**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de
Listeria monocytogenes em queijo Minas Frescal processado pelo
método de acidificação direta**

Andressa Prado Vieira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de alimentos

**Piracicaba
2011**

Andressa Prado Vieira
Engenheira de Alimentos

Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Vieira, Andressa Prado

Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta / Andressa Prado Vieira. - - Piracicaba, 2011.
107 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Agentes antimicrobianos 2. Bactérias lácticas 3. Bacteriocina 4. Lactococcus
5. Listeria 6. Microbiologia 7. Queijo I. Título

CDD 637.3
V665a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico esta vitória

*Aos meus queridos pais, Luiz Daniel
e Regina Célia, meus primeiros
educadores, pelo amor, carinho e
incentivo e meus queridos irmãos,
Alessandro e Aline.*

*Ao meu amado João Carlos,
por todo apoio e dedicação,
companheiro de todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e marcante presença no decorrer dela;

Ao Prof. Dr. Ernani Porto pelo incentivo e orientação no desenvolvimento deste trabalho;

À Prof. Dra. Izildinha Moreno pela amizade, coorientação no desenvolvimento deste trabalho, pela oportunidade de realização em parceria no TECNOLAT/ITAL e pelas importantes sugestões e correções na redação da dissertação;

Às pesquisadoras Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá; Dra. Adriana Torres Silva e Alves; Dra. Renata Bromberg e à Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo pelas correções e valiosas sugestões na redação desta dissertação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela concessão de bolsa;

Ao TECNOLAT/ITAL pelo suporte financeiro e pela concessão do espaço físico para execução do trabalho;

À empresa CBE EMBRARAD pela esterilização do bio-ingrediente por radiação gama;

Às técnicas Cláudia e Mariana, do Laboratório de Microbiologia, pela disponibilidade e colaboração na realização deste trabalho;

Às estagiárias Tabata e Juliana pela amizade sincera e por toda colaboração prestada, sem medir esforços;

A todos os professores da ESALQ/USP e pesquisadores do TECNOLAT/ITAL que contribuíram com valiosas sugestões;

A todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia por todo o auxílio e que contribuíram para execução deste trabalho;

À minha família pelo amor, carinho e incentivo no decorrer da minha caminhada;

Ao meu querido João Carlos pela compreensão e pelas valiosas palavras de estímulo, apoio e orientação;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivos específicos	21
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
4.1 Biopreservação	23
4.2 Bactérias lácticas	24
4.3 Bacteriocinas de bactérias lácticas	26
4.3.1 Classes de bacteriocinas	27
4.3.2 Espectro de inibição.....	29
4.3.3 Fatores que afetam a produção e a eficácia de bacteriocinas	30
4.4 Aplicações de bacteriocinas em alimentos.....	31
4.4.1 Aplicação na indústria de laticínios	32
4.5 Queijo Minas Frescal	33
4.5.1 Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijo Minas Frescal	35
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1 Origem e manutenção das linhagens produtoras de bacteriocinas	39
5.2 Origem e manutenção das linhagens de <i>L. monocytogenes</i>	39
5.3 Seleção de bactérias lácticas.....	41
5.3.1 Avaliação das características de crescimento em leite tornassolado	41
5.3.2 Avaliação da aceitação organoléptica em leite.....	42
5.3.3 Determinação das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas	42
5.3.3.1 Capacidade de produção de aroma	43
5.3.3.2 Atividade proteolítica.....	43
5.4 Estudos de produção de bacteriocina em leite.....	44
5.4.1 Estudos de otimização da produção de bacteriocinas através da adição de nutrientes em leite.....	45
5.4.2 Influência da concentração de cloreto de sódio na produção de bacteriocinas por <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CTC 204	48
5.5 Avaliação da sensibilidade de diferentes cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> à bacteriocina produzida por <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CTC 204.....	48
5.6 Concentração do leite fermentado contendo bacteriocinas por <i>spray-drying</i>	49
5.7 Esterilização do bio-ingrediente por radiação gama.....	50
5.8 Emprego do bio-ingrediente no processamento de queijo Minas Frescal para controle de <i>L. monocytogenes</i>	52
5.8.1 Processamento do queijo Minas Frescal e inoculação de <i>L. monocytogenes</i>	52
5.8.2 Monitoramento microbiológico do processamento dos queijos.....	56
5.8.2.1 Amostragem.....	56
5.8.2.2 Detecção e enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	56

5.8.3 Determinação da atividade da bacteriocina presente nos queijos	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
6.1 Seleção da bactéria láctica para produção de bacteriocina.....	59
6.1.1 Avaliação das características de crescimento em leite tornassolado	59
6.1.2 Avaliação da aceitação organoléptica em leite.....	61
6.1.3 Avaliação das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas.....	61
6.2 Produção de bacteriocinas em LDR 10% e o efeito da adição de nutrientes ao meio de cultivo sobre a produção de bacteriocinas	62
6.2.1 Estudo de Parâmetros Cinéticos	70
6.2.2 Sensibilidade ao cloreto de sódio.....	72
6.3 Comparação do espectro de atividade das bacteriocinas, sob condições ótimas de produção, sobre diferentes linhagens de <i>L. monocytogenes</i>	76
6.4 Avaliação dos processos de secagem e esterilização do bio-ingrediente.....	78
6.5 Efeito da adição do bio-ingrediente sobre <i>L. monocytogenes</i> inoculada em queijo Minas Frescal.....	81
7 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	103

RESUMO

Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta

Cinco linhagens bacteriocinogênicas foram selecionadas quanto às suas propriedades sensoriais e tecnológicas em leite. Somente *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CTC204 apresentou as características (baixa acidificação e proteólise) adequadas para a fabricação de queijo Minas Frescal. Contudo, a baixa atividade da bacteriocina ($3 \times 10^2 \text{UA.mL}^{-1}$) inviabilizou a sua utilização como bioconservante para a produção in situ no queijo. Estudos para obtenção de um bio-ingrediente foram conduzidos. A atividade da bacteriocina foi maior em leite adicionado com extrato de levedura e glicose ($1,3 \times 10^4 \text{UAmL}^{-1}$) comparado com prebióticos (fruto-oligossacarídeo e inulina). A secagem em *Spray-drier* originou um bio-ingrediente com atividade de $1,3 \times 10^5 \text{UAmL}^{-1}$. *Listeria monocytogenes* ATCC7644 ($4,0 \text{LogUFC.mL}^{-1}$) foi inoculada nos queijos obtidos por acidificação do leite pasteurizado e microfiltrado. A contagem aumentou $6,2 \text{LogUFC.gL}^{-1}$ e 2LogUFC.gL^{-1} no 15º e 21º dia de estocagem a $6 \pm 1^\circ \text{C}$, respectivamente, nos queijos sem e com adição de 10% do bio-ingrediente. Portanto, inibição de $4,2 \text{LogUFC.g}^{-1}$ do patógeno no 15º dia de estocagem.

Palavras-chave: Bioconservação; Microrganismos patogênicos; *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

ABSTRACT

Application of bacteriocins of lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in Minas Frescal cheese processed by the method of direct acidification

Among the five bacteriocin-producing lactic bacteria strains tested, only *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 presented suitable sensory and technological properties for Minas Frescal cheesemaking process. However, because of the low yield of bacteriocin production in milk (3.0×10^2 AU.mL⁻¹), its use as biopreservative for *in situ* production in cheese was impractical. We carried out experiments to obtain a bioingredient. Bacteriocin activity was higher in milk supplemented with glyucose and yeast extract (1.3×10^4 AU.mL⁻¹) compared to probiotics (fructooligosaccharides and inulin). Spray drying fermented milk originated a bioingredient presenting activity of 1.3×10^5 AU.mL⁻¹. Population count of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, inoculated (4.0 Log CFU.mL⁻¹) in cheese produced by direct acidification of pasteurized microfiltered milk, reached 6.2 Log CFU.g⁻¹ and 2.0 Log CFU.g⁻¹ at day 15 of storage at 6 ± 1 °C, in cheese without and with addition of 10% of bioingredient, respectively, therefore presenting pathogen inhibition of 4.2 Log CFU.g⁻¹ at day 15 of storage.

Keywords: Biopreservation; Pathogenic microorganisms; *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* CTC 204

1 INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas são comumente utilizadas em processos fermentativos e desempenham um papel fundamental no processo de fermentação do leite, sendo sua utilização um dos métodos mais antigos de preservação (OUWEHAND; VESTERLUND, 2004). Isto se deve à sua capacidade de produção do ácido láctico, o que resulta no decréscimo do pH do leite e a remoção da fonte fermentescível, promovendo um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (GOKTEPE, 2006). Além disso, essas bactérias produzem determinados compostos antagônicos formados em pequenas quantidades a partir do catabolismo celular, tais como ácidos orgânicos, diacetil, acetaldeído, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007).

Em diversos produtos lácteos, culturas de microrganismos desejáveis são adicionadas com o intuito de melhorar a segurança (inativação de patógenos); intensificar a estabilidade (extensão da vida útil pela inibição de microrganismos deteriorantes ou de reações abióticas); proporcionar a diversidade dos produtos (modificação da matéria-prima crua de modo a se obter novas propriedades sensoriais); e, fornecer benefícios à saúde (por meio de efeitos positivos na microbiota intestinal) (MÄYRÄ-MÄKINE; BIGRET, 2004). Na fabricação de queijos, em específico, a adição de bactérias é uma etapa essencial para o desenvolvimento de sabor e aroma desejáveis nesse produto. O perfil de sabor e aroma dos queijos depende das bactérias envolvidas na maturação e na capacidade catabólica das mesmas, o que pode resultar em diferentes compostos de sabor e aroma presentes em diferentes queijos (BROOME, 2007).

Os fermentos são, por definição, utilizados para alterar positivamente as propriedades sensoriais do alimento. As culturas antagonistas, denominadas culturas protetoras, são inoculadas nos produtos com o intuito de inibir os microrganismos patogênicos e/ou estender a vida útil destes, sem que produzam alterações em suas propriedades sensoriais. A biopreservação, por sua vez, considera o uso em alimentos de tais culturas protetoras ou de seus subprodutos, como bacteriocinas, de modo a exercer atividade antimicrobiana (MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Para se manter competitiva, a indústria de alimentos deve atender aos requerimentos dos consumidores, que se encontram em constantes mudanças. As tendências mais recentes incluem a preferência por produtos de qualidade e que não tenham sido submetidos a processamentos térmicos intensos.

Importantes implicações microbiológicas derivaram dessas tendências, uma vez que a maioria das alterações realizadas, como a produção de alimentos livres de aditivos, com baixos teores de sais e submetidos a tratamentos térmicos mais brandos, comprometem as condições de preservação dos produtos, acarretando diminuição da garantia de vida útil satisfatória e de segurança alimentar. É importante que esta perda potencial de preservação e segurança seja de alguma maneira, compensada e restabelecida e neste ponto, os antimicrobianos naturais podem desempenhar seu papel.

Uma grande variedade de sistemas antimicrobianos naturais evoluiu nos animais, plantas e microrganismos (GOULD, 1996). Alguns destes já estão sendo utilizados para preservação de alimentos. Polipeptídios antimicrobianos têm sido descobertos em diversos organismos, incluindo-se os presentes em microrganismos. Dentre as bactérias, algumas são produtoras de peptídeos antimicrobianos, especialmente as Gram-positivas, responsáveis pela fermentação de leite, carne e vegetais, além das bactérias Gram-negativas, entéricas ou não. Esses peptídeos são conhecidos como bacteriocinas e apresentam grande variação quanto ao seu espectro de atividade, peso molecular, origem genética, natureza química, modo de ação e especificidade ao hospedeiro (FIELDS, 1996). A capacidade das bacteriocinas em inibir outras bactérias, aliada a sua natureza protéica, podem se constituir nos únicos aspectos comuns desse grupo de substâncias.

As bacteriocinas produzidas por culturas *starters* podem estar presentes em uma grande variedade de alimentos fermentados ou não, e desempenham um papel significativo na ecologia microbiana dos mesmos, principalmente em relação a sua estabilidade e segurança. Em geral, as bacteriocinas são compostos protéicos, ativos contra bactérias sensíveis, apresentando um modo de ação bactericida ou bacteriostático. Algumas bacteriocinas são constituídas apenas por proteínas, enquanto outras contêm grupamentos de proteínas, carboidratos e lipídeos (ECKNER, 1992).

