


LAN2690
22 de Agosto de 2016

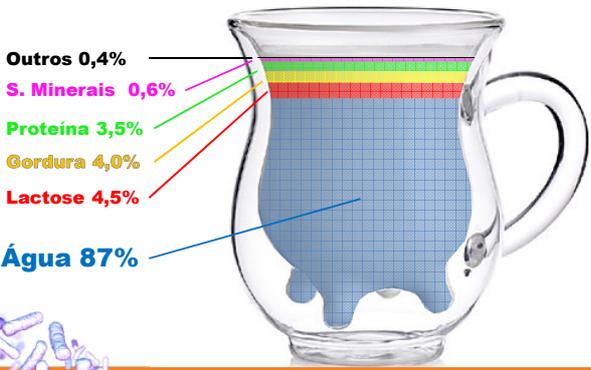

Microbiologia do Leite II

“Bactérias lácticas e Cultura Starter”

Bruno D. Galli

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Leite



- Outros 0,4%
- S. Minerais 0,6%
- Proteína 3,5%
- Gordura 4,0%
- Lactose 4,5%
- Água 87%

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Produtos originados

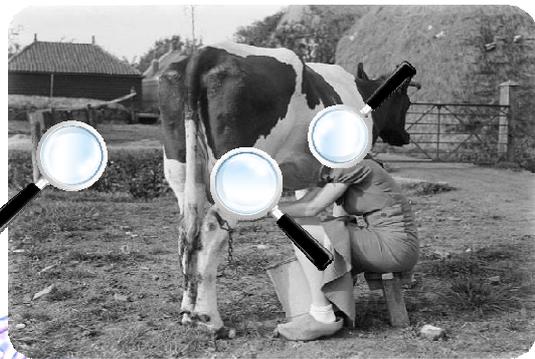


Benéficas ou não?

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)



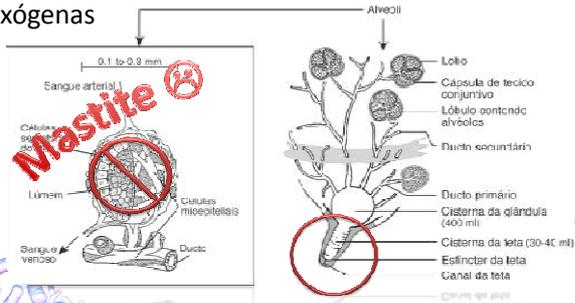
Origem das BAL



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Origem das BAL

- Endógenas
- Exógenas



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

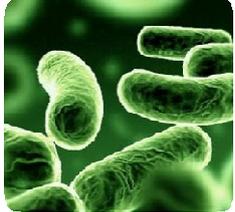
- UFC/g inicial: $\leq 10^3$
- Após ordenha: $10^4 \sim 10^6$
- Mastite: 10^7




LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

BAL – Bactérias ácido lácticas

- **BAL ou LAB**
 - Anaeróbios aerotolerantes
 - Fermentadoras de hexoses
 - Gram-positivas
 - Não formadoras de esporos
 - Não móveis
 - Não redutoras de NO_2 e NO_3
 - Catalase negativas




LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

- **12 Gêneros**
 - *Aerococcus*
 - *Alloicoccus*
 - *Carnobacterium*
 - *Enterococcus*
 - *Lactobacillus*
 - *Lactococcus*
 - *Leuconostoc*
 - *Pediococcus*
 - *Streptococcus*
 - *Tetragenococcus*
 - *Vagococcus*
 - *Weisella*





LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Metabolismo das BAL

- Metabolismo de proteínas
- **Metabolismo da lactose**
- Metabolismo piruvato
- Metabolismo de citrato

