez titulável total	92,26°D	98,43°D	102,09°D	102,06°D	104,43°D
Acidez titulável (após agitação)	92,26°D	93,56°D	95,28°D	96,43°D	96,63°D
EST	17,46%	-----	-----	-----	-----
Gordura	0,58%	-----	-----	-----	-----
Proteínas	3,66%	-----	-----	-----	-----
Açúcares totais	8,54%	-----	-----	-----	-----

BTA- Buttermilk produzido com fermento Tradicional e acrescido de Açúcar.

A partir dos valores obtidos, calculou-se o valor calórico do produto, que foi de 56,48 Cal por 100g de bebida.

Na bebida sem açúcar, foram mantidos os parâmetros anteriores e a análise dos carboidratos foi feita apenas através do teor de lactose que, neste caso, era o único açúcar presente. Para avaliar o aumento da acidez durante a estocagem, que determina a vida de prateleira dos produtos fermentados, foram determinados o pH, a acidez titulável total, a acidez titulável das bebidas e a lactose apenas na bebida sem açúcar (resultados Tabelas 12 e 13).

Tabela 13 – Resultados das análises físicas e químicas do *buttermilk* sem açúcar (BT)

Parâmetros	BT 1D	BT 7D	BT 14D	BT 21D	BT 28D
pH	4,50	4,43	4,40	4,46	4,48
Acidez titulável total	81,25°D	104,12°D	104,51°D	105,58°D	106,56°D
Acidez titulável (após agitação)	81,25°D	97,31°D	98,28°D	100,23°D	100,72
Lactose	4,80%	4,70%	4,43%	4,36%	4,37%
EST	9,79%	-----	-----	-----	-----
Gordura	0,67%	-----	-----	-----	-----
Proteínas	4,12%	-----	-----	-----	-----

O valor calórico da bebida sem açúcar, calculado a partir dos teores de proteínas, gordura e carboidratos, neste caso apenas a lactose, foi de 36,35 Cal/100g, um valor comparativamente inferior ao da bebida com açúcar (56,48Cal/100g).

5.6.2.3. Análises sensoriais da bebida com açúcar

A análise sensorial foi feita apenas com a bebida láctica com 10 % de açúcar, para avaliar o produto da maneira mais próxima aos hábitos do consumidor brasileiro, que costuma acrescentar muito açúcar aos iogurtes naturais.

Os resultados obtidos no teste de avaliação da aparência, aroma, sabor de diacetil, sabor ácido, sensação de frescor, cremosidade e corpo da amostra e as porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição, estão apresentados no Tabela 14.

Tabela 14 - Porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição da amostra de *buttermilk* para os atributos avaliados e valor médio atribuído a cada característica analisada (média)

Amostra de buttermilk	Aceitação (%)	Indiferença (%)	Rejeição (%)	Média
Aparência geral	94,0	0	6,0	7,1
Aroma	84,0	2,0	14,0	6,4
Sabor de diacetil	86,0	6,0	8,0	6,6
Sabor ácido	78,0	6,0	16,0	6,4
Sensação de frescor	88,0	8,0	4,0	6,9
Cremosidade	92,0	6,0	2,0	6,9
Corpo	88,0	4,0	8,0	6,8

A amostra de *buttermilk* analisada alcançou média correspondente à “gostei” para os atributos de aparência, sensação de frescor, cremosidade e corpo (valores médios atribuídos entre 6,9 e 7,1). Alcançou média entre “gostei pouco e gostei” para o atributo sabor de diacetil (6,6%) e média correspondente a “gostei pouco” para os atributos de aroma e sabor ácido (6,4%).

Observou-se que as maiores porcentagens de aceitação ao produto estão relacionadas aos atributos de aparência (94%) e cremosidade (92%). As maiores porcentagens de rejeição estão associadas aos atributos aroma (14%) e sabor ácido (16%).

5.6.3. Processamento final

Neste processamento, foi feita a comparação entre as bebidas fermentadas por microrganismos geneticamente modificados e não modificados. O fermento Probat 606 Visbycvac foi substituído pelo CH-N22 (Chr Hansen do Brasil, Valinhos, São Paulo) devido à maior disponibilidade do segundo fermento. Assim, foram usados os fermentos lácticos CH-N22, aqui denominado de Tradicional, e XF 12, aqui denominado de modificado.

5.6.3.1. Determinações microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas para avaliação de possíveis contaminações por coliformes, provenientes da água utilizada para a reconstituição de leite ou do açúcar usado na composição da bebida, assim como de bolores e leveduras, originados principalmente da contaminação ambiental, estão apresentados na tabela 15, que também inclui a contagem total de mesófilos.