As pesquisas sobre os metabólitos antimicrobianos das bactérias lácticas tiveram um avanço considerável nestas últimas décadas. Isto ocorreu em virtude da emergência de microrganismos patogênicos psicrotróficos e da crescente tendência da indústria em substituir os aditivos químicos por produtos naturais. A aplicação de culturas lácticas para a produção *in situ* de bacteriocinas ou das próprias bacteriocinas em suas formas parcial ou totalmente purificadas, em produtos fermentados ou não, podem ser consideradas como fontes potenciais de compostos antimicrobianos naturais. Esses compostos antimicrobianos podem ser utilizados tanto na preservação de alimentos como na profilaxia intestinal.

As bacteriocinas podem desempenhar um papel fundamental durante a fabricação e maturação do queijo devido à sua capacidade de controlar a flora microbiana. Como exemplos podem exercer um papel dominante na inibição da proliferação de bactérias lácticas não-*starter* (NSLAB), que são muitas vezes uma fonte de inconsistência na qualidade do produto final. Além disso, elas podem ser usadas como uma ferramenta para promover a lise celular de culturas *starter*, com o objetivo de liberação de enzimas intracelulares na matriz de queijo. As bacteriocinas são comumente utilizadas como agentes de controle biológico de queijo para a inibição de microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, um microrganismo associado a inúmeros surtos de doenças de origem alimentar devido ao consumo de queijo (O'SULLIVAN et al., 2007).

Para o estudo de produção de bacteriocinas neste trabalho foram utilizadas bactérias lácticas com histórico de produção destes antimicrobianos em diferentes meios de cultivo, tais como MRS, APT (BROMBERG et al., 2006; BROMBERG et al., 2005; BROMBERG et al., 2004; BROMBERG et al., 2000; NOGUEIRA, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

O processamento tradicional de queijo Minas Frescal envolve o emprego de bactérias lácticas, ou fermentos lácticos, resultando em um produto com aspectos de padrão de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento próprios. Os benefícios advindos da substituição de fermentação láctica pelo método de acidificação direta com a adição de ácido láctico industrial no processamento deste tipo de queijo são o aumento do rendimento e redução de alterações negativas ocorridas durante o período de estocagem, principalmente acidificação e proteólise. Contudo, o produto obtido por acidificação direta é mais susceptível às contaminações microbiológicas devido à ausência de bactérias lácticas, que atuam benéficamente por competição e/ou produção de metabólitos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas. A composição do queijo Minas Frescal, constitui-se um excelente substrato para a contaminação de diversos patógenos, entre eles a *L. monocytogenes*. Devido às características deste microrganismo em multiplicar-se em temperaturas de refrigeração e de sobrevivência durante longos períodos sob condições adversas ocasiona sérios problemas à indústria de laticínios. Este é o agente causador da listeriose, caracterizada principalmente por gastroenterite, septicemia, meningite e meningoencefalite e apresenta como grupo de risco preferencial os idosos, crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas. Devido à alta taxa de mortalidade nos casos graves, este agente despertou a atenção especial das autoridades governamentais responsáveis pelo controle sanitário de leite e derivados, e a possibilidade aventada seria a obrigatoriedade da utilização de bactérias lácticas no processamento desse tipo de queijo. Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi oferecer ao setor produtivo uma alternativa tecnológica com o intuito de aumentar a biosegurança do queijo Minas Frescal obtido por acidificação direta, principalmente contra *L. monocytogenes*, sem alterar sua tecnologia de obtenção e nem suas propriedades físicas, químicas e organolépticas.

3 OBJETIVOS

Desenvolvimento de um conservante natural com o intuito de aumentar a biosegurança do queijo Minas Frescal obtido por acidificação direta, contra *L. monocytogenes*, sem alterar suas características.

3.1 Objetivos específicos

- Seleção de linhagens produtoras de bacteriocinas quanto a sua capacidade de multiplicação, produção de bacteriocina e inibição de *L. monocytogenes* em leite desnatado 10% reconstituído;
- Avaliação das atividades acidificante e proteolítica das linhagens produtoras de bacteriocinas;
- Avaliação do potencial de utilização da linhagem selecionada para o biocontrole de *Listeria monocytogenes* durante o processamento e estocagem de queijo Minas Frescal obtido pelo método de acidificação direta com adição de ácido láctico.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Biopreservação

Atualmente, devido à busca por maior qualidade de vida, consumidores constantemente preocupados com possíveis efeitos adversos à saúde devido à presença de aditivos químicos em alimentos, são atraídos por alimentos seguros, compostos por produtos de alta qualidade nutricional e organoléptica e que não tenham sido submetidos a processamentos intensos (CASTRO et al., 2011). Aliada a esta tendência, a regulamentação em vários países sobre a legislação de alimentos, tem restringido o uso, bem como os níveis permitidos de alguns dos agentes preservativos mais utilizados aprovados em diferentes alimentos.

Essa percepção, juntamente com a crescente demanda por alimentos seguros e minimamente processados, com longa vida de prateleira e conveniência, tem estimulado o interesse da indústria de alimentos na busca de novos produtos que atendam a esses requerimentos. Importantes implicações microbiológicas derivaram dessa tendência, uma vez que a maioria das alterações realizadas, como por exemplo, produção de alimentos livres de aditivos, com baixos teores de sais e submetidos a tratamentos térmicos mais brandos, comprometem as condições de preservação dos produtos, acarretando diminuição da garantia de vida útil satisfatória e de segurança alimentar. É importante que esta perda potencial de preservação e segurança seja de alguma maneira, compensada e restabelecida e, neste ponto, os agentes antimicrobianos naturais podem desempenhar seu papel (NASCIMENTO, 2007).

Com base nestes fatos, há uma tendência crescente na utilização de bioconservantes, representados pelo emprego de uma microbiota natural ou controlada e seus metabólitos, tais como ácidos orgânicos, enzimas e bacteriocinas, na inibição ou destruição de microrganismos indesejáveis em alimentos. Essa técnica, denominada biopreservação ou bioconservação consiste em explorar a capacidade dos microrganismos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir microrganismos indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam patogênicos. A biopreservação, consiste em uma nova alternativa tecnológica para a produção de alimentos tornando-os mais competitivos, devido à ampliação da vida útil e

ao reforço na segurança dos produtos alimentares por meio da microflora natural ou controlada, principalmente de bactérias lácticas e seus produtos antibacterianos (HUGAS, 1998; MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Um exemplo desta técnica é a fermentação láctica que apesar de ser antiga, é até hoje, amplamente empregada na indústria de alimentos. Os produtos finais do metabolismo dessas bactérias, como ácido láctico e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas, podem atuar como bioconservadores, alterando as propriedades intrínsecas de alimentos e inibindo microrganismos deteriorantes e patogênicos (DEEGAN et al., 2006).

4.2 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas constituem um grupo filogeneticamente diverso e são incluídas nesse grupo, bactérias Gram-positivas com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São inclusas neste grupo, bactérias anaeróbias facultativas, não esporogênicas; são catalase, oxidase e gelatinase negativas, com morfologia de cocos ou bacilos, não reduzem nitrato a nitrito, mas são capazes de utilizar o lactato (AXELSSON, 2004). O metabolismo de carboidratos pode ser homofermentativo, resultando primordialmente em ácido láctico, ou heterofermentativo, resultando em ácido láctico e outros produtos como etanol, acetato, dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio. Podem ser divididas em mesofílicas (crescem a uma temperatura ótima de 30°C) e em termofílicas (crescem a uma temperatura ótima de 42°C) (FOX et al., 2000; SILVA Jr, 2002).

Estas bactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ecossistemas, e são comumente encontrados em alimentos (produtos lácteos, carnes e vegetais), sendo presentes também no solo, na boca, trato gastrointestinal e urogenital de humanos e animais (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000; SAVADOGO et al., 2006).

Originalmente, o grupo de bactérias lácticas incluía quatro gêneros de grande importância em alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Após revisões taxonômicas destes gêneros e a descrição de novos, atualmente, as bactérias lácticas são divididas nos seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*,

Enterococcus, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, e *Weissella* (AXELSSON, 2004). De todos esses gêneros, cinco são comumente encontrados em queijos: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (BERESFORD et al., 2001).

Este grupo de bactérias desempenha um papel importante na maturação, processamento e conservação dos alimentos. Há milhares de anos esses microrganismos são aplicados na produção de alimentos, devido à sua capacidade de produzir mudanças desejáveis no sabor, aroma e textura, bem como inibir microrganismos patogênicos e deteriorantes. Além de estarem presentes em um grande número de alimentos fermentados espontaneamente, possuem grande importância industrial. Estas bactérias são utilizadas como culturas *starters* na fermentação de alimentos e bebidas, pois, uma vez adicionadas se desenvolvem sob condições controladas e contribuem na redução do pH por meio da produção de ácidos e/ou modificação do sabor e textura nos alimentos. Industrialmente, essas bactérias também são utilizadas na produção de ácido láctico (usado como aditivo), de dextrana, na produção e na retenção do ácido láctico no sistema fermentativo de produção de silagem, na atividade de protease, na produção de compostos aromáticos, nos mecanismos de defesa contra bacteriófagos e na produção de bacteriocina. Também são utilizadas como probióticos, ou seja, adjuntos da dieta e terapêuticos, para humanos e animais (NASCIMENTO, 2007).

Mas, para que sejam aplicadas industrialmente, as culturas lácticas devem resistir a condições adversas, tais como liofilização, baixas e altas temperaturas, baixos pH e *stress* osmótico (van de GUCHTE et al., 2002).

Uma vez que as bactérias lácticas são predominantes em vários alimentos fermentados e devido à maioria dos representantes deste grupo não apresentarem qualquer risco para a saúde humana, possuem *status* GRAS (*generally recognized as safe* - usualmente reconhecido como seguro). As bactérias lácticas, em geral, são consideradas como organismos com "grau alimentício", possuem potencial utilização na preservação biológica de alimentos, promovendo diversos benefícios à segurança alimentar, dentre eles, o aumento da vida útil e inibição de patógenos. A redução de pH,

devido à produção de ácidos e a utilização de carboidratos fermentecíveis constituem o principal mecanismo de antagonismo microbiano (DABES; SANTOS; PEREIRA, 2001). Além destes efeitos, ao comparar-se leite *in natura* com produtos lácteos fermentados, as bactérias lácticas estão relacionadas ao aumento da digestibilidade, aumento do valor nutritivo, a produção de níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos, a melhor utilização da lactose, a redução dos níveis de lactose no produto e a maior disponibilidade de lactase (GOKTEPE, 2006).

Devido à ação antagonista das bactérias lácticas frente a outros microrganismos de origem alimentar, como *L. monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*, através da produção de substâncias inibidoras, incluindo-se a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, existe um grande interesse em sua utilização para a preservação biológica de alimentos (ORTOLANI, 2009; STILES, 1996). A produção de bacteriocinas foi descrita para todos os gêneros de bactérias lácticas (DE VUYST, 1994) inclusive as bifidobactérias (MEGHRIUS *et al.*, 1991).

4.3 Bacteriocinas de bactérias lácticas

Dentre as substâncias com potencial antagonista produzido por bactérias lácticas, as bacteriocinas possuem grande interesse pela indústria de alimentos por não provocarem alterações sensoriais e possuírem atividade específica contra determinados patógenos (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007). Mas, apesar de importantes, não são todas espécies e linhagens de bactérias lácticas que possuem capacidade de produzir bacteriocinas.

As bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos ou proteínas, termoestáveis, sintetizados ribossomalmente e biologicamente ativos, com ação inibitória contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (restrito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (GÁLVEZ; LÓPEZ; ABRIQUEL, 2008).

A aplicação de bacteriocinas para melhorar a qualidade microbiológica e a segurança dos alimentos tem estimulado intensa pesquisa nos últimos anos e dessa forma, um grande número de bacteriocinas têm sido isoladas e caracterizadas a partir de bactérias lácticas, sendo que algumas são consideradas potenciais agentes antimicrobianos devido à sua ação como conservante de alimentos e pelo seu efeito antagonista contra patógenos importantes.

Ainda hoje, a nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem estudada e aplicada como aditivo em alimentos (DELVES-BROUGHTON et al., 1996; IVANOVA et al., 2000). Diversas linhagens de lactococos isolados de diferentes produtos apresentam atividade antimicrobiana diferente da nisina e apresentam como características a resistência ao calor e baixo peso molecular (COVENTRY et al., 1997; KELLY; DAVEY; WARD, 1998; PIARD et al., 1992).