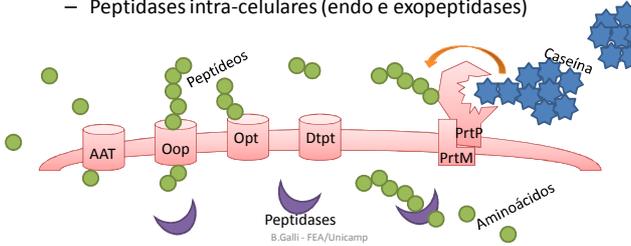
Contidas no mesmo processo




LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

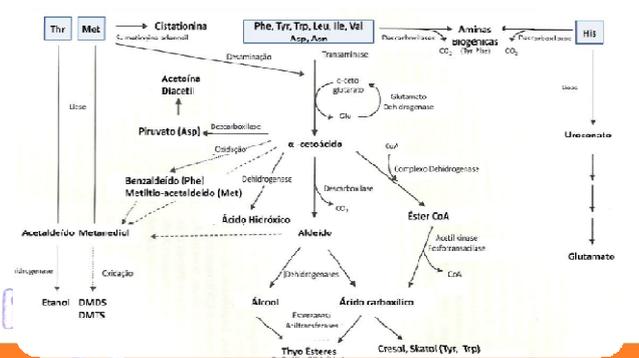
Metabolismo de proteínas

- Divide-se em 3 sistemas:
 - Proteinase externa ligada à membrana
 - Transportadores de di-, tri- e oligopeptídeos
 - Peptidases intra-celulares (endo e exopeptidases)



B.Galli - FEA/Unicamp

- Vias Catabólicas dos principais aminoácidos envolvidos na produção dos compostos aromáticos



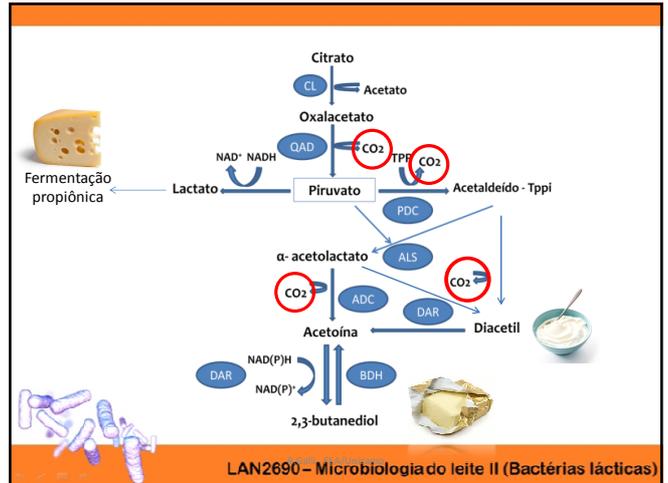
LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Metabolismo citrato / piruvato

- Ácido cítrico no leite -> 130~160 md por 100ml
 - Nem todas BAL tem capacidade
 - Transporte feito por permeases da membrana
 - Citrato é convertido em piruvato no interior das células
 - Produz compostos de 4 carbonos, Lactato, CO₂ e +
 - Diacetil, Acetoína, Butanediol e Acetaldeído



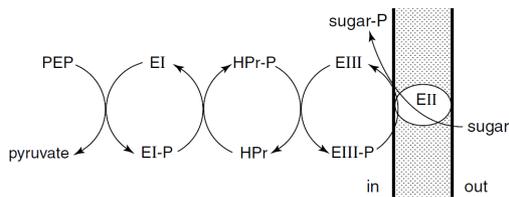
LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Fermentação da lactose

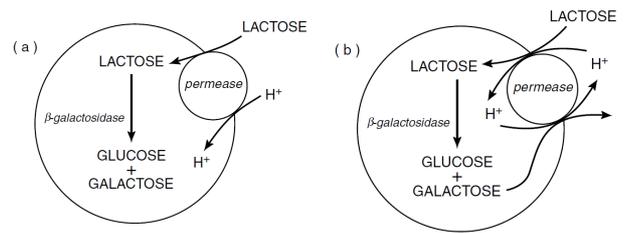
- Transporte 1 → Sistema fosfotransferase