Tabela 15 – Avaliação microbiológica da matéria prima e dos dois tipos de *buttermilk* produzidos

AMOSTRA / DIA	Coliformes Totais (NMP/ml)	Bolores e Leveduras (UFG/ml)	Contagem total de mesófilos (UFC/ml)
Leite padronizado	<0,3 NMP/ml	<10	0
BT - 1D	24 NMP/ml	$7,3 \times 10^1$	$3,6 \times 10^3$
BT - 14D	<0,3 NMP/ml	$7,4 \times 10^1$	$1,98 \times 10^4$
BT - 28D	<0,3 NMP/ml	1	$2,85 \times 10^3$
BTA-1D	46NMP/ml	0	$3,6 \times 10^3$
BTA- 14D	<0,3 NMP/ml	$4,7 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$
BTA- 28D	<0,3 NMP/ml	0	$4,15 \times 10^3$
BM – 1D	46 NMP/ml	0	3×10^3
BM – 14D	<0,3 NMP/ml	0	$3,6 \times 10^3$
BM – 28D	<0,3 NMP/ml	0	$3,6 \times 10^3$
BMA – 1D	240NMP/ml	0	$6,6 \times 10^3$
BMA – 14D	110NMP/ml	4	$4,0 \times 10^3$
BMA – 28D	21NMP/ml	1	$3,6 \times 10^3$

BT- *Buttermilk* produzido com fermento Tradicional

BTA – *Buttermilk* produzido com fermento Tradicional e com 10% de Açúcar

BM – *Buttermilk* produzido com fermento Modificado

BMA - *Buttermilk* produzido com fermento Modificado e com 10% de Açúcar

Como no processamento anterior, as contagens de coliformes totais foram maiores para as bebidas adicionadas de açúcar e também diminuíram durante a estocagem dos produtos, devido ao abaixamento do pH. Todos os tubos de Caldo Verde Brilhante positivos para coliformes fecais foram repicados em Caldo EC-MUG e incubados a 45°C para verificação de coliformes fecais e todos os resultados foram negativos. Tanto o *buttermilk* produzido com o fermento Tradicional quanto o produzido com o fermento Modificado estão dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

Para avaliar a proporção entre os microrganismos que compõem os dois fermentos no decorrer da estocagem foi feita uma contagem destes microrganismos em meio Nickels e Leesment modificado, que permite a diferenciação das três espécies (tabela 16).

Tabela 16 – Contagem diferencial

AMOSTRA/DIA	<i>Leuconostoc. sp</i> (verdes) (UFG/ml)	<i>Lac. diacetylactis</i> (brancas com halo) (UFG/ml)	<i>Lac. lactis</i> (brancas sem halo) (UFG/ml)
BT - 1D	$5,01 \times 10^9$	5×10^6	$1,4 \times 10^{10}$
BT - 14D	$5,87 \times 10^9$	4×10^5	$1,65 \times 10^7$
BT - 28D	$1,45 \times 10^7$	1×10^5	2×10^6
BTA- 1D	$2,95 \times 10^8$	5×10^6	$3,6 \times 10^{10}$
BTA- 14D	$3,14 \times 10^8$	5×10^5	$7,4 \times 10^9$
BTA -28D	1×10^7	$1,6 \times 10^5$	2×10^6
BM - 1D	$1,45 \times 10^{12}$	$2,3 \times 10^7$	$4,1 \times 10^9$
BM - 14D	9×10^9	$3,0 \times 10^6$	$2,67 \times 10^8$
BM - 28D	2×10^6	$2,2 \times 10^6$	1×10^7
BMA - 1D	1×10^{12}	3×10^7	$4,0 \times 10^9$
BMA - 14D	$8,2 \times 10^9$	5×10^6	1×10^7
BMA - 28D	$1,6 \times 10^6$	1×10^6	4×10^6

BT- Buttermilk produzido com fermento Tradicional

BTA – Buttermilk produzido com fermento Tradicional e com 10% de Açúcar

BM – Buttermilk produzido com fermento Modificado

BMA - Buttermilk produzido com fermento Modificado e com 10% de Açúcar

Comparando-se as contagens iniciais do *buttermilk* produzido com o fermento Probat 606 Visbyvac com as contagens iniciais dos fermentos CH-N22 e XF12, notou-se que o primeiro fermento apresenta uma contagem inicial bem maior, da ordem de 10^{16} UFC/mL de cada uma das 3 espécies que o compõem, enquanto que os outros dois têm contagem inicial da ordem de 10^9 , mas que decaem mais lentamente, chegando a uma contagem final ao redor de 10^6 , próximos ao do fermento Visbyvac e ainda dentro dos limites legais para este tipo de produto, indicando conterem linhagens um pouco mais resistentes à acidez inicial resultante da fermentação.

Creme de leite

O teor de gordura do creme de leite utilizado para a produção do *buttermilk* foi de 38,11%. Para preparo de 20 litros de leite com 0,6% de gordura, adicionaram-se 59,83 g do creme ao leite.

Leite Padronizado

O leite padronizado foi analisado quanto a sua densidade, pH, acidez titulável, extrato seco total, teor de proteínas, lactose e teor de gordura, este último para confirmação da correta adição de gordura, com os seguintes resultados (Tabela 17).

Tabela 17 - Resultados das análises físicas e químicas do leite padronizado

Densidade	PH	Acidez titulável	Teor de lactose	Extrato Seco Total	Teor de Proteínas	Teor de gordura
1,0290	6,70	20,54°D	5,43%	10,06%	3,65%	0,62%

Bebidas lácticas fermentadas com e sem açúcar.

As bebidas fermentadas, após resfriamento e homogeneização, foram divididas em dois grupos e a um deles foi acrescido 10% de açúcar. As quatro variantes do *buttermilk* (tradicional com e sem açúcar e modificada com e sem açúcar) foram caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, acidez titulável total e real, extrato seco total, proteínas totais, e açúcares totais para as amostras com açúcar e lactose para as sem açúcar. Os resultados dos testes físico-químicos das bebidas sem açúcar estão na tabela 18 e com açúcar na tabela 19.