A nomenclatura para bacteriocinas é contraditória e ainda está em discussão. Algumas bacteriocinas recebem nomes com base em suas espécies produtoras, mas mesmo essa nomenclatura dá origem a contradições (FURTADO, 2010).

4.3.1 Classes de bacteriocinas

Apesar de sua heterogeneidade físico-química, as bacteriocinas de bactérias lácticas possuem características comuns que possibilitam sua classificação. Baseadas na sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular as bacteriocinas de bactérias lácticas podem ser subdivididas em quatro classes (COTTER; HILL; ROSS, 2005; DEEGAN et al., 2006; KLAENHAMMER, 1993).

A **classe I** é composta por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (inferior a 5 kDa), denominados lantibióticos, são caracterizados pela presença dos aminoácidos com ligação tioéter lantionina e β -metil lantionina, bem como outros aminoácidos modificados como desidroalanina e desidrobutirina (PINTO, 1996). São caracterizados pela presença de resíduos de aminoácidos modificados pós-translacionalmente. A nisina, principal representante deste grupo, é produzida por algumas linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e o crescimento de esporos de *Clostridium* e *Bacillus*. No entanto, não é eficaz

contra bactérias Gram-negativas, bolores e leveduras (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA, 2005).

Esta classe é subdividida em Ia e Ib. A **subclasse Ia**, que inclui a nisina, é composta por peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que tem como mecanismo de ação a formação de poros na membrana e tem sua estrutura mais flexível quando comparada com a dos peptídeos da subclasse Ib. A **subclasse Ib** é composta por peptídeos globulares com carga neutra ou negativa (ALTENA et al., 2000).

A **classe II** apresenta peptídeos de pouca estabilidade térmica (inferior a 10 kDa), nenhuma modificação nos aminoácidos e também é subdividida em IIa e IIb. A **subclasse IIa** apresenta bacteriocinas ativas contra *Listeria*, como pediocina e enterocina (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As pediocinas são produzidas por *Pediococcus* spp., não sendo muito eficazes contra esporos, mas inibe *L. monocytogenes* efetivamente quando comparado com a nisina (GREEN et al., 1997). As bacteriocinas pertencentes a essa subclasse possuem a mesma sequência de aminoácidos Tyr-Gly-Asn-Gly-Val na extremidade N-terminal e duas cisteínas, formando ponte de bissulfeto do N-terminal no interior do peptídeo. A **subclasse IIb** contém bacteriocinas compostas por dois peptídeos diferentes, que agem sinergicamente. São exemplos desse grupo a lactococcina G e M e a lactacina F (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A **classe III** é constituída por grandes peptídeos termolábeis de peso molecular superior a 30 kDa, também denominadas bacteriolisinas, pois contém em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal. São exemplos as lactacinas A e B e helveticina J (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA, 2005).

Uma **quarta classe (IV)** também é descrita (JEEVARATNAM; JAMUNA; BAWA, 2005). São incluídas bacteriocinas que formam grandes complexos peptídicos contendo carboidratos ou lipídios em suas estruturas. Contudo, Cleveland et al. (2001) acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas.

A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias associadas com alimentos pertencem às classes I e II (MELO, 2003).

4.3.2 Espectro de inibição

Uma grande vantagem da utilização de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, como agentes conservadores de alimentos é em relação à garantia da segurança microbiológica aos consumidores. As linhagens produtoras e seus metabólitos, incluindo-se as bacteriocinas, têm sido consumidas nos alimentos fermentados há milhares de anos sem serem causadoras de efeitos nocivos à saúde. Estudos realizados com nisina e pediocina AcH mostraram que essas substâncias não são tóxicas a animais de laboratório e a culturas de células mamárias (RAY, 1993).

As bacteriocinas apresentam características inerentes a sua ação antimicrobiana. Estes compostos possuem estreita faixa de ação contra hospedeiros, em geral limitada apenas a bactérias Gram-positivas. Observou-se que mesmo as bacteriocinas que apresentam uma faixa mais ampla de ação, não são eficazes contra todas as linhagens de bactérias Gram-positivas patogênicas e deteriorantes. Além disso, uma linhagem sensível possui células variantes na população, que podem apresentar resistência a bacteriocina podendo, portanto, se multiplicar em sua presença. Dessa forma, sua ineficácia contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas resistentes, bolores e leveduras, os quais podem constituir-se em microrganismos relacionados às doenças de origem alimentar, tem limitado o uso das bacteriocinas já conhecidas (CINTAS *et al.*, 2001).

O espectro antibacteriano frequentemente inclui microrganismos deteriorantes e patogênicos de origem alimentar, como a *L. monocytogenes* e *S. aureus* (NASCIMENTO, 2007).

A nisina apresenta eficiente atividade antimicrobiana em diversos sistemas alimentares, inibindo o desenvolvimento de uma ampla variedade de bactérias Gram positivas, como *L. monocytogenes*, *Bacillus* sp. e esporos de *Clostridium* sp. (DEEGAN *et al.*, 2006). Entretanto, sua utilização pode ser limitada devido à interação com fosfolípidos, baixa solubilidade, distribuição desuniforme, baixa estabilidade, inativação por enzimas endógenas de alguns alimentos, inibição de culturas iniciadoras, ou ainda, pela emergência espontânea de microrganismos resistentes (ALVES *et al.*, 2006; BROMBERG *et al.*, 2006). Apesar de algumas limitações, a nisina é eficaz contra bactérias Gram-negativas quando utilizada com agentes quelantes (STEVENS, 1992).

Outras bacteriocinas, tais como, pediocina PA-1 e PAC 1,0, produzidas por espécies de *Pediococcus* possuem atividade antilisteria em carne bovina fresca (NIELSEN; DICKSON; CROUSE, 1990) e em salsichas fermentadas (FOEGEDING et al., 1992), respectivamente. Diferentes estudos têm demonstrado atividade inibitória de *Pediococcus acidilactici* JD1-23 contra *L. monocytogenes* em salsichas fermentadas parcialmente desidratadas (BERRY et al., 1990) e salsichas *frankfurters* (BERRY; HUTKINS; MANDIGO, 1991).

4.3.3 Fatores que afetam a produção e a eficácia de bacteriocinas

Para a utilização de culturas bacteriocinogênicas na bioconservação de alimentos deve ser avaliada detalhadamente para cada sistema alimentar, seu espectro de ação, visando uma aplicação adequada dessas culturas no controle de patógenos ou microrganismos deteriorantes sensíveis (ALVES et al., 2006).

Alguns fatores podem comprometer a eficácia na produção e atividade de bacteriocinas de bactérias lácticas em alimentos, como o antagonismo por outros microrganismos presentes nos alimentos, a emergência de microrganismos resistentes, a perda espontânea ou a redução na capacidade de produção de bacteriocinas, a presença de enzimas proteolíticas não específicas, a oxidação, a presença de metais pesados, a agitação excessiva, o congelamento-descongelamento, a ligação com componentes do alimento, a interação com componentes apolares e polares, o efeito do pH na produção de bacteriocinas e na solubilidade e ambiente desfavoráveis para multiplicação bacteriana (pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes) e consequente para a produção de bacteriocinas (DAESCHEL, 1990; HOOVER; STEENSON, 1993). A concentração das bacteriocinas em determinados alimentos também é um fator que determina a atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2006).

Devem também ser considerados os fatores que afetam a eficácia das bacteriocinas em alimentos, como a presença de bactérias patogênicas e formadoras de esporos que sejam resistentes à bacteriocina, condições de desestabilização da atividade biológica de proteínas, tais como proteases e processos oxidativos, ligação aos componentes do alimento, tais como partículas lipídicas e proteínas, inativação pela

presença de aditivos, baixa solubilidade e distribuição irregular no alimento, ação do pH na estabilidade e atividade da bacteriocina.

Apesar de inúmeros trabalhos sobre a produção de bacteriocinas (LEROY; De VUYST, 2003; MOTTA; BRANDELLI, 2003; NEL et al., 2001; TODOROV; DICKS, 2007; TODOROV et al., 2000), devido à complexidade dos ambientes em alimentos, um melhor conhecimento das interações desses fatores com a produção de bacteriocinas ainda é necessária (DELGADO et al., 2007).

4.4 Aplicações de bacteriocinas em alimentos

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO, 2007).

Em geral, para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL; GEISEN; CHILLINGER, 1995). Além desses fatores para aplicação em alimentos, O'Sullivan (2007) relata que a linhagem produtora de bacteriocina deve ter "*status*" GRAS, como é o caso da maioria das bactérias lácticas; mas caso seja empregada a forma purificada da bacteriocina também deve possuir "*status*" GRAS, sendo que somente a nisina é reconhecida e utilizada comercialmente em indústrias de alimentos (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

As bacteriocinas têm aplicação em diversos alimentos. Sua capacidade em inibir o desenvolvimento de microrganismos patógenos de origem alimentar varia de acordo com a linhagem, a bacteriocina produzida e o tipo de alimento (McMULLEN; STILES, 1996). Muriana (1996) relacionou a aplicação de diversas bacteriocinas que apresentam ação inibitória sobre *Listeria* sp., produzidas por bactérias lácticas isoladas de alimentos. Já foram descritas diferentes forma de utilização de bacteriocinas em leite e

seus derivados, vegetais e frutas enlatadas, carne, pescado e bebidas alcoólicas (ECKNER, 1992). As bacteriocinas podem ser produzidas por bactérias constituintes da cultura *starter* durante a fermentação. Contudo, fatores intrínsecos do alimento, como pH, podem impossibilitar a produção ótima das bacteriocinas pelas culturas *starters* (YEZZI *et al.*, 1993). Além disso, linhagens diferentes de microrganismos de uma mesma espécie podem produzir quantidades diferentes da mesma bacteriocina (DE VUYST, 1994). A eficácia das bacteriocinas também é dependente da quantidade desse composto, que é inativada pela interação com os componentes do alimento. Degnan; Buyong; Luchansky (1993) constataram que até 90% da atividade da pediocina aplicada a uma emulsão alimentar pode ser protegida por meio de processo de encapsulação lipossomal. As condições de processamento do alimento também podem influir na ação das bacteriocinas. Foi demonstrado que o pH pode influir na solubilidade da nisina o que, por sua vez, irá contribuir para sua maior ou menor eficiência (LIU; HANSEN, 1990).

Dentre todas as bacteriocinas, a mais conhecida e estudada há mais de 50 anos é a nisina, produzida por inúmeras linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Considerada uma substância segura e não tóxica, sua DL50 é similar a do cloreto de sódio, 3.330.000UI/Kg. (FRAZER *et al.*, 1962). Sua condição de GRAS foi atribuída em 1988 pela “Food and Drug Administration”. Esta bacteriocina tem sido empregada, em larga escala na indústria de alimentos de vários países, como conservante natural de produtos lácteos. Entretanto, tem-se verificado que outras bacteriocinas, como pediocinas e enterocinas, também apresentam potencial de aplicação como aditivo alimentar para o controle de microrganismos indesejáveis, principalmente *Listeria* spp. (NASCIMENTO, 2007).

4.4.1 Aplicação na indústria de laticínios

As bacteriocinas são comumente empregadas como agentes de biocontrole para a inibição de microrganismos patogênicos em queijo, como a *L. monocytogenes*, por ser associada a inúmeros casos de surtos de origem alimentar devido ao consumo desse tipo de alimento.

De acordo com O'Sullivan et al., (2007), as bacteriocinas possuem duas principais aplicações na fabricação de produtos lácteos, nas quais há influência sobre a microbiota; a primeira é aprimorar a qualidade dos produtos de laticínios, sendo realizada de duas formas – por meio da lise celular das culturas *starters* ou da inibição de microrganismos indesejáveis e deteriorantes; a segunda é garantir a segurança do alimento, por meio da inibição de microrganismos patogênicos.

De acordo com Muriana (1996), a pediocina e a nisina podem inibir ou reduzir as contagens de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, principalmente em queijos pasteurizados. Além disso, a nisina é bastante eficiente contra o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*, assim como o desenvolvimento de *Clostridium tyrobutyricum* em queijos semi-duros (RODRIGUEZ et al., 2001).

A atividade antilisterial de *Lc. lactis* subsp. *lactis* recombinante MM217 como cultura *starter* para a produção de pediocina foi testado com sucesso no queijo Cheddar sem afetar suas propriedades tecnológicas (BUYONG et al., 1998). Reviriego et al., (2005) obteve linhagens de *Lc. lactis* ESI 153 e *Lc. lactis* ESI 515, isoladas de queijos caseiros fabricados a partir de leite cru, que foram identificadas como produtoras de pediocina, além de prováveis candidatas a linhagens produtoras de bacteriocinas com grau alimentício .