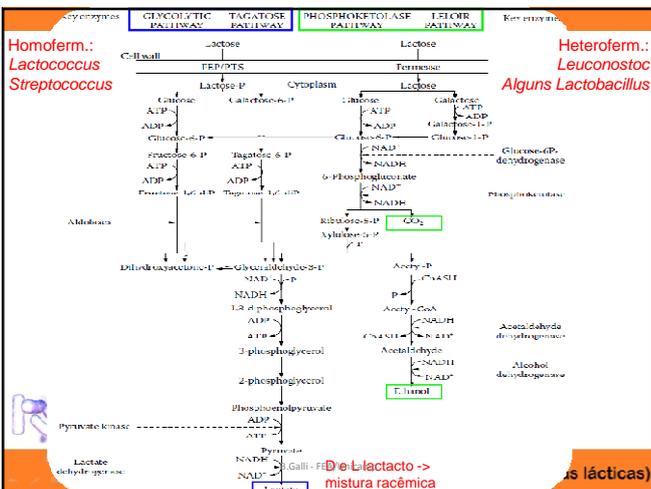
Walstra et al. Dairy Science and Technology, 2006

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

- Transporte 2 → Permease



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)



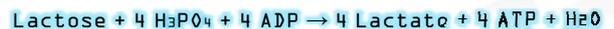
Homoferm.:
Lactococcus
Streptococcus

Heteroferm.:
Leuconostoc
Alguns Lactobacillus

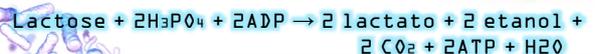
as lácticas)

Principais metabólitos produzidos

- Homofermentativa (F. homolática)**
 - Ác. láctico



- Heterofermentativa (F. heterolática)**
 - ácido láctico, dióxido de carbono (olhaduras), etanol, ácidos graxos de cadeia curta, acetaldeído e diacetil.



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Produção de exopolissacarídeos (EPS)

- 3 tipos importantes produzidos por BAL:
 - Biofilmes** ☹️
 - Ingurte firme** ☹️
- α -glucanas
 - Leuc. mesenteroides*
 - Leuc. m. subsp. dextranica*
- Fructanas
 - Streptococcus salivarius*
- Heteropolissacarídeos
 - Lc. lactis subsp. lactis* e *Lc. lactis subsp. cremoris*
 - Lb. delbruecki subsp. bulgaricus*, *Lb. helveticus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*



(Pham et al., 2000).

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Atividade antimicrobiana

- Abaixamento de pH
 - interferem na força promotora e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana (Davidson, 1997)
- Acetaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, polissacarídeos e bacteriocinas
 - Peróxido ativa sistema lactoperoxidase do leite → hipotiocianato



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas e que apresentam amplo espectro de atividade

Espécie produtora	Bacteriocina	Espectro de Atividade
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Nisina	Bactérias Gram-positivas
	Lacticina 481	<i>Clostridium</i>
	Bacteriocina V e VII	<i>Clostridium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina F	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. curvatus</i>	Curvacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>L. carnis</i>	Bacteriocina S	<i>Enterococcus</i>
		<i>Listeria</i>
<i>L. sake</i>	Sakacina A	<i>Enterococcus sp.</i>
	Sakacina P	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	Bacteriocina	<i>Clostridium ramosum</i> H1
<i>Leuconostoc</i>	Leucocina A-UAL 187	<i>Listeria monocytogenes</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroide</i>	Mesenterocina 5	<i>Listeria monocytogenes</i>
	Mesenterocina Y105	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediacina A	Bactérias Gram-positivas
<i>Pediococcus</i>	Pediacina PA1	<i>Listeria monocytogenes</i>