Tabela 18- Resultados análises físicas e químicas das bebidas sem açúcar

Parâmetros	BT 1D	BT 14D	BT 28D	BM 1D	BM 14D	BM 28D
pH	4,55	4,38	4,36	4,58	4,39	4,40
Acidez titulável total	76,8°D	79,8°D	85,0°D	79,0°D	80,5°D	87,4°D
Acidez titulável (após agitação)	73,5°D	77,8°D	82,4°D	77,5°D	77,7°D	78,3°D
EST	9,53%	-----	-----	8,64	-----	-----
Gordura	0,63%	-----	-----	0,58	-----	-----
Proteínas	3,39%	-----	-----	3,19	-----	-----
Lactose	4,59%	4,52%	4,46%	4,80%	4,27%	4,26%

Tabela 19- Resultados análises físicas e químicas das bebidas com açúcar

Parâmetros	BTA 1D	BTA 14D	BTA 28D	BMA 1D	BMA 14D	BMA 28D
pH	4,63	4,35	4,32	4,51	4,40	4,40
Acidez titulável total	77,6°D	80,5°D	80,03°D	80,5°D	82,8°D	83,3°D
Acidez titulável (após agitação)	75,1°D	77,6°D	78,2°D	77,0°D	79,4°D	79,9°D
EST	16,84%	-----	-----	18,14%	-----	-----
Gordura	0,58%	-----	-----	0,53%	-----	-----
Proteínas	3,08%	-----	-----	3,03%	-----	-----
Açúcares totais	7,72%	-----	-----	6,04%	-----	-----

Os microrganismos fermentadores consumiram 15,47% da lactose presente no leite no processo de fermentação da bebida tradicional e 11,6% na bebida produzida com microrganismos geneticamente modificados. Durante o período de estocagem, o consumo de lactose pelo fermento Tradicional chegou a 17,86% e do Modificado a 21,55% do total de lactose presente no leite padronizado. Estes valores estão entre 10 e 30%, portanto, dentro dos parâmetros de consumo de lactose durante a fermentação e estocagem refrigerada de iogurtes, citados pela literatura por Galvão *et al* (1995).

O consumo de lactose foi acompanhado de uma diminuição do pH e aumento da acidez titulável total e real, além dos compostos aromáticos que dão o sabor característico do *buttermilk*.

Comparativamente, a quantidade de diacetil produzida pelo fermento Modificado é 114% maior que a produzida pelo fermento tradicional. No decorrer do período de estocagem, a concentração de diacetil na bebida tradicional decai até limites não detectáveis pelo método usado e da bebida modificada aumenta quase 9,5 vezes o valor inicial (tabela 21).

Tabela 20 - Quantidade de diacetil presente nas amostras de leite *Buttermilk* Tradicional e Modificado no primeiro dia após o processamento e com 28 dias de estocagem.

Amostras	Quantidade de diacetil (mg/L)*		
	M	DP	IV
Buttermilk M 1D	1,82	0,52	1,37 – 2,40
Buttermilk T 1D	0,85	0,19	0,73 – 1,06
Buttermilk M 28 D	17,36	0,24	17,13 – 17,60
Buttermilk T 28 D	< 0,4	**	**

M=média, DP= desvio-padrão, IV=intervalo de variação

* Valores referentes a três determinações

Este aumento significativo do diacetil pode ser explicado pela ausência da enzima redutase que transforma irreversivelmente o diacetil em 2,3 butanodiol, produzido principalmente por *Leuconostoc*., que deve ser uma linhagem diferente da utilizada no fermento tradicional. Sabe-se que uma das estratégias usadas por algumas empresas com o objetivo de aumentar e estabilizar o sabor e aroma do *buttermilk* durante sua estocagem visava justamente o isolamento de linhagens de *Leuconostoc* com atividade de diacetil redutase fortemente atenuada, com o uso de técnicas de mutagênese clássica (Henriksen *et al.*, 1999).

5.6.3.3. Análises sensoriais das bebidas com açúcar

Para a análise sensorial, adicionou-se 10% de açúcar às bebidas produzidas com os fermentos Tradicional e Modificado, após resfriamento e homogeneização. A avaliação sensorial foi realizada no 1º dia após a fermentação.

Os resultados obtidos no teste de avaliação de aceitação, indiferença e rejeição da amostra de *buttermilk* para os atributos avaliados estão apresentados na tabela abaixo (tabela 21) e gostos e desgostos nas tabelas 22 e 23.

Tabela 21 – Porcentagens de aceitação, indiferença e rejeição das amostras de *buttermilk* avaliadas

Atributos Sensoriais	Aceitação (%)		Indiferença (%)		Rejeição (%)	
	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado	Tradicional	Modificado
Aparência geral	90	88	2	4	2	0
Aroma	82	88	8	2	10	10
Sabor de diacetil	84	72	8	4	8	24
Sabor ácido	80	74	6	10	14	16
Sensação frescor	78	78	14	6	8	16
Creiosidade	92	84	2	4	6	12
Corpo	90	72	6	12	4	16
Aceitação Geral	90	72	4	8	6	20

Tabela 22 - Gostos apresentados pelos consumidores em relação à amostra de *buttermilk* (números indicam frequência com que foram citados).