Segundo O'Sullivan et al. (2007), uma aplicação importante das culturas bacteriocinogênicas e suas bacteriocinas é a redução do período de maturação de queijos, resultante da liberação de aminopeptidases intracelulares na matriz do queijo, em decorrência da lise celular do fermento láctico promovida por estas culturas, contribuindo com a proteólise e formação de *flavour* desejáveis.

4.5 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares produzidos no Brasil devido à elaboração simples, alto rendimento e por ser de grande aceitação no mercado brasileiro. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996) entende-se por queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas. De

acordo com a Portaria 352 de 04 de setembro de 1997, que foi alterada pela Instrução Normativa nº 4 de 01 de março de 2004, o queijo Minas Frescal é classificado como queijo semi-gordo: com teores de lipídios variando entre 25,0 e 44,9%, de muito alta umidade: umidade superior a 55% (conhecido como massa branda ou “mole”), a ser consumido fresco (BRASIL, 2004).

O queijo Minas Frescal, além de ser um queijo fresco com alto conteúdo de umidade, utiliza temperaturas de 32-35°C em seu processamento, não é submetido à cura e apresenta baixa porcentagem de sal. Estas características geram condições ainda mais favoráveis para o desenvolvimento de patógenos (CARVALHO, 2003).

De acordo com Van Dender e Moreno (1992), o queijo Minas Frescal tornou-se bastante irregular nos aspectos de padrão de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento, devido a alterações nos processos de elaboração, sobretudo a substituição do emprego tradicional de fermento pela adição de ácido láctico industrial, variações na temperatura de coagulação, utilização de prensagem, entre outros. Como consequência dos diferentes processos de fabricação do queijo Minas tem-se a dificuldade de implantação de um eficiente sistema de controle de qualidade.

Semelhante ao processo tradicional, o queijo Minas Frescal fabricado por acidificação direta é obtido por coagulação enzimática, porém a acidificação é promovida pelo uso direto de ácido láctico no lugar de fermento láctico (CARVALHO, 2003). Segundo Van Dender e Moreno (1992), esta alteração na tecnologia de fabricação tem como resultados principais, quando comparados com queijos produzidos convencionalmente, o aumento de umidade e do pH final do queijo, diminuição da acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro. Apesar da maior perda de sólidos no soro, a utilização de ácido láctico aumenta o rendimento dos queijos devido a maior retenção de umidade e redução de acidez do queijo. A coalhada menos ácida, retém mais facilmente o soro e a acidificação favorece a drenagem deste soro aumentando a permeabilidade do gel como consequência da desmineralização da coalhada. O queijo Minas Frescal produzido com uso de acidificação direta apresenta menores alterações na estocagem que os fabricados com uso de fermento láctico. No entanto, Naldini (2002) verificou que o produto obtido por acidificação direta foi mais sensível às

contaminações microbiológicas, devido ao pH final mais elevado e à ausência de bactérias lácticas na competição com outros microrganismos.

Dornellas (1997) ao comparar os queijos produzidos pelo método tradicional e pela acidificação direta quanto as análises microbiológicas após três e trinta dias de fabricação constatou que, embora tenha havido crescimento microbiano durante o armazenamento, a contagem sempre foi maior para os queijos produzidos por acidificação direta, evidenciando que, ocorrendo contaminação, a mesma se desenvolve mais facilmente no queijo sem fermento láctico, funcionando este como inibidor da microbiota contaminante.

Naldini (2002) verificou a viabilidade de *L. monocytogenes*, artificialmente inoculada, em queijos Minas Frescal produzidos convencionalmente, pela adição de fermento láctico e por acidificação direta, estocados por vinte e cinco dias. Observou-se um aumento de até dois ciclos logarítmicos no crescimento do patógeno para o processo de acidificação direta, enquanto que o processo convencional ofereceu uma ação inibitória ao crescimento do patógeno.

Carvalho (2003) ao avaliar a qualidade microbiológica de amostras de queijo Minas Frescal fabricados pelos processos convencional, acidificação direta e ultrafiltração, constatou que o processo de acidificação direta apresentou o maior número de amostras susceptíveis à contaminação por patógenos.

4.5.1 Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal

O gênero *Listeria* está dividido em sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* (*L. murrayi*), *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*. Entre as espécies de *Listeria* existentes, a *L. monocytogenes* é responsabilizada pelo maior número de casos de listeriose relatados, tanto no homem como em animais (McLAUCHLIN et al., 2004).

L. monocytogenes é um patógeno que emergiu na década de 80 como um agente causador de uma doença transmitida por alimentos, denominada listeriose, caracterizada principalmente por septicemia, meningite e meningoencefalite, nos casos mais graves. A listeriose acomete preferencialmente os idosos, crianças, gestantes e pessoas imunodeprimidas. Em pessoas saudáveis, os relatos mais recentes de surtos

têm evidenciado casos de gastroenterite. Devido à alta taxa de mortalidade nos casos graves, é um agente que desperta atenção especial das autoridades governamentais responsáveis pelo controle sanitário e da comunidade científica da área de alimentos. As pesquisas neste campo então passaram a se intensificar visando novos conhecimentos que poderiam contribuir para o seu controle e possível redução dos casos e surtos (KABUKI, 2004).

A dose necessária para que uma infecção causada por *L. monocytogenes* se manifeste ainda permanece obscura. Esta dose varia de indivíduo para indivíduo (FARBER; PETERKIN, 1991).

L. monocytogenes é considerado um contaminante ambiental, cujos meios de transmissão primários para o homem são os alimentos, que são contaminados durante a produção e processamento. Produtos lácteos são particularmente susceptíveis à contaminação por esse patógeno, uma vez que as condições de produção (animais e ambiente de ordenha), armazenamento (baixas temperaturas) e beneficiamento são ideais para a sua multiplicação e sobrevivência (JAY, 2005). Sua transmissão está associada principalmente a alimentos prontos para o consumo, que são estocados a temperaturas de refrigeração por um longo tempo (CHHABRA et al., 1999; EL-ZINEY; DEBEVERE, 1998; JAY, 2005; McLAUCHLIN et al., 2004; MOURA; DESTRO; FRANCO, 1993; PITT; HARDEN, 2000). Animais infectados por esse microrganismo, mesmo que assintomáticos, podem transmiti-lo pelo leite. Além disso, sua presença em leite cru deve ser associada à prevalência desse microrganismo em matéria fecal e silagens (SANAA et al., 1993).

A contaminação de produtos prontos para o consumo com *L. monocytogenes* pode ocorrer em vários estágios, por meio de manipuladores de alimentos, no local de processamento, durante a adição de ingredientes crus, ou após tratamento de letalidade na área de embalagem de alimentos (LIANOU; SOFOS, 2007).

Dentre as diversas formas de controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* em alimentos, destaca-se o uso de bactérias lácticas. Atualmente, inúmeras pesquisas têm avaliado o efeito inibitório das bactérias lácticas e de suas bacteriocinas sobre *Listeria* spp. (ALLENDE et al., 2007; ALVES et al., 2006; BENKERROUM et al., 2002; BROMBERG et al., 2006; HÉQUET, 2007).

Devido à severidade das infecções produzidas, vários países têm adotado uma política severa para controle de *L. monocytogenes*, concentrando a atenção das autoridades públicas e pesquisadores sobre este patógeno. No entanto, o seu controle é difícil devido principalmente à sua ampla distribuição, natureza psicrófila e tolerância a muitos agentes preservativos (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

O Food Safety and Inspection Service – FSIS do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2001) organizou uma lista com precauções que vão desde medidas utilizadas para evitar a contaminação e a recontaminação de alimentos até a identificação dos alimentos que devem ser evitados por pessoas mais suscetíveis aos riscos causados por listeriose, como: gestantes, idosos, crianças e os imunocomprometidos. Dentre os alimentos a serem evitados por estas pessoas estão os queijos de massa macia como Feta, Brie, Camembert, queijos Blue-veined, queijos não pasteurizados, queijos estilo Mexicanos e queijos frescos como o queso Blanco, semelhante ao Minas Frescal (CARVALHO, 2003).

Kells e Gilmour (2004) pesquisaram durante o período de um ano a presença de *L. monocytogenes* em duas plantas de processamento de leite no Reino Unido. Esta bactéria foi encontrada em equipamentos (6,25%), no ambiente (40,6%), leite cru (22,2%) e em nenhuma amostra de leite pasteurizado. Porém foi encontrada *L. welshimeri* em leite pasteurizado, indicando contaminação pós-processamento. Vázquez-Salinas; Rodas-Suárez; Quiñónez-Ramírez, (2001) encontraram em um total de 1.300 amostras de leite cru (México), 23% de amostras positivas para *Listeria* spp, sendo 13 % de *L. monocytogenes*.

Os queijos, devido à sua composição, constituem-se em excelentes substratos para o crescimento de microrganismos, inclusive os da espécie de *L. monocytogenes*, considerada uma bactéria patogênica emergente possuindo capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e ainda habilidade de sobreviver durante longos períodos sob condições adversas (NALDINI, 2002).

Apesar da importância da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, existem poucos estudos sobre a sua incidência em queijos produzidos no Brasil, disponíveis na literatura. Em estudo realizado por Silva *et al.* (2003) em indústrias processadoras de queijo Minas Frescal, da Bahia, esta bactéria foi encontrada em leite

cru e em piso da sala de estocagem de leite. Foram coletadas amostras em diferentes etapas do processamento deste queijo (recepção do leite cru, pasteurização, coagulação e estocagem) e de um total de 218 amostras coletadas, 13 foram positivas para *Listeria* spp., sendo duas caracterizadas como *L. monocytogenes*.

No Paraná, 100 amostras de vários tipos de queijos foram analisados por Moscalewsky *et al.* (2003), onde foram isoladas *Listeria* spp. em 12% das amostras, sendo 6% *L. monocytogenes*.

O queijo Minas frescal comercializado na região de Campinas – SP foi pesquisado em trabalhos de Vieira (2000) e Carvalho (2003). Em vinte amostras analisadas por Vieira, 25% estavam contaminadas por *L. monocytogenes*. Analisando 93 amostras do produto, Carvalho verificou que 11,8% das amostras apresentavam contaminação por *Listeria* spp., sendo 3% por *L. monocytogenes*.

Em Araguaína (TO), Vieira *et al.* (2001) verificaram a ocorrência de 64% de *Listeria* spp. e 8% de *L. monocytogenes* em 50 amostras de queijo Minas Frescal.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Origem e manutenção das linhagens produtoras de bacteriocinas

Neste estudo foram utilizadas linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BROMBERG et al., 2004), pertencentes à Coleção de Culturas do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo e estão apresentadas na Tabela 1. As culturas foram mantidas em caldo MRS (DIFCO™, Detroit, EUA) suplementado com 15% de glicerol (SYNTH, Brasil) (v/v), a -20°C (para uso rotineiro) e a -80°C (cultura estoque). Antes dos experimentos, estas culturas foram reativadas por 3 repiques sucessivos em leite desnatado reconstituído estéril a 10% e incubadas a 37°C por 24 horas.

Tabela 1 - Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e suas origens

Linhagem	Origem	Condições de cultivo
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CTC 204 ¹	Moela de frango <i>in natura</i>	MRS ⁴ /37°C/24h/AE ³
<i>Lactobacillus plantarum</i> CTC 368 ¹	Lingüiça de javali	MRS/37°C/24h/AE ³
<i>Enterococcus avium</i> CTC 469 ¹	CMS ²	MRS/37°C/24h/AE ³
<i>Enterococcus avium</i> CTC 483 ¹	Fígado de frango	MRS/37°C/24h/AE ³
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i> CTC 484 ¹	Fígado de frango <i>in natura</i>	MRS/37°C/24h/AE ³

¹Linhagens isoladas por Bromberg et al. (2004); ²CMS: Carne mecanicamente separada de frango; ³AE: condição de aerobiose; ⁴MRS: caldo Man Rogosa e Sharpe (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960)

5.2 Origem e manutenção das linhagens de *L. monocytogenes*

Foram utilizadas linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes fontes (PORTO, 2001; BARANCELLI, 2009) e uma de referência (*L. monocytogenes* ATCC7644), provenientes da Coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Laticínios da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo (Tabela 2). Durante o experimento, estas culturas foram mantidas em caldo LAPTg (extrato levedura/peptona/triptona/tween80/glicose) suplementado com 0,6% de extrato de levedura (LAPTg-YE) e com 15% glicerol (SYNTH, Brasil) (v/v), a -20°C (para uso rotineiro)

e a -80°C (manutenção por tempo prolongado). Antes dos experimentos, estas linhagens foram reativadas em caldo LAPTg-YE e incubadas a 37°C por 24 horas. Estas linhagens foram subcultivadas mediante duas transferências consecutivas em caldo LAPTg-YE e incubadas a 37°C durante 24 horas.