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Características específicas

Nome	Tipo	Ferment	Isômero lactato	Cit+	Gli+	Gal+	Lac+	Man+	Cresc. 15°C	Cresc. 45°C
<i>S. thermophilus</i>	T	Homo	L	-	-	+	-	-	-	+
<i>Lb. helveticus</i>	T	Homo	DL	-	+	+	+	+	-	+
<i>Lb. d. bulgaricus</i>	T	Homo	D	-	+	-	+	+	-	+
<i>Lb. d. lactis</i>	T	Homo	D	-	+	-	+	+	-	+
<i>Lc. l. cremoris</i>	M	Homo	L	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lc. l. lactis</i>	M	Homo	L	+	+	+	+	+	+	-
<i>Leuc. lactis</i>	M	Hetero	D	+	+	+	+	+	+	-
<i>Leuc. m. cremoris</i>	M	Hetero	D	+	+	+	+	-	+	-
<i>Lb. c. casei</i>		Homo	L	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lb. p. paracasei</i>		Homo	L	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. p. tolerans</i>		Homo	L	+	+	+	+	-	+	-
<i>Lb. rhamnosus</i>		Homo	L	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i>		Homo	DL	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lb. curvatus</i>		Homo	DL	+	+	+	+	-	+	-
<i>Lb. fermentum</i>		Hetero	DL	+	+	+	+	-	+	+
<i>Ent. faecalis</i>		Homo	L	+	+	+	+	+	+	+
<i>Ent. faecium</i>		Homo	L	+	+	+	+	+	+	+

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

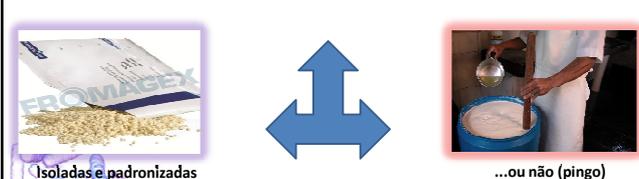
Cultura Starter



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Cultura Starter

- Culturas starter podem ser definidas como preparações que contêm microrganismos vivos ou em estado latente que se desenvolvem pela fermentação de um determinado substrato presente no meio (HAMMES e HERTEL, 1998)



Isoladas e padronizadas (Culturas liofilizadas) ...ou não (pingo)

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Produção da cultura starter



Coleta → Isolamento → Caracterização → Repique

→ Liofilização

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

ADIÇÃO CULTURAS LÁCTEAS?



ELIMINADAS PELA PASTEURIZAÇÃO

Leite Pasteurizado → Culturas comerciais

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Crescimento bacteriano



Log

FASE LAG

FASE LOG

FASE ESTACIONÁRIA

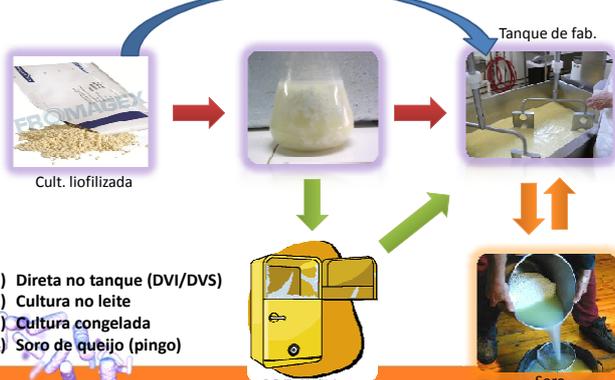
FASE DECLÍNIO

Tempo

FASE PRODUTIVA

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Métodos de inoculação



Tanque de fab.

Cult. liofilizada

1) Direta no tanque (DVI/DVS)

2) Cultura no leite

3) Cultura congelada

4) Soro de queijo (pingo)

Soro

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

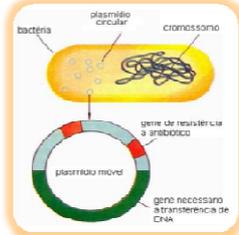
Manutenção da cultura



- Estocagem é difícil
- Cultura deve estar ativa no momento da inoculação
- Repicagens sucessivas:
 - Risco de contaminação
 - Perdas das características plasmidiais
- Cultura deve ser mantida em leite
- Suplementado com extrato de levedura
- Neutralizar a acidez com NaOH