Gostos	Frequência	
	Tradicional	Modificado
Aparência e cor	10	10
Aroma	5	13
Sabor de diacetil	2	2
Sabor ácido	5	4
Frescor	7	3
Creiosidade	8	5
Corpo	3	1

Tabela 23 - Desgostos apresentados pelos consumidores em relação à amostra de *buttermilk* (números indicam frequência com que foram citados).

Desgostos	Frequência	
	Tradicional	Modificado
Aparência e cor	2	3
Aroma azedo	5	3
Sabor ácido	10	11
Creiosidade	2	0
Corpo	2	3
Presença de grumos	13	8

Observou-se que a amostra de *buttermilk* Tradicional diferiu da amostra de *buttermilk* Modificado quanto à aceitação do sabor de diacetil, sabor ácido, corpo e aceitação geral, e alcançou médias mais altas entre “gostei pouco e gostei” para todos os atributos. O *buttermilk* Modificado alcançou médias correspondentes a “gostei pouco” para os atributos sabor de diacetil, sabor ácido, frescor, corpo e aceitação geral. Em relação ao sabor ácido, através das análises físico-químicas de acidez titulável, observou-se que o *buttermilk* Modificado tinha uma acidez um pouco maior (2°D), que o Tradicional, diferença que foi notada pelos provadores (tabela 19).

A concentração de diacetil no primeiro dia após a fermentação era 114% maior no *buttermilk* Modificado em relação ao Tradicional, o que deve ter contribuído para maior aceitação de seu aroma, mas ao mesmo tempo diminuiu a aceitação quanto ao sabor de diacetil (tabela 21).

As maiores porcentagens de aceitação ao produto estão relacionadas aos atributos de aparência, corpo e aceitação geral (90%) e creiosidade (92%) para o *buttermilk* do tipo Tradicional. As maiores porcentagens de rejeição estão associadas aos atributos de sabor de diacetil (24%) do *buttermilk* produzido com o fermento Modificado.

A diferença de cremosidade notada pelos provadores entre os dois produtos pode ser decorrente da maior produção de exopolissacarídeos no *buttermilk* Tradicional. A sensação de frescor é dado pelo diacetil, cuja concentração no *buttermilk* Tradicional era suficiente para ser notada pelos provadores, mas muito alta no produto fermentado pela cultura láctica Modificada.

De modo geral, pode-se afirmar que os pontos fortes do *buttermilk* Tradicional são a cremosidade e a sensação de frescor, os quais foram apontados com maior frequência pelos consumidores. Os pontos fracos são o aroma azedo e sabor ácido e presença de grumos de gordura na superfície da amostra.

A presença de glóbulos de gordura na superfície do produto foi devida a dificuldades na incorporação do creme para padronização do leite utilizado como matéria prima para a produção da bebida. Este problema pode ser solucionado com aperfeiçoamento da metodologia de padronização ou com a obtenção de um leite previamente padronizado.

A partir dos resultados da análise sensorial, pode-se concluir que o elevado teor de diacetil do *buttermilk* Modificado não agradou e que os atributos de cremosidade e sensação de frescor, que também é dado pelo diacetil, são os pontos fortes desta bebida e que devem ser valorizados no possível deste produto no mercado brasileiro.

A acidez dos leites fermentados naturais sem açúcar ou outros aromatizantes, limita a aceitação do consumidor, pois estes tipos de produtos não fazem parte da dieta básica normal da maioria dos consumidores, exceto em algumas regiões do Norte da Europa. No entanto, a adição de aromatizantes dificulta a percepção do sabor de diacetil, enquanto que os leites fermentados naturais permitem que o sabor de diacetil seja percebido mais intensamente.

O aumento do consumo de iogurtes e leites fermentados fora destas regiões específicas da Europa ocorreu quando se passou a utilizar frutas e/ou flavorizantes, gerando uma grande diversidade de produtos e aumentando a popularidade deste tipo de alimento (Tamime, 1999).

A popularização dos leites fermentados nos Estados Unidos ocorreu a partir dos anos 50, quando a indústria de laticínios passou a produzir uma maior variedade de produtos adicionados de açúcar, frutas e outros aromas. Além disto, foram feitas campanhas estimulando o consumo deste tipo de produto, ressaltando suas qualidades nutricionais e benefícios à saúde, principalmente direcionadas ao público jovem, com lançamento de produtos com baixos teores de gordura e contínuas pesquisas e desenvolvimento de produtos buscando suprir as necessidades e preferências dos novos consumidores (Tamime, 1999).

Assim, para que o *buttermilk* seja aceito pelos consumidores brasileiros, há necessidade de adição de polpas de frutas ou aromatizantes. Para determinação da melhor formulação do *buttermilk* para a aceitação pelo consumidor brasileiro, novos processamentos deverão ser feitos, como continuação deste trabalho nos laboratórios do TECNOLAT, ITAL.

6. CONCLUSÕES

As dificuldades de classificação taxonômica ocorridas na primeira etapa deste trabalho (seleção e identificação de microrganismos produtores de diacetil) demonstram que as informações utilizadas na taxonomia tradicional, como características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas obtidas das culturas puras, não são suficientes para definir uma espécie.