Tabela 2 - Origem das linhagens de *L. monocytogenes* utilizadas

Linhagem	Origem, região	Fonte	Sorotipo	Condições de cultivo
7644	ATCC	Fluido cerebrospinal	1/2c	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
34.B.P3	Laticínios, Piracicaba ²	Salmoura	1/2c	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
24.D.P2	Laticínios, Piracicaba ²	Estrado câmara fria	4b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
34.4.P4	Laticínios, Piracicaba ²	Salmoura	4b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
14.A.J4	Laticínios, Pirassununga ²	Piso sala pasteurização	4b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
23.1.J4	Laticínios, Pirassununga ²	Caixas plásticas	1/2b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
24.2.J4	Laticínios, Pirassununga ²	Estrado câmara fria 1	4b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
34.A.P3	Laticínios, Piracicaba ²	Salmoura	1/2c	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
51B.P4	Laticínios, Piracicaba ²	Queijo prato	4b	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴
A1	Campinas ³	Alface	ND ⁵	LAPTg+0,6%YE/35°C/24h/AE ⁴

¹ATCC: American Type Culture Collection ²Linhagens isoladas por BARANCELLI et al. (2009);

³Linhagens isoladas por PORTO et al (2001); ⁴AE: condição de aerobiose. ⁵ ND: nada consta.

5.3 Seleção de bactérias lácticas

5.3.1 Avaliação das características de crescimento em leite tornassolado

A linhagem aplicada na produção de bacteriocina em leite e na elaboração do queijo Minas Frescal foi selecionada de acordo com as características de baixa produção de ácido e baixa atividade proteolítica para que não houvesse alteração das propriedades físico-químicas do queijo.

Para tanto, foram avaliadas as reações desenvolvidas pelas culturas produtoras de bacteriocina no leite tornassolado (meio *Litmus*) (HARRIGAN; McCANCE, 1998). Os tubos foram avaliados diariamente e as reações ocorridas foram anotadas, observando-se as características abaixo. Os itens relacionados com a lactose estão na relação abaixo marcados com (1), aqueles relacionados com a caseína estão marcados com (2) e outros, com (3):

- 1 (a) Produção de ácido pela alteração da cor do meio de tornassol para rosa;
- 1 (b) Coagulação do leite pela produção de ácido (coagulação ácida).
- 1 (c) Redução do tornassol e perda de coloração, que pode ocorrer antes ou após outras alterações.
- 1 (d) Produção de gás indicada pela formação de bolhas, que são visíveis somente após a coagulação do leite.
- 2 (a) A cor do meio permanece azul, devido à coagulação do leite pela atividade de enzimas proteolíticas (coágulo doce).
- 2 (b) Peptonização do meio com resultado da hidrólise da caseína pela atividade de enzimas proteolíticas que causam clareamento e perda de opacidade do meio. A proteólise pode também resultar em uma reação alcalina pela produção de amônia.
- 3 A utilização do citrato do meio resulta na produção de uma reação alcalina, mostrada pela alteração da cor tornassol do meio para um azul intenso.

Para o preparo deste meio foi utilizado leite desnatado reconstituído 10% (LDE 10%), no qual foi adicionado 1% (v/v) de solução aquosa de tornassol a 4% e homogeneizado. O meio foi distribuído em alíquotas de 10mL em tubos de ensaio. Em

seguida, estes foram esterilizados a 115°C por 12 minutos. Os tubos foram inoculados em 3% de cultura ativa e incubados a 37°C durante 14 dias.

5.3.2 Avaliação da aceitação organoléptica em leite

Esta análise foi realizada para eliminar, por meio de uma avaliação da acuidade sensorial, as linhagens responsáveis pelo desenvolvimento de fortes defeitos organolépticos no leite. Foram avaliados os defeitos de odor ou sabor desagradável (amargo, sabor de frutas, metálico, etc.) em coágulos das bactérias lácticas inoculadas (3% de inóculo ativo) em leite desnatado reconstituído 10% (LDE 10%) estéril.

Para a avaliação organoléptica foram utilizados frascos com 500mL de LDE 10% em água na proporção de 100g de leite para 1L de água destilada, esterilizado a 115°C por 12 minutos.

As cinco culturas foram avaliadas, com a adição de 3% de cultivo ativo em cada frasco. Os mesmos foram incubados a 37°C até apresentarem a coagulação do meio, por um período máximo de 96 horas. Após esse período, os frascos foram refrigerados a 4-10°C para avaliação do aroma e coágulos obtidos.

5.3.3 Determinação das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas

Para o estudo das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, descritos nos itens a seguir, foram utilizadas as metodologias segundo o International Dairy Federation (IDF Standard 149:1991). Foi utilizado como substrato 1L de LDE 10% em frascos com tampa e capacidade para 1,5L. Para o preparo das amostras, as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas foram ativadas em LDE 10%, à 37°C por 24 horas, no mínimo 3 vezes consecutivas para que as culturas alcançassem sua atividade metabólica máxima. Antes dos repiques, estas foram misturadas vigorosamente por meio de inversões dos frascos fechados para permitir adequada homogeneização.

5.3.3.1 Capacidade de produção de aroma

A capacidade de produzir aromas pelas bactérias lácticas produtoras de bacteriocina foi determinada pela medida diacetil (2,3-butanediona) e acetoina (3-hidroxi-2-butanona), por meio da leitura espectrofotométrica. A 1mL de cultura ativa foi adicionado 2mL de água, 1mL de solução de tungstato de sódio a 10% e 1mL de ácido sulfúrico a 0,33mol/L. A solução foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro (média filtração). Do filtrado, 0,4mL foi adicionado em 4,6mL de água para reagir com 1,0mL de solução de creatina a 0,5% e 1,0mL de solução α -naftol redestilado a 5% (0,5g de α -naftol foi dissolvido em 10mL de NaOH a 2,5mol/L). As amostras foram incubadas a 23-26°C por 1 hora para o desenvolvimento de cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Micronal B582 à 525nm. A concentração de diacetil foi calculada com a utilização da curva padrão de diacetil grau reagente (ponto de ebulição 88-91°C) diluído em leite desnatado (2%), nas concentrações de 50, 150, 250 e 350 mg/Kg. Leite desnatado a 2%, sem nenhum aditivo, foi utilizado como branco.

5.3.3.2 Atividade proteolítica

Este método se baseia na liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano a partir do leite utilizado como substrato pelas bactérias lácticas devido à atividade proteolítica bacteriana. Em tubos estéreis com tampa foram pesados 2g de cultura ativa e adicionado 1mL de água e posteriormente foram adicionados 10mL de solução de ácido tricloroacético 0,72mol/L aos tubos sob agitação vortex. A solução permaneceu sob agitação por 10 minutos e foi filtrada em papel de filtro (média filtração). Em um tubo estéril com tampa foi adicionado 5,0mL do filtrado e 10mL de solução de carbonato de sódio/hexametafosfato de sódio (preparada com 75g de carbonato de sódio anidro e 10g de tetrafosfato diluídos em 500mL de água). O tubo foi homogeneizado vigorosamente e, ainda sob agitação, adicionou-se 3mL de reagente fenol (preparado pouco antes da análise pela reação entre 2 volumes de água por 1 volume de reagente Folin-Ciocalteu). Após 5 minutos aproximadamente, a formação da cor azul atingiu o máximo. Quando necessário, a solução era refiltrada

e a absorbância medida em espectrofotômetro (Micronal B582) a 650nm. Devido à produção de cor por alguns componentes do leite, uma amostra contendo unicamente 2mL de LDE 10% foi utilizada como branco e submetido ao mesmo procedimento, para a determinação de absorbância. A concentração de aminoácidos foi calculada utilizando-se a curva padrão de tirosina, através de 100mg de tirosina recristalizada e seca diluído em 250mL de água. Alíquotas seriadas de: 5, 10, 15, 20, 25 e 30mL da solução foram diluídas, respectivamente, em tubos contendo 100mL de água. De cada concentração transferiu-se 5mL a tubos vazios e adicionou-se 1mL de água. Posteriormente adicionou-se 10mL de solução tricloroacético 0,72mol/L aos tubos sob agitação em agitador vortex. A solução permaneceu sob agitação por 10 minutos e foi filtrada em papel de filtro (média filtração). Em um tubo estéril com tampa foi adicionado 5,0mL do filtrado e 10mL de solução carbonato de sódio/hexametafosfato de sódio (preparado através de 75g de carbonato de sódio anidro e 10 g de tetrafosfato diluídos em 500mL de água). O tubo foi homogeneizado vigorosamente e ainda sob agitação adicionou-se 3mL de reagente fenol previamente preparado.

Após 5 minutos aproximadamente, a formação da cor azul atingiu o máximo. Quando necessário, a solução era refiltrada e a absorbância medida em espectrofotômetro Micronal B582 a 650nm. Como branco foi utilizado água.

5.4 Estudos de produção de bacteriocina em leite

Para o experimento, realizado em duplicata, foram utilizados frascos contendo 450mL de leite desnatado reconstituído estéril (LDE 10%) (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, SP), no qual foram inoculados 2% de cultura produtora de bacteriocinas ($10^6 - 10^7$ UFC/mL). Os recipientes foram incubados a 37°C, durante 5 dias. As amostras para avaliação foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e a intervalos regulares (2 vezes ao dia), para determinação do aumento do número de células viáveis (UFC.mL⁻¹), produção de ácido láctico (pH) e de bacteriocina (UA.mL⁻¹). Foi utilizado como indicadora da atividade das bacteriocinas a linhagem de *L. monocytogenes* ATCC 7644. A população foi determinada pela contagem de células

viáveis, após plaqueamento em profundidade em Ágar MRS, e expressas como número logarítmico da unidade formadora de colônia obtida por mililitro da amostra (Log UFC.mL^{-1}). A acidificação do meio foi avaliada pela medida do pH, obtida em um potenciômetro Micronal. A atividade da bacteriocina foi determinada de acordo com o método de diluição crítica de Mayr-Harting et al.(1972). As amostras foram centrifugadas a 7.500g por 10 minutos a 4°C, e os sobrenadantes coletados. Os sobrenadantes contendo as bacteriocinas foram reservados (S1). Paralelamente, as bacteriocinas aderidas às células foram extraídas, conforme Yang et al. (1992). As biomassas celulares foram ressuspensas em solução de NaCl 100mM pH 2,0 (ajustado com ácido fosfórico a 5%), e mantidas nesta condição por 1 hora a 4°C, sob agitação (em agitador magnético). Após a centrifugação a 7.500g, 4°C, 15 minutos, os sobrenadantes foram obtidos e reservados (S2). Os sobrenadantes S1 e S2 foram misturados, neutralizados a pH 6,5 com soluções de NaOH 5N e NaOH 0,1N e tratados em banho de água a 95°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram sucessivamente diluídos (1:2; v/v) com solução-tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0, usando placas de microtitulação. Alíquotas de 10µL das diluições foram depositadas no Ágar MRS semi-sólido (0,75% agar), previamente inoculado com 1% da linhagem sensível (10^8 UFC.mL^{-1}) e vertido em placas de Agar MRS. Após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 e 24 horas, os meios foram analisados quanto à formação de halos claros de inibição, onde as diluições foram depositadas. A atividade da bacteriocina foi definida como a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100, e expressa como unidade arbitrária por mililitro (UA.mL^{-1}).

5.4.1 Estudos de otimização da produção de bacteriocinas através da adição de nutrientes em leite

Para avaliação da produção de bacteriocinas, efetuou-se um estudo do efeito da adição de nutrientes ao leite utilizado como meio de cultivo. Foram utilizados como nutrientes, o extrato de levedura, por ser fonte de aminoácidos essenciais e proteínas responsáveis pelo crescimento celular; glicose, utilizada como fonte de carbono; oligofrutose e inulina, por serem prebióticos. Os prebióticos são definidos

como ingredientes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente a multiplicação e/ou atividade de uma ou mais espécies de bactérias no cólon e, dessa forma, afetam benéficamente o hospedeiro (HAARMAN; KNOL, 2005).