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

CAUSAS DE PERDAS DO PLASMÍDIO



- **Crescimento**
 - Na ausência de lactose e caseína
 - Crescimento em temperaturas subletais: 38º-42º C
 - Congelamento e des
- **Consequências:**
 - Perda das características desejáveis da fermentação
 - Suscetibilidade a fagos, antibióticos e sanificantes

- Transporte de lactose
- Degradação da caseína
- Permease do citrato
- Produção de polímeros extracelulares
- Resistência a antibióticos e fagos

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Aplicações práticas

- **HOMO FERMENTATIVAS:**
 - Produzem maior acidez na fermentação
 - Utilizadas nos processos em que se deseja rápida acidificação
- **HETERO FERMENTATIVAS:**
 - Menos acidificantes
 - Processos em que se requer menos acidez
- **CITRATO:**
 - Não gera acidez
 - Produz sabor e aroma
- **PROPIÔNICAS:**
 - Gera olhaduras grandes
 - Aroma e sabor característicos



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

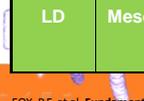
- **Mesofílicas** → 20 a 40 °C
 - *Lc. cremoris*
 - *Lc. lactis*
- **Termofílicas** → >45°C
 - *Streptococcus thermophilus*
 - *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*
 - *Lb. helveticus*




LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Classificação básica das c.s. comerciais

CULTIVO	TIPO	MICROORGANISMOS	FUNÇÃO	PRODUTOS
O	Meso	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactococcus cremoris</i>	Acidez	Queijos
D	Meso	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactococcus cremoris</i> + <i>Lactococcus diacetylactis</i>	Acidez, CO2 e aroma (Cit+)	Queijos semi-duros e elásticos
L	Meso	<i>Leuconostoc spp.</i>	Acidez, +CO2 e Aroma (Cit+)	Manteiga, queijos c/olhaduras
LD	Meso	<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Lactococcus cremoris</i> + <i>Lactococcus diacetylactis</i> + <i>Leuconostoc spp.</i>	Acidez, CO2 e Aroma (Cit+)	Queijos com olhaduras



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)
FOX, P.F. et al. Fundamentals of cheese science, 2000, 587 p.

Culturas adjuntas

- Melhorar ou acelerar o desenvolvimento de *flavour* nos queijos



P. candidum



B. linens



P. roqueforti



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Queijo	Cultura starter	Culturas adjuntas	Principais produtos
Emmentaler	<i>Sc. thermophilus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i>	<i>Propionium bacterium freudenreichii subsp. shermanii</i>	CO2, propionato e acetato
Mozzarella e outros queijos italianos	<i>Sc. thermophilus</i> e <i>Lb. helveticus</i> (ou misturas de termofílicas)		
Cheddar	O, L ou DL mesofílicas (ou misturas de termofílicas)		
Edam e Gouda	DL mesofílicas e culturas mistas		CO2 e acetato
Camembert e Brie	O, L e DL mesofílicas	<i>Penicillium camemberti</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Amonia
Tilset, Limburger e Munster cheese	O, L ou DL mesofílicas	<i>Brevibacterium linens</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Compostos sulfurados (methional)
Yogurt	<i>Sc. thermophilus</i> e <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> (podendo ser usado também <i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i>)		Acetaldeído
Gorgonzola e Roquefort	O, L ou DL mesofílicas	<i>Penicillium roqueforti</i> <small>B.Galli - FEA/Unicamp</small>	2-Heptanona e 2-nonanona



Probióticos

- **Probióticos** são microorganismos vivos que podem conferir um benefício à saúde do hospedeiro. (FAO/WHO, 2001)

- 1 PROBIÓTICOS
Bactérias Láticas e Bifidobactérias.
- 2 BARREIRA IMUNOLÓGICA
Fixação das probióticas na mucosa intestinal, formando uma barreira imunológica.
- 3 RECUPERAÇÃO DA MICROBIOTA
Atividade antimicrobiana. Incorporação na microflora.
- 4 EFEITOS FISIOLÓGICOS
Filifus, lactis (crisium) e affinis, rickmannii
- 5 BENEFÍCIOS À SAÚDE

MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS





LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

• Todo iogurte é probiótico?