Em relação à verificação da homologia através de técnicas de biologia molecular, a proximidade observada entre as linhagens estudadas (Q1 a Q9) não correspondeu às diferenças observadas em relação à capacidade de produção de diacetil, pois a linhagem Q1, por exemplo, produz uma quantidade maior de diacetil, apesar de ser muito próxima das outras linhagens que não produzem tanto deste composto.

A linhagem de *E. faecium* Q-1 isolada de Queijo Minas Frescal artesanal, que produz diacetil em quantidades próximas às do fermento comercial Tradicional utilizado na produção de *buttermilk*, não é patogênica e, portanto, tem potencial de aplicabilidade na indústria de laticínios. Em relação a aceitação da bebida láctica tipo *buttermilk*, a partir dos resultados da análise sensorial, pode-se concluir que o maior teor de diacetil não agradou aos componentes do painel de testadores, que não têm como hábito o consumo de leites fermentados naturais, sem adição de açúcar ou outros aromatizantes, como ocorre em algumas regiões da Europa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G.H. The determination of lactose in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 32, n. 2, p.11, 1977.

ANDERSON, A W; ELLIKER, P.R. The nutritional requirements of lactic *streptococci* isolated from starter cultures: I. Growth in a synthetic medium. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 161-167, 1953.

AOAC: OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNACIONAL. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980.

BENSON, K.K.; GODON, J.J.; RENAULT, P.; GRIFFIN, H.G.; GASSON, M. Effect of *ilbB*-encoded α -acetolactate synthase expression on diacetyl production . *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 107-111, 1996.

BOLOTIN, A.; MAUGER, S.; MALARME, K.; EHRLICH, S.D.; SOROKIN, A. Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p. 27-76, 1999.

BORTOLETO, E. E. **Leite. Prognóstico Agrícola**, São Paulo, v. 2, p. 221-228, 1998.

COCAIGN-BOUSQUET, M. *et al.* **Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis***. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 70, n. 2/4, p. 253-267, 1996.
BENSON, K.K.; GODON, J.J.

COCAIGN-BOUSQUET, M. *et al.* Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 108-116, 1995.

CURIC, M. **Improving and stabilizing aroma in fermented dairy products**. Denmark: Departament of Biotechnology - Technical University of Denmark, 1998. ISBN 87-88584-52-6.

CURIC, M. *et al.* A general method for selection of α -acetolactate decarboxylase deficient mutants of *Lactococcus lactis* to improve diacetyl formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1202 -1206, 1999.

DELORME, C.; EHRLICH, SD; RENAULT, P. Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis*: Histidine biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 14, p. 4391-4399, 1992.

DESMASURES, N. *et al.* Characterization of *lactococci* isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. **Journal of Applied Microbiology**. v. 85, p.999 - 1005, 1998.

DESMAZEAUD, M.J.; ROISSART, H. Metabolisme générale des bactéries lactiques. In: Roissart, H. & Luquet, F.M. **Bactéries Lactiques**. Loriga, Uriage: France, p. 169- 204, 1994.

DE VOS, W.M. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, p. 223-242, 1996.

DE VOS, W.M. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 3-10, 1999.

DE VOS, W.M. Engineering lactococci for industrial applications. **Tecnologia Láctea Latinoamericana**, n. 7, p. 35 -39, 1997.

DE VOS, W.M. *et al.* Making more of milk sugar by engineering lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 27-233, 1998.

DICKELY, F. *et al.* Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 839 - 847, 1995.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

FERREIRA, A.C. In: **Leites fermentados e bebidas lácticas - tendências mercadológicas de produtos lácteos fermentados e bebidas lácteas**. Centro de Tecnologia de Laticínios. ITAL, Campinas. p. 7.21-7.40, 1997.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci at crossroads of foods safety? **International Journal of Food Microbiology**. V. 47, p. 1-24, 1999.

FURTADO, Múcio Mansur. Defeitos da fabricação de queijos. In: SEMINÁRIO SOBRE DEFEITOS DE QUEIJOS, 1987, Campinas, **Anais...** Campinas: TECNOLAT/ITAL, 1987. cap. IV. 142-143 p.

GALVÃO; L.C.; FERNANDES, M.I.M.; SAWAMURA, R. Conteúdo de lactose e atividade de β -galactosidase em iogurtes, queijos e coalhadas produzidos no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.32, n.1, p.8-14, 1995.

GASSON, M.J.; De Vos, W.M. **Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. London: Chapman & Hall, 1994.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. *Enterococci* Isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v.60, n. 6, p.732-738, 1997.

GODON, J.J.; CHOPIN, M.C.; EHRLICH, S.D. Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6580-6589, 1992.

GODON, J.J. *et al.* Gene inactivation in *Lactococcus lactis*: Branched-chain amino acid biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 14, p. 4383-4390, 1993.

GOMEZ, M. J. *et al.* Characteristics of manchego cheese manufactured from raw and pasteurized ovine milk and with defined-strain or commercial mixed-strain starter cultures. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 2300-2307, 1999.

GOUPIL, N. *et al.* Imbalance in leucine flux and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2636-2640, 1996.

GOUPIL-FEULLERAT, N. *et al.* Dual role of α -acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 6285 - 6293, 1997.

HARRIGAN, W.F.; MAC CANCE, M.E. **Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology**. London: Academic Press, 1976, 452p.