Segundo Savadogo et al. (2006), a síntese de bacteriocinas é influenciada diretamente pela fonte de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo. A principal fonte de carbono é a glicose, mas são também relatadas a lactose e a galactose.

Neste estudo foram utilizados frascos contendo 450mL de LDE 10%, no qual foram adicionados os nutrientes, resultando nas seguintes formulações: LDE 10% + 1% de glicose (dextrose P.A.); LDE 10% + 1% de extrato de levedura; LDE 10% + 2% de oligofrutose e LDE 10% + 2% de inulina.

Os ingredientes foram adicionados em proporções determinadas ao meio de cultivo e, em seguida, foram autoclavados a 121°C/15 minutos. Para o teste, os meios foram inoculados com 2% (v/v) da cultura ativa selecionada e a fermentação foi realizada a 37°C por 5 dias. As amostras para avaliação foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e a intervalos regulares (2 vezes ao dia), para determinação do aumento do número de células (UFC.mL⁻¹) e produção de ácido láctico (pH) e de bacteriocina (UA.mL⁻¹). Foi utilizada a linhagem de *L. monocytogenes* ATCC 7644 como indicadora da atividade das bacteriocinas.

A população de bactérias lácticas foi determinada pela contagem de células viáveis, após plaqueamento em profundidade das diluições apropriadas das amostras de ágar MRS tamponado, e expressas como número logarítmico da unidade formadora de colônia obtida por mililitro da amostra (Log UFC.mL⁻¹). A acidificação do meio e a produção de bacteriocina foram avaliadas conforme descrito no item 5.4.

A partir dos dados obtidos foram selecionados os nutrientes que contribuíram para um aumento mais significativo maior produção de bacteriocina para serem avaliados em conjunto, realizando dessa forma, os mesmos procedimentos, descritos anteriormente.

O experimento foi realizado em duplicata, e a partir dos dados obtidos, as médias foram calculadas, assim como os seguintes parâmetros de fermentação: número de gerações (n), tempo de geração (g) e taxa específica de crescimento

bacteriano (μ), utilizando-se as equações 1, 2 e 3 que estão apresentadas a seguir (PELCZAR et al., 2005).

$$n = (\ln Z - \ln Z_0) / \ln 2 \quad (1)$$

$$g = \Delta t / n \quad (2)$$

$$\mu = \ln 2 / g \quad (3)$$

Onde:

Z representa o crescimento final e Z_0 o crescimento inicial, que foram calculados por meio da análise de regressão linear do crescimento das linhagens em UFC.mL⁻¹ durante a fase exponencial;

Δt é o intervalo de tempo entre o início e fim do crescimento bacteriano;

A produção de ácido láctico foi avaliada pela medida do pH que foi obtida em um potenciômetro Micronal. A atividade acidificante foi expressa como a diferença entre o valor de pH obtido em 0 e 104 horas de crescimento ($\Delta \text{pH}_{104\text{h}}$).

O rendimento da produção de bacteriocina ou atividade específica, que é o rendimento da bacteriocina por unidade de massa celular, foi calculado pela equação 4 apresentada a seguir (PARENTE; RICCIARDI, 1994):

$$B - B_0 = Y_{B/X} \cdot (X - X_0) \quad (4)$$

Onde:

B e B_0 são, respectivamente, a atividade final e inicial da bacteriocina (UA L⁻¹).

X e X_0 são, respectivamente, a concentração de biomassa celular final e inicial (g CMC L⁻¹).

$Y_{B/X}$ é o rendimento máximo da bacteriocina por unidade de biomassa produzida.

O rendimento máximo de bacteriocina por unidade de biomassa produzida ($Y_{B/X}$) foi calculada pela substituição de $B - B_0$, pelo título máximo da bacteriocina observado durante o crescimento da bactéria, ou seja, utilizando $(B - B_0)_{\text{max}}$, e $X - X_0$

correspondente com a biomassa cuja atividade máxima de bacteriocina foi observada.

Com base nos cálculos realizados neste estudo foram selecionados os parâmetros de formulação do enriquecimento do meio de cultivo para otimização da produção de bacteriocinas e o tempo ideal de fermentação, sendo que estes parâmetros foram fixados para os testes posteriores.

5.4.2 Influência da concentração de cloreto de sódio na produção de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

A cultura produtoras de bacteriocina *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 foi inoculada na proporção de 2% em recipientes contendo LDE 10% suplementado com 1% de extrato de levedura e 1% de glicose, adicionado de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (0; 0,5%; 1,5% e 3,0%), e a seguir, incubadas a 37 ± 1 °C durante 24 horas.

As amostras para avaliação foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e a intervalos regulares de 2 horas até completar 12 horas e após 24 horas de fermentação, para determinação da contagem de células viáveis de bactérias lácticas (UFC mL⁻¹) em ágar MRS, determinação do pH e avaliação do título da bacteriocina (UA mL⁻¹), pelo método de diluição crítica (MAYR-HARTING et al., 1972), utilizando-se a linhagem de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 como indicadora da atividade das bacteriocinas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.5 Avaliação da sensibilidade de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* à bacteriocina produzida por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

Neste estudo foram inoculados 2% (v/v) da cultura ativa *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em frascos com tampa contendo 200mL de meio de cultivo selecionado, a 37°C durante o período de incubação determinado. As amostras para avaliação foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e após o período de incubação, para determinação da população (UFC.mL⁻¹) e produção de ácido láctico (pH) e de

bacteriocina (UA.mL^{-1}). Foram utilizadas todas as linhagens de *Listeria monocytogenes* como indicadoras da atividade das bacteriocinas.

A população de bactérias lácticas foi determinada pela contagem de células viáveis, após plaqueamento em profundidade das diluições apropriadas das amostras de Ágar MRS tamponado, e expressas como número logarítmico da unidade formadora de colônia obtida por mililitro da amostra (Log UFC.mL^{-1}). A acidificação do meio foi avaliada pela medida do pH obtida em um potenciômetro Micronal. A produção de bacteriocina foi avaliada pelo método de diluição crítica de Mayr-Harting (1972) e a atividade expressa como unidade arbitrária por mililitro (UA.mL^{-1}).

O experimento foi realizado em duplicata e os resultados de sensibilidade à bacteriocina obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey com nível de significância ($P < 0,05$) pelo programa estatístico STATISTICA 9.0, Statsoft.

Para a aplicação da *L. monocytogenes* à massa de queijo Minas Frescal, foi selecionada a linhagem com maior sensibilidade à ação da bacteriocina.

5.6 Concentração do leite fermentado contendo bacteriocinas por *spray-drying*

Dessa forma, com base nos parâmetros selecionados para a produção de bacteriocina, do meio de cultivo e tempo de incubação, foi realizada a fermentação da bactéria láctica em frascos com tampa contendo, cada um, 500 mL do meio de cultivo estéril, através na inoculação de 2% da cultura produtora ativa. Os frascos foram incubados à 37°C pelo tempo determinado. Após o período de fermentação, o leite fermentado foi concentrado através da secagem por *spray-drying*, resultando em um bio-ingrediente. Os experimentos foram realizados usando um Mini *Spray Dryer* modelo Büchi B-290 com bico pulverizador de 1,5 milímetro de diâmetro, capacidade de evaporação de 1,0L/hora, altura e largura da câmara de secagem de 110 e 30 cm, respectivamente (Figura 1).

Figura 1 - Spray-dryer modelo Buchi-290, com bico pulverizador de 1,5 milímetro de diâmetro, capacidade de evaporação de 1,0L/hora, e câmara de secagem com altura de 110 e largura de 30 cm

Os parâmetros de operação do equipamento foram temperatura de entrada do ar a 110°C, fluxo do ar a 439 L/h e vazão a 6 mL/min. Após a secagem, o bio-ingrediente (extrato seco contendo bacteriocinas) foi armazenado em recipiente estéril com tampa sob refrigeração.

5.7 Esterilização do bio-ingrediente por radiação gama

Como o processo de secagem do bio-ingrediente foi realizado em condições ambientais não estéreis, houve contaminação microbiológica do material obtido. Além disso, o processo de secagem por *spray-drying* na temperatura aplicada não é letal às bactérias lácticas responsáveis pela produção de bacteriocina. Dessa forma, para a eliminação da interferência de microrganismos na posterior produção do queijo Minas Frescal, optou-se pela descontaminação do bio-ingrediente através da radiação gama.

Na esterilização de alimentos através da irradiação gama, são aplicadas doses de energia ionizantes suficientes, que criam cargas positivas ou negativas; a formação dessas cargas resulta em efeitos químicos e biológicos que impedem a divisão celular em bactérias pela ruptura de sua estrutura molecular (SATIN,1997).

A quantificação das doses de radiação se faz em função da energia absorvida pelo produto irradiado. A unidade de medida utilizada é o Gray (Gy) ou quilogray (kGy) e um Gray equivale a um Joule de energia por quilograma de alimento irradiado. Para aplicação em alimentos a maioria das doses utilizadas se encontram entre 0,1 e 7,0 kGy (CAMARGO; WALTER, 2007).

A esterilização do material foi realizada pela empresa CBE EMBRARAD (Jarinu, São Paulo). Para tanto, foram realizados testes preliminares para determinação da dose aplicada, em que foram aplicadas as seguintes doses (kGy): 0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 12,0; 15,0. Os testes foram realizados em duplicata, e após a aplicação das doses de energia ionizante, procedeu-se à determinação das análises microbiológicas e do pH. Para cada dose aplicada e sua respectiva repetição, foi pesado 1g do bio-ingrediente e diluído em 9 mL de água peptonada e, em seguida, homogeneizado para as análises posteriores.

Logo após, procedeu-se a contagem de células viáveis de bactérias lácticas, após incubação a 37°C durante 24 a 48 horas em ágar MRS e de bolores e leveduras, após incubação a 25±1°C durante 5 dias em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC); determinação do pH e avaliação do título de bacteriocina, utilizando-se como indicadoras as linhagens de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (referência) e 344P4 (isolada em laticínio), sendo que, a atividade de bacteriocina foi avaliada no bio-ingrediente sem e com tratamento térmico, para avaliação de sua estabilidade térmica.

5.8 Emprego do bio-ingrediente no processamento de queijo Minas Frescal para controle de *L. monocytogenes*

5.8.1 Processamento do queijo Minas Frescal e inoculação de *L. monocytogenes*

Os queijos foram processados segundo técnica descrita por Furtado; Lourenço Neto (1994), com adaptações, esquematizadas na Figura 3. Para a fabricação dos mesmos foi utilizado leite tipo A microfiltrado.

Para microfiltração foi utilizada uma unidade piloto MS1 (Tetra-Laval, França) equipada com 0,24m² de membranas cerâmicas UTP Membralox® (Société des Céramiques Techniques, Bazet, França) com tamanho médio de poro de 1,4µm (Figura 2). O procedimento de limpeza deste equipamento foi feito por meio de recirculação com água deionizada (Deionizador DE 3500, Permution) a 50°C, hidróxido de sódio (Merck) e ácido nítrico 65% (Merck). A sanitização foi realizada com hipoclorito de sódio 10 a 12% (Chemco). As condições definidas de fluxo e de qualidade microbiológica (nenhuma UFC em 100 mL) da água do último enxágue foram critérios para avaliação de limpeza e sanitização do equipamento.

Figura 2 – Unidade piloto de microfiltração (Tetra-Laval, França)

Foi utilizado leite tipo A desnatado (0,4 a 0,5% de gordura), pasteurizado e homogeneizado, marca comercial Xandô (Laticínios Xandô, Araras, Brasil). Na sala de processamento, o leite foi transferido para o tanque de equilíbrio do equipamento de microfiltração. Em seguida, foi submetido à circulação entre as membranas, com uma pressão uniforme de 0,6 bars.

Os tratamentos empregados na fabricação do queijo por acidificação direta com ácido láctico são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Variáveis empregadas na fabricação do queijo minas frescal

Queijos	Bio-ingrediente**	<i>Listeria monocytogenes</i> ***
Controle*	-	-
T1	-	+
T2	+	+

+ = Adição. - = Sem adição.

*: Sem adição de bio-ingrediente ou contaminante (controle).