- ✓ Lactobacillus acidophilus
- ✓ Lactobacillus casei Shirota
- ✓ Lactobacillus casei variedade rhamnosus
- ✓ Lactobacillus casei variedade defens
- ✓ Lactobacillus paracasei
- ✓ Lactococcus lactis
- ✓ Bifidobacterium bifidum
- ✓ Bifidobacterium animalis (incluindo a subespécie B. lactis)
- ✓ Bifidobacterium longum
- ✓ Enterococcus faecium



A quantidade mínima viável de probióticos deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹

ANVISA – RDC 02/2002
Parecer técnico CRN-3 Nº 12/2015

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Produtos que mais despertam o desejo do consumidor quando são lançados no mercado



32%	Iogurtes
28%	Bolachas e biscoitos
27%	Suco pronto para beber (tipo garrafa ou caixinha)
25%	Chocolates e bombons
24%	Queijos
21%	Alimentos congelados ou semiprontos (lasanhas, pizzas e nuggs)
19%	Arroz

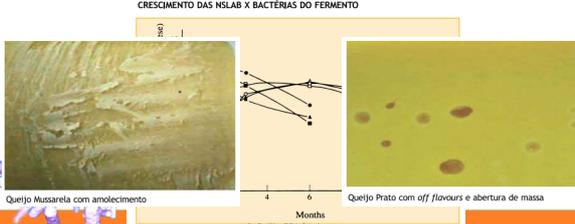


B.Galli - FEA/Unicamp

FIESP IBOPE

NSLAB (Non-starter lactic acid bacteria)

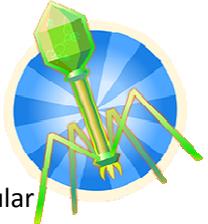
- BAL não provenientes da cultura (contaminantes)
- Grupo complexo de m.o. determinado por região, estação do ano, etc.
- Importante para maturação de queijos mas responsável por defeitos
- Geralmente lactobacilli, leuconostoc, pediococci e enterococci



CRESCIMENTO DAS NSLAB X BACTÉRIAS DO FERMENTO

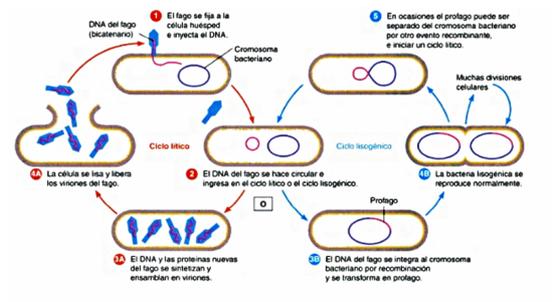
LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Bacteriófagos



- Vírus que atacam bactérias
- Absorção do fago na parede celular (receptores de fagos)
- Principal causa de produção lenta de acidez e em casos extremos da perda da capacidade de acidificar (“deadvats”)

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)



Ciclo lítico = morte celular e decréscimo de UFC

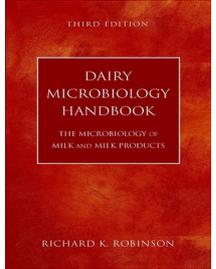
Ciclo lisogénico = perda de funcionalidade

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Leitura complementar



ORDONEZ, J.A.; 2005
Tecnologia de Alimentos (Vol.2)



ROBINSON, R.; 2002
Dairy Microbiology Handbook



WALSTRA, P. et al.; 2006
Dairy Science and Technology

LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

Vídeo

- <https://www.youtube.com/watch?v=eksagPy5tmQ>



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)

**Dúvidas?
Plantão?
STOA**



Obrigado!

bruno.galli@usp.br



LAN2690 – Microbiologia do leite II (Bactérias lácticas)