HENRIKSEN, C.M. *et al.* Industrial applications of genetically modified microorganisms: gene technology at Chr. Hansen A/S. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 17-23, 1999.

HUGENHOTZ J.; PERDON, L.; ABEE, T. Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* during citrate metabolism. **Applied Environment Microbiology**, v. 59, p. 4216-4222, 1993.

HUGENHOLTZ, J.; STARENBURG, M.J.C. Diacetyl production by different strains strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc* ssp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 17-22, 1992.

HUGENHOTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, v. 12, p. 165-178, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. , São Paulo. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 1985. 371p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total solids content of cheese and processed cheese**. Belgium: FIL/IDF, 1982. 2p. (FIL/IDF, 4 A).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the nitrogen content of milk by Kjeldahl method**. Belgium, FIL/IDF, 1962, 3p. (FIL – IDF, 40).

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman & Hall . cap.7, 6 ed, 2000, _____. Food preservation with chemicals. In: **Modern food microbiology**, 6. ed. Aspen: Gaithersburg, 2000. cap. 13, p. 253. p.113- 130.

_____. **Modern Food Microbiology**. New York: Chapman & Hall . cap.20, 6 ed, 2000, p.395-398.

JENSEN, PR; HAMMER, K. Minimal requirements for exponential growth of *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4363-4366, 1993.

KNEIFEL, W. Screening of commercially available mesophilic dairy starter cultures: biochemical, sensory, and microbiological properties. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 11, p. 58-3166, 1992.

KONINGS, W.N. *et al.* **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. Dordrech: Kluwer Academic, 1999. p. 27-76.

KURMANN, J.A. The production of fermented milks in the world: aspects of the production of fermented milks . **IDF Bulletin**, v. 179, p. 16-26, 1984.

KURMANN, J. A.; RASIC, J.Y. ; KROGER, M. **Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk whey, and related products**. New York: AVI Book, 1992. p. 34 –35.

LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, DF, 1981. VII. Métodos físicos e químicos, p. 1- 4.

LERAYER, A.L.S.; BROLAZO, E.; TALEB, O. *Buttermilk*: Uma Alternativa para o Setor de Leites Fermentados e Bebidas Lácticas. **Indústria de Laticínios**. Jan/fev, p. 50-53, 2001.

MANGIN, I. *et al.* Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p. 514-520, 1999.

MANZIONE, S.; Economia. Preços aumentam e vendas caem. **Indústria de Laticínios**, Jan/fev, p. 8-9, 1998.

MARSHALL, V.M. Fermented milks and their future trends. Part I Microbiological aspects. **Journal of Dairy Reserch**, v. 54, p. 559- 574, 1987.

MARSHALL, V.M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **Journal of the Dairy Technology**, v. 46, n. 2, p. 49-56, 1993.

MARUGG, J.D. *et al.* Identification and characterization of the α -acetolactate synthase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1390-1394, 1994.

MEILGAARD, M *et al.* **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press,, v. 1 e2; 1987.

MONNET, C.; SCHMITT, P.; DIVIÈS C. Diacetyl production in milk by α -acetolact acid accumulating strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 2916-2924, 1994.

MORENO, I., VALLE, J.L.E, GARCIA, S., Van DENDER, A .G.F. Isolamento e Seleção Tecnológica de *Streptococcus cremoris* a partir de leite cru. **Boletim ITAL**, v. 23, p. 409-424, 1986.

MUNDT, O. Genus *Streptococcus*. In SEMATH, P.H.A .**Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians & Walkins, v. 2, 1986, 1599p.

NOVAK, L. *et al.* Cométabolisme sucre-acides aminés chez *Lactococcus lactis*. **Le Lait**, v. 78, p. 17-22,1998.

NURSTEN, H. E. The flavour of milk and dairy products: I. Milk of different kinds milk powder, butter and cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 2, p .49-56, 1997.

PARADA, J.L. Genética microbiana para o melhoramento de bactérias lácticas utilizadas na indústria láctea. In: AZEVEDO, J.L., ed. **Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética**. Piracaba: FEALQ, 1985. p.121-129.

PITCHER, D.G., SAUNDERS, N.A ., OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PLATTEUW, C. et al. Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: influence of the overproduction of acetolactate synthase in strains deficient in lactate dehydrogenase as a function of culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3967-3971, 1995.

POOLMAN, B. Energy transduction in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 12, n. 1/3, p. 125-147, 1993.

PRIEST, F., AUSTIN, B.; **Modern Bacterial Taxonomy**. 2.ed. London: Chapman & Hall. Cap.1, p.1-13 ; Cap.2, p.14-49, 1993.

RICHELIEU, M.; HOULBERG, U.; NIELSEN J.C. Determination of α -acetolactic and volatile compounds by headspace gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, n. 80, p. 1981-1925, 1997.

ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology – the microbiology of milk products**. 2.ed. v.2 London: Elsevier Applied Science, cap.4, p.131-191, 1990.

SALMIEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria**. New York: Marcel Dekker. Cap 1, p.1-63. 1993.

SNOEP, J.L. *et al.* Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 838-841, 1992.

TAMINE, A. J. ; K., ROBINSON, R. Historical background. In: **Yoghurt science and technology**, 2.ed. Boca Raton: CRC, 1999. cap.1 , p. 1.