**Bio-ingrediente: Leite fermentado desidratado estéril, contendo bacteriocina.

*** Microrganismo contaminante: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Todo o processo de fabricação do queijo Minas Frescal foi realizado em condições de assepsia, com todos os utensílios esterilizados previamente, em fluxo laminar.

Inicialmente, o leite microfiltrado foi aquecido a 42°C e em seguida pesado e adicionado cloreto de cálcio (marca Synth, Diadema, Brasil), na proporção de 6mL de solução a 50% para 15 Kg de leite. Para acidificação direta, foi adicionado ácido láctico a 85% (grau alimentício, Purac Sínteses, Rio de Janeiro, Brasil), na proporção de 3,75mL, previamente diluído em água destilada a 10% para evitar a precipitação das proteínas. Após a acidificação, empregou-se enzima quimosina Chymax Extra (Chr. Hansen, Milwaukee, Estados Unidos), na proporção de 3,75mL, previamente diluído em água destilada a 0,2%, segundo orientações do fabricante. Após o tempo de repouso (aproximadamente 35 minutos), foi realizado o corte da massa em tamanho padronizado para o queijo Minas Frescal (cubos de 1,5 cm x 1,5 cm), e repouso da massa por três minutos, para dessoragem da massa. Em seguida, realizou-se a agitação manual da coalhada por 25 minutos. A salga da massa foi

realizada com a adição de sal (marca comercial Cisne, Cabo Frio, Brasil) ao soro após dessoragem parcial. A quantidade de sal adicionada equivaleu aproximadamente a 2% do peso líquido estimado dos queijos. Logo após, o soro restante foi removido, e a massa (sem prensagem) foi subdivida em porções individuais, equivalentes a 40g, para a aplicação do controle e dos tratamentos 1 e 2; e acondicionadas em sacos plásticos ("stomacher"). As massas foram subdivididas de acordo com os dias de análises (0, 3, 5, 7, 15 e 21 dias) e em duplicata, para cada tratamento. A enformagem foi procedida em fôrmas com pequena capacidade, para facilitar a contaminação com *L. monocytogenes*.

Para o Controle, as massas subdivididas foram acondicionadas em embalagens plásticas perfuradas e estéreis, localizadas no interior dos sacos de *stomacher*, para a desoragem final.

Para T1 e T2, foi inoculado à massa cepas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, na proporção de $10^3 - 10^4$ UFC/g de queijo. O microrganismo foi reativado sucessivamente por três repiques em LDE 10% e incubado a 37°C por 24 horas. Para a inoculação, o microrganismo, depois de ativado, foi diluído sucessivamente em água peptonada, até a obtenção de 10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes*, e adicionado 0,1mL da diluição apropriada à massa de queijo. Para a determinação aproximada da quantidade de microrganismos inoculada foram realizados testes preliminares, respeitando as mesmas condições de incubação citadas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A quantidade de células viáveis foi determinada por plaqueamento em profundidade.

Para T1 inoculou-se à massa 0,1 mL de suspensão contaminante de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e, para T2 inoculou-se à massa, além do inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 7644, mais 10% de bio-ingrediente. Logo em seguida, para T1 e T2, as massas foram homogeneizadas delicadamente e acondicionadas em embalagens plásticas perfuradas e estéreis, localizadas no interior dos sacos de *stomacher*, para a desoragem final.

As análises microbiológicas foram realizadas após 0, 3, 5, 7, 15 e 21 dias de fabricação do queijo. Os queijos permaneceram em incubadoras reguladas a 6 ± 1 °C por 21 dias.

Figura 3 - Fluxograma de processamento de queijo Minas Frescal, pelo método de acidificação direta, que foi empregado neste estudo

5.8.2 Monitoramento microbiológico do processamento dos queijos

5.8.2.1 Amostragem

Foram coletadas amostras nos queijos referentes ao controle e a T1 e T2, no dia seguinte à fabricação (produto final – 1 dia) e após 3, 5, 7, 15 e 21 dias de armazenamento. Durante todo o período de análise do produto, todos os queijos foram armazenados em cabine refrigerada, a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Cada unidade amostral foi retirada da embalagem de forma asséptica, com desinfecção da embalagem externa com etanol a 70%. As amostras de queijos (5g) foram homogeneizadas em 45ml de citrato trisódico (20g/L), durante 2 minutos em “stomacher”. No preparo das diluições decimais sucessivas, foi utilizada solução aquosa peptonada 0,1%.

5.8.2.2 Detecção e enumeração de *Listeria monocytogenes*

Foram realizadas análises microbiológicas para a detecção de *Listeria monocytogenes* nos queijos referentes ao controle e quantificação do patógeno em T1 e T2. A detecção dessa bactéria no queijo controle foi importante para determinação de possível contaminação, o que poderia influenciar negativamente na avaliação da sensibilidade deste patógeno frente à ação da bacteriocina. Para T1 e T2, a quantificação dessa bactéria foi realizada com o intuito de monitorar o desenvolvimento e a inibição da mesma durante o período de armazenamento dos queijos. Foi avaliado o desenvolvimento das cepas de *Listeria* no queijo T1 (queijo contaminado com *L. monocytogenes*) e no queijo T2 (queijo contaminado com *L. monocytogenes* com adição de bio-ingrediente), na qual foi avaliada a influência deste antimicrobiano sobre o patógeno. Esta influência foi evidenciada através dos resultados obtidos pela contagem de *L. monocytogenes* entre os dois processos de fabricação dos Queijos Minas Frescal.

Para tanto, foram homogeneizados 5g de cada queijo em 45mL de citrato trisódico (20g/L), durante 2 minutos em “stomacher”. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução aquosa peptonada 0,1%. O plaqueamento foi realizado por profundidade em ágar seletivo Oxford (Oxoid) por 48h a 35°C .

5.8.3 Determinação da atividade da bacteriocina presente nos queijos

A presença de bacteriocinas nos queijos foi determinada pelo método de diluição crítica, adaptado de Mayr-Harting e outros (1972), após 1, 3,5,7, 15 e 21 dias de estocagem a $6 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A extração de bacteriocina a partir das amostras de queijos foi realizada segundo Rodriguez et al. (2001). Porções de 5g de queijo foram homogeneizadas em 20mL de HCL 0,02N a 70°C e submetidas à centrifugação (7.500g/15min a 4°C) (centrífuga Cientec CT 6000-R)). Os sobrenadantes foram recolhidos e esterilizados por tratamento térmico a 85°C por 5 minutos e diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 7,0, utilizando placas de microtitulação. 10 μL de cada diluição foi depositado sobre placas contendo TSA (Difco, Sparks, EUA) e uma sobrecamada de LAPTg-YE semi-sólido (0,9% ágar), contendo *L. monocytogenes* ATCC 7644, utilizada como cultura indicadora. As placas foram incubadas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. O título da bacteriocina produzida nestes extratos foi expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA.mL^{-1}).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção da bactéria láctica para produção de bacteriocina

As linhagens de bactérias lácticas deste trabalho apresentam características de produção de bacteriocina em meios sintéticos, como MRS, TSB e APT, estudadas por Nogueira (2010).

Dessa forma, antes do estudo da produção de bacteriocina em leite foi necessária a seleção dessas linhagens, devido à posterior aplicação das mesmas à fabricação do queijo Minas Frescal. Portanto, escolheu-se a linhagem que apresentou a menor alteração do meio, quando cultivada em leite tornassolado, evidenciado por sua baixa produção de ácido e baixa atividade proteolítica pois, ao ser adicionada à fabricação do queijo Minas Frescal, não alteraria suas características físico-químicas. Da mesma forma, a linhagem escolhida, após cultivada em leite não produziu aromas que não eram característicos a este tipo de queijo.

6.1.1 Avaliação das características de crescimento em leite tornassolado

Das cinco linhagens lácticas avaliadas (Figura 6), três linhagens: *Lactobacillus plantarum* CTC 368, *Enterococcus avium* CTC 469 e *Enterococcus avium* CTC 483 foram excluídas por fermentaram a lactose com a produção de ácido, transformando a cor do indicador do meio para cor-de-rosa, ocasionando a coagulação do leite com produção de soro. O meio *Litmus* foi reduzido na parte do fundo do tubo tornando o meio branco.

Figura 4 – Características de crescimento das bactérias lácticas em leite tornassolado

As linhagens selecionadas foram: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, que apresentaram baixa capacidade acidificante e nenhuma atividade proteolítica, visualizado pela não alteração da cor do indicador e não coagulação do meio. Dessa forma, devido a estas características no leite tornassolado, essas duas linhagens foram consideradas aptas para serem aplicadas nos estudos posteriores de produção de bacteriocina e aplicação em queijo Minas frescal.

O meio *Litmus* é amplamente utilizado para a seleção de bactérias lácticas. Em seus estudos, Rodríguez et al. (2000), utilizaram este meio para seleção de bactérias lácticas, para a verificação da produção de CO₂ através da utilização de glicose como substrato da fermentação.

6.1.2 Avaliação da aceitação organoléptica em leite

As características sensoriais de fermentação em leite desnatado reconstituído esterilizado das cinco linhagens avaliadas foram listadas na Tabela 4. Tendo em vista a padronização de todas as condições, observou-se, a partir dos resultados obtidos, nítidas diferenças entre as culturas lácticas, tanto no que diz respeito às características do coágulo como no sabor e aroma.

Garcia (1984) ao avaliar oitenta linhagens de bactérias lácticas pelo teste organoléptico selecionou cinquenta e sete, pois apresentaram as melhores características, sendo que as não selecionadas apresentaram sabor e odor de malte.

Tabela 4 - Descrição dos aromas e coágulos desenvolvidos pelas bactérias lácticas em leite desnatado reconstituído estéril

Linhagem	Leite reconstituído estéril
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CTC 204	Sem coagulação (após 96h). Aroma levemente adocicado.
<i>Lactobacillus plantarum</i> CTC 368	Sem coagulação (após 96h). Aroma levemente adocicado.
<i>Enterococcus avium</i> CTC 469	Aroma desagradável, coágulo quebradiço
<i>Enterococcus avium</i> CTC 483	Aroma intenso de queijo frescal, coágulo quebradiço
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i> CTC 484 ¹	Aroma intensamente desagradável, coágulo quebradiço

Pelo exposto na Tabela 4, das duas linhagens iniciais selecionadas, apenas a linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 foi selecionada pois apresentou características de aroma e coagulação desejáveis para a sua aplicação ao queijo Minas frescal, sendo excluído o *Lc. lactis* CTC 484.

6.1.3 Avaliação das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas

A cultura selecionada *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 foi avaliada quanto à capacidade de produção de aroma e atividade proteolítica.

Neste estudo foram utilizadas como linhagens de referência *Lc lactis* susp. *cremoris* com alta capacidade proteolítica e a cultura produtora de diacetil *Lc lactis* susp. *lactis* biovar *diacetylactis*.

A linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 não apresentou características de produção de aroma e atividade proteolítica, o que demonstra, de forma coerente, a compatibilidade com os resultados obtidos em leite tornassolado. Os resultados são demonstrados na Tabela 5.

Estas características são desejáveis para a sua aplicação ao queijo Minas Frescal, já que a produção de aromas e a atividade proteolítica descaracterizariam o produto.

Tabela 5 - Concentração de tirosina (mg/mL) e de diacetil em amostras de leite desnatado reconstituído (LDR 10,0%) inoculado com 3 linhagens de bactérias lácticas, fermentadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas

Linhagem avaliada	Propriedades Tecnológicas	
	Concentração de Tirosina (mg/mL)	Concentração de diacetil (mg/kg)
<i>Lc lactis</i> susp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	0,0157	28,0
<i>Lc lactis</i> susp. <i>cremoris</i>	0,0062	29,3
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CTC 204	0,0081	0,0

6.2 Produção de bacteriocinas em LDR 10% e o efeito da adição de nutrientes ao meio de cultivo sobre a produção de bacteriocinas

De acordo com Tagg et al (1976), a biossíntese de bacteriocinas ocorre principalmente na fase logarítmica de crescimento, podendo, porém, atingir sua produção máxima em diferentes fases de crescimento.

As condições de cultivo podem influenciar a produção de bacteriocinas. Algumas espécies Gram-positivas produzem bacteriocinas apenas em meios sólidos. Alguns estreptococos apresentam aumento da produção destes compostos à medida que se aumenta a viscosidade de um meio líquido. Determinados componentes do meio podem ser necessários para a produção de bacteriocinas, tais como: suplementação de proteínas, íons metálicos e açúcares. A temperatura, pH, fase de crescimento e potencial redox também podem afetar a produção de bacteriocinas (LEAL-SÁNCHEZ *et al*, 2002).