_____. Background to manufacturing practice. In: **Yoghurt science and technology**, 2. ed. Boca Raton: CRC, 1999. cap. 2, p. 11.

_____. Processing plants and equipment. In: **Yogurt science and technology**, 2. ed. Boca Raton: CRC, 1999. Cap. 3, p. 129.

_____. Traditional and recent developments. In: **Yoghurt science and technology**, 2 ed. Boca Raton: CRC, 1999. Cap 5, p. 306.

_____. Quality control in yoghurt manufacture. In: **Yoghurt science and technology**, 2. ed. Boca Raton: CRC, 1999. Cap. 10, p. 535.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3.ed. Washington DC: American Public Health Association. cap.4, 1992, 400p.

VOLGENSEN, F.K. Improved direct differentiation between *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis, and *Streptococcus cremoris*/ *Streptococcus lactis* on agar. **Milchwissenschaft**, v. 42, n. 10, p.646-648, 1987.

WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional. v.2, 1995.

8. ANEXOS

ANEXO I

Pôster apresentado no 4º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos - Novembro de 2001.



CARACTERIZAÇÃO DE ENTEROCOCOS PRODUTORES DE DIACETIL ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL ARTESANAL

BROLAZO, E., LERAYER, A. L. S., MORENO, I., GRAEL E.T.M., RABELO, C. R., MANFIO, G.
Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) - Av. Brasil, 2880 - Campinas, SP - Brasil
*email: ebrolazo@zipmail.com.br

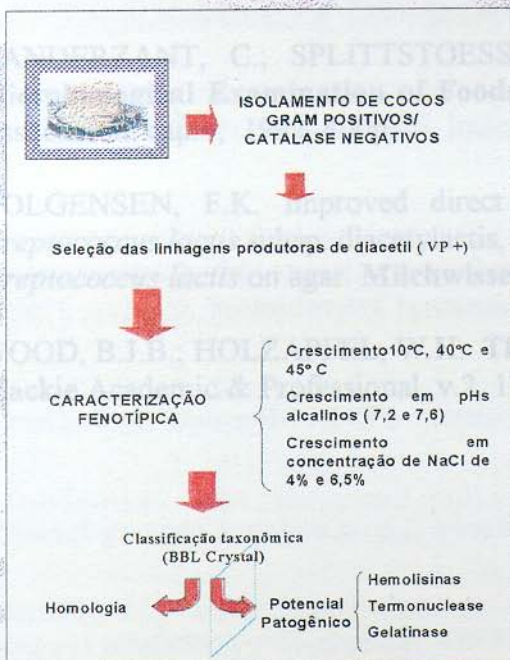
1. INTRODUÇÃO

- As linhagens de bactérias lácticas produtoras de diacetil, um composto volátil aromático, são responsáveis pela fermentação da lactose e produção de compostos que proporcionam as características de aroma típicas de leites fermentados e queijos.
- A espécie *Enterococcus faecium*, tem sido frequentemente isolada de queijos tradicionais europeus com Registro de Designação de Origem. Este grupo de microrganismos Gram-positivos coloniza vários ecossistemas, incluindo o leite e o intestino humano e de animais domésticos.
- Os enterococos não são considerados pertencentes ao grupo de bactérias lácticas contudo eles têm sido utilizados como adjunto à cultura *starter*, contribuindo para o desenvolvimento das características organolépticas típicas de alguns tipos de queijos.

2. OBJETIVOS

- Isolamento e caracterização bioquímica dos microrganismos produtores de diacetil presentes em amostras de queijos Minas Frescal artesanais.
- Análise de homologia de DNA e do potencial patogênico das linhagens de enterococos isoladas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS



PALAVRAS-CHAVE: enterococos, diacetil, fatores de patogenicidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Foram isoladas 9 linhagens de *Enterococcus faecium*, identificadas com o sistema enzimático "BBL Crystal Gram-Positive" (Becton Dickinson) e denominadas como Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8 e Q9.
- Analisou-se o potencial patogênico das linhagens quanto à produção de enzimas que permitem efeitos patológicos no hospedeiro como gelatinase, termonucleases (DNases) e hemolisinas (EATON & GASSON, 2001; GIRAFFA, 1997). Os resultados foram negativos para produção de gelatinase e termonuclease e foi observada a produção de α -hemólise (considerada normal em enterococos não patogênicos).



FIG. 1: - A esquerda, atividade negativa de gelatinase em *E. faecium* em Gelatina Nutriente. A - *E. faecium* - ausência de hidrólise e liquefação da gelatina com as 9 linhagens B - *B. cereus* (cont. positivo) - hidrólise e liquefação da gelatina.

A direita, reação negativa de termonuclease por *E. faecium* em Bacto DNase Test com azul de toluidina. + *S. aureus* - controle positivo: produção de termonuclease - halo rosa, - *S. epidermidis* - cont. negativo ausência de halo, 1 a 9 - linhagens de *E. faecium*

- Teste de homologia de DNA foi realizado com os primers REP, ERIC e BOX (Pharmacia) confirmando que se tratavam de 9 diferentes linhagens de *E. faecium* pela análise do dendograma (software Gene Compare (Applied) (PITCHER et al. 1999 e MANGIN et al. 1999).