O halo de inibição devido à ação da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 é ilustrado na Figura 5. Os resultados do crescimento da população bacteriana (Log.UFCmL^{-1}), produção de ácido láctico (pH) e de bacteriocinas (UA.mL^{-1}) em leite desnatado

reconstituído estéril (LDE 10%) são mostrados na Figura 6, cujos dados também podem ser verificados nas tabelas encontradas no anexo B.

Figura 5 – (I) Placa controle contendo *L. monocytogenes* ATCC 7644; (II) Inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644 pela bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, pelo método de diluição crítica de MAYR-HARTING et al. (1972)

Figura 6 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% a 37°C por 104 horas

A atividade da bacteriocina produzida em LDE 10% foi detectada a partir de 8 horas de fermentação, com aumento e alcance máximo de produção, equivalente a 300UA/mL após 24 horas, quando a cultura atingiu população máxima ($7,77 \log \text{UFC.mL}^{-1}$), correspondendo à maior biomassa formada ao final da fase exponencial de reprodução, sendo que a produção de bacteriocinas não foi observada após 80 horas de fermentação. O ΔpH , variação entre o pH inicial (0h) e final (104h) do meio de cultivo fermentado por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 foi de 0,36.

Mitra et al. (2010), ao avaliar o espectro de inibição de nisina produzida por *Lactococcus lactis* W8 contra *L. plantarum* NCDO 955, observou uma atividade de 2400 UA.mL^{-1} após 6 horas de fermentação em leite bovino comercial.

Para otimização da produção de bacteriocinas, foi realizado sob as mesmas condições de incubação em LDE 10%, um estudo da suplementação do meio, mostrado nas Figuras 7 a 10.

Em LDE 10% suplementado com 1% de glicose, a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 apresentou população máxima após 48 horas ($8,04 \log \text{UFC.mL}^{-1}$). Em seguida, teve início a fase de declínio até o término da fermentação ($7,60 \log \text{UFC.mL}^{-1}$). A variação entre o pH inicial e final do leite foi de 1,2. Foi detectada atividade de bacteriocina a partir de 8 horas de incubação, com título de 200 UA.mL^{-1} e a máxima atividade (700 UA.mL^{-1}) foi obtida após 32h, seguido de constante queda até o fim de sua produção, após 56 horas (Figura 7).

Para a suplementação de 1% de extrato de levedura ao LDE 10%, a cultura apresentou população máxima de $9,11 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ após 24 horas de desenvolvimento, mantendo-se praticamente estável até 80 horas, porém com redução de $1 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ ao fim do processo. Quanto a variação entre o pH inicial e final do leite foi de 0,79. A partir de 8 horas de incubação foi detectada atividade de bacteriocina (800 UA.mL^{-1}), com alcance máximo de 1200 UA.mL^{-1} após 24 horas, ao fim da fase exponencial, seguido de constante queda até o fim de sua produção, após 56 horas (Figura 8).

A linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com 2% de inulina atingiu população máxima de $7,67 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ após 24 horas,

apresentando sucessivos picos de queda e aumento da população bacteriana, com alcance de $7,88 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ ao término de 104 horas incubação. O ΔpH foi de 1,52. A atividade de bacteriocina foi detectada após 24 horas, com título máximo de 500UA.mL^{-1} , correspondendo ao fim da fase exponencial. Em seguida, teve início a fase de declínio na produção, com término após 56 horas (Figura 9).

Em LDE 10% enriquecido com 1% de oligofrutose, a linhagem apresentou ΔpH de 1,52. Após 48 horas de incubação, atingiu população máxima de $7,94 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, permanecendo praticamente estável até fim do processo. Com 8 horas de incubação foi detectada atividade de bacteriocina de 300UA.mL^{-1} , com produção máxima de 500UA.mL^{-1} após 32 horas, seguido de constante queda até o fim de sua produção, após 56 horas (Figura 10).

Figura 7 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose 1% a 37°C por 104 horas

Figura 8 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com extrato de levedura 1% a 37°C por 104 horas

Figura 9 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com inulina 2% a 37°C por 104 horas

Figura 10 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com oligofrutose 2% a 37°C por 104 horas

Segundo Todorov e Dicks (2004), a produção de bacteriocinas é fortemente dependente das fontes de nutrientes presentes no meio de cultivo, sendo que sua atividade nem sempre é correlacionada à massa celular ou à taxa de crescimento da linhagem produtora.

A importância de prebióticos para o crescimento e produção de bacteriocinas por algumas linhagens de bactérias lácticas foi enfatizada por alguns autores. Em seus estudos, Vamanu; Vamanu (2010) não observaram aumento na produção de bacteriocinas pela linhagem *Lactobacillus paracasei* CMGB16 quando da adição de inulina ao meio de cultivo MRS, entretanto, a biomassa celular obtida foi maior para o MRS suplementado quando comparado ao sem suplementação. Audisio; Oliver; Apella (2001) ao avaliarem a influência de frutooligossacarídeos (FOS), como fonte de carbono, concluíram que, embora algumas bactérias lácticas desenvolvam na presença de diferentes prebióticos, a escolha do tipo e da concentração da fonte de carbono utilizada é determinante para a produção de bacteriocinas.

O extrato de levedura é utilizado como fonte de vitaminas, minerais e ácidos nucleicos. Sua influência foi avaliada por Avonts *et al.* (2004) em linhagens de *Lactobacillus*, para estudo do crescimento microbiano e da produção de bacteriocinas,

no qual foi comparada a adição de extrato de levedura ao leite em comparação ao MRS, utilizados como meio de cultivo. Embora a produção de bacteriocinas tenha sido maior em MRS para todos os microrganismos avaliados, a atividade de bacteriocinas foi mais estável quando produzida em leite sem e com suplementação; além disso, a adição de extrato de levedura ao leite proporcionou aumento populacional e de produção de bacteriocinas para todos os microrganismos avaliados.

A linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 apresentou produção de bacteriocina em LDE 10% sem suplementação e em todos os meios suplementados. Contudo, melhores desempenhos foram observados, em ordem decrescente de produção, para as suplementações de extrato de levedura, glicose e oligofrutose, quando comparados ao LDE 10%. Baseando-se nos resultados obtidos pelo estudo da adição de suplemento ao leite, foi avaliado o efeito da adição combinada dos suplementos, sendo analisadas a combinação de extrato de levedura com glicose e extrato de levedura com oligofrutose. As Figuras 11 e 12 representam os resultados obtidos pela combinação de nutrientes.

Em LDE 10% enriquecido com 1% de glicose e 1% de extrato de levedura, a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 atingiu população máxima de $9,17 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ após 8 horas de cultivo, mantendo-se estável até 32 horas. Autólise celular de $1,75 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ foi verificada durante 32 e 56 horas de fermentação e, em seguida, aumento progressivo até o fim do processo. A variação entre o pH final e inicial foi de 1,8, sendo o valor máximo registrado entre todas as suplementações estudadas. A atividade de bacteriocinas foi registrada após 8 horas de incubação (6400 UA.mL^{-1}), com máxima atividade de 12800 UA.mL^{-1} após 32 e 56 horas de incubação (Figura 11).

Já para LDE 10% enriquecido com 2% de oligofrutose e 1% de extrato de levedura, a cultura apresentou máximo crescimento de $9,22 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ após 24 horas de fermentação, seguido de queda contínua até fim do processo. Quanto a variação entre o pH inicial e final do leite foi de 1,5. A partir de 8 e 32 horas de incubação foi detectada máxima atividade de bacteriocina (2400 UA.mL^{-1}), seguido de queda na produção até o fim de sua produção (Figura 12).

Figura 11- Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose 1% e extrato de levedura 1% a 37°C por 104 horas

Figura 12 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com extrato de levedura 1% e oligofrutose 2% a 37°C por 104 horas

6.2.1 Estudo de Parâmetros Cinéticos

Com base nos resultados anteriores obtidos através do estudo da suplementação do LDE 10%, observou-se que para a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 houve uma maior produção de bacteriocina (12800 UA/mL após 32 horas de cultivo) quando o meio de cultivo LDE 10% foi suplementado com 1% de extrato de levedura e 1% de glicose.

No entanto, para a obtenção de parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento bacteriano, foi realizada uma nova curva para detalhar as fases latente e exponencial de crescimento da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 para os meios de cultivo LDE 10% (sem suplementação – Figura 13) e LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura (Figura 14), nos intervalos de 0 a 24 horas.

A partir dos dados obtidos, foram analisados os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos para crescimento e produção de bacteriocinas pelos diferentes meios de cultivo, apresentados no Anexo C.

Figura 13 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% a 37°C por 24 horas

Figura 14 - Crescimento da população bacteriana e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose 1% e extrato de levedura 1% a 37°C por 24 horas

A linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 cultivada em LDE 10% suplementado por 1% de extrato de levedura e 1% de glicose apresentou crescimento mais rápido ($1,31 \text{ h}^{-1}$) e maior rendimento da produção de bacteriocinas ($1110,91 \text{ UA.log UFC}^{-1}$) quando comparado ao LDE 10% sem suplementação, com valores de $0,97 \text{ h}^{-1}$ para crescimento e de $247,79 \text{ UA.log UFC}^{-1}$ para rendimento da produção bacteriocinas. Verificou-se também que, para o meio suplementado houve maior redução de pH (2,08) em relação ao LDE 10% (0,10). Os resultados demonstram que, apesar da menor atividade, esta linhagem produz bacteriocina em leite desnatado reconstituído, sendo que essa produção é influenciada pela suplementação do meio através da adição de nutrientes.

Existem muitas controvérsias na literatura científica sobre a capacidade acidificante e atividade de aminopeptidases das culturas produtoras de bacteriocinas. Andrighetto et al. (2001) e Sarantinopoulos et al. (2001) relataram baixa atividade acidificante de culturas bacteriocinogênicas, e Oumer et al. (2001b) e Garde et al. (2002) não observaram alteração significativa do pH de queijo Hispânico tanto na

presença de *E. faecalis* quanto na de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Contudo, Oumer et al. (2001a) e Ávila et al. (2005) verificaram alteração no pH de leite e queijo quando empregaram culturas bacteriocinogênicas.

Figura 15 - Indicativo dos parâmetros cinéticos de crescimento (Δ máximo Log.UFCmL⁻¹), taxa específica de crescimento bacteriano (μ), acidificação (Δ máximo de pH) e rendimento máximo de produção de bacteriocinas (Y_{max} em UA.mL⁻¹) durante fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% (sem suplementação) e LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura, a 37°C por 48 horas

6.2.2 Sensibilidade ao cloreto de sódio

O cloreto de sódio (NaCl) tem sido empregado em alimentos desde o início da civilização, datando de 2700 a.C. (JAY, 2005; SALT INSTITUTE, 2011). Dentre diversas funções, o NaCl confere características sensoriais aos alimentos e dependendo da concentração utilizada, possui ação conservante, através da inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos pela diminuição de atividade de água nos alimentos (RAVISHANKAR; JUNEJA, 2000). Devido à influência da concentração salina no crescimento microbiano, o estudo da sensibilidade do *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 a este sal é importante para sua aplicação em queijo Minas Frescal, pois para este tipo de queijo utiliza-se em torno de 1,6% deste sal (FURTADO, 1991).

Dessa forma, nas Figuras 16 a 19 encontram-se os dados referentes ao crescimento (UFC.mL⁻¹), produção de bacteriocinas (UA.mL⁻¹) e a redução do pH por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, após 24 horas de incubação a 37±1°C em LDE 10% suplementado com 1% de extrato de levedura e 1% de glicose adicionado de diferentes concentrações de sal (NaCl).

No meio de cultivo sem adição de sal (Figura 16), a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 atingiu população máxima de 9,37 log UFC. mL⁻¹ após 10 horas de cultivo, mantendo-se estável até o fim do período analisado, apresentou atividade de bacteriocina máxima (2800 UA.mL⁻¹) durante a fase estacionária, após 12 horas de fermentação, permanecendo ativa até o fim do processo (24 horas). A produção de bacteriocina iniciou-se na fase exponencial e aumentou com o tempo de fermentação. O pH teve uma diminuição de 1,83. Esse ensaio foi utilizado como controle.

A produção máxima de bacteriocina (2400 UA.mL⁻¹) no meio de cultivo contendo 