FIG 2: - Dendrograma de Homologia de DNA das linhagens de *E. faecium* (Q1; Q2; Q3; Q4; Q5; Q6; Q7; Q8; Q9). 1. *Lc. Lactis* subsp. *lactis*; 2. Q1; 3. Q5; 4. Q2; 5. Q8; 6. Q6; 7. Q7; 8. Q9; 9. Q4 e 10. Q3.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEMOSIES, N.; MAEN, I.; CECILIE, D.; FENRT, A., GREEN, L. *Appl Microbiol*, v. 6, n. 4, p. 166, 1997.
- EATON, G. & GASSON, M. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, v. 6, n. 4, p. 166, 1997.
- GRAEL, G.; CERNAT, D.; NEVALE, J. *Food Res. Int.*, v. 6, n. 2, p. 139, 1997.
- HARRIS, W.F. & MCCONE, M.E. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 19, p. 1, 1994.
- PITCHER, D.G.; SANDERSON, C. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 9, p. 139, 1992.

Apoio FAPESP

ANEXO II

Pôster apresentado no 26th IDF World Dairy Congress – Congrilait – Paris,
24-27 September 2002.

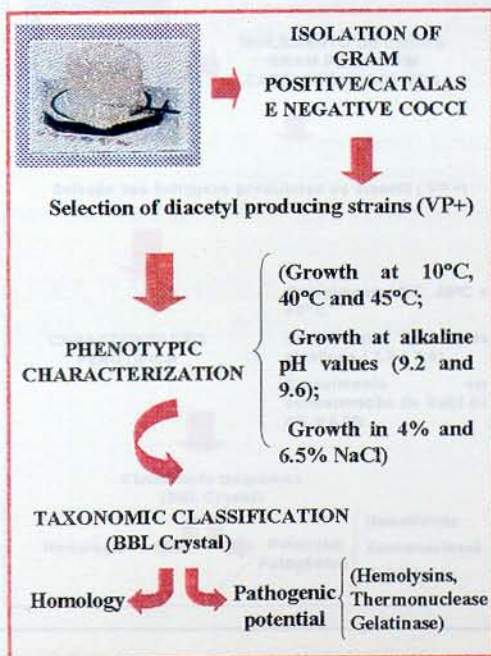
1. INTRODUCTION

- > Lactic bacteria producing diacetyl, a volatile aromatic compound, are responsible for the fermentation of lactose and the production of other substances conferring rheological and sensory characteristics typical of fermented milks and cheeses.
- > Although not classified in the lactic group, the enterococci have been used as adjuncts in lactic fermentations, contributing to the development of the typical characteristics of some types of cheese.
- > The species *Enterococcus faecium* has frequently been isolated from traditional European cheeses with Designated Origin Register. This group of Gram positive microorganisms colonize various ecosystems, including those of milk and the intestines of humans and domestic animals.

2. OBJECTIVES

- > The isolation and biochemical characterization of diacetyl producing microorganisms present in samples of fresh Minas type cheeses produced by artisans.
- > The analysis of DNA homology and pathogenic potential of the isolated strains of enterococci.

3. MATERIALS & METHODS



4. RESULTS AND DISCUSSION

- > 9 strains were isolated and classified as *E. faecium* from their phenotypic characterization and use of the 'BBL Crystal Gram-Positive' enzyme system (Becton Dickinson) and denominated as Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8 and Q9.
- > The pathogenic potential of the strains was analyzed with respect to the production of enzymes causing pathological effects on the host, such as gelatinase, thernonucleases (DNases) and hemolysins (Eaton & Gasson, 2001; Giraffa, 1997). The results were negative for the production of gelatinase and thernonuclease. The production of α -hemolysis was similar to non-pathogenic enterococci.



Fig. 1



Fig. 2

Fig. 1: - (A) Negative activity for gelatinase in *E. faecium* - absence of hydrolysis and liquefaction of gelatin (B) - *B. cereus* (positive control) - hydrolysis and liquefaction of gelatin.

Fig. 2: - Negative reaction for thernonuclease by *E. faecium* in Bacto Dnase Test with toluidine blue. (+) *S. aureus* - positive control for production of thernonuclease visualized by formation of pink halo; (-) *S. epidermidis* - negative control, absence of halo; 1 to 9 - strains of *E. faecium*.

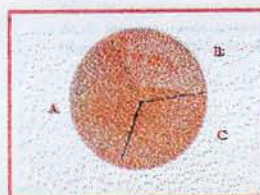


Fig. 3. Hemolysis halo produced by *E. faecium* strains in blood agar: (A) Partial α -hemolysis presented by the nine isolated strains; (B) positive control for β -hemolysis - *S. aureus*; (C) negative control for hemolysis - *Lactococcus lactis*.



Fig. 3: - DNA homology dendrogram of *E. faecium* strains (Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9). 1. *Lc. Lactis* subsp. *Lactis*; 2. Q1; 3. Q5; 4. Q2; 5. Q8; 6. Q6; 7. Q7; 8. Q9; 9. Q4 and 10. Q3.

- > The test for DNA homology was carried out by an analysis of the dendrogram (Gene Compare software, Applied) with the primers REP, ERIC and BOX (Pharmacia), confirming that they were 9 different strains of *E. faecium* (PITCHER *et al.*, 1999 and MANGIN *et al.* 1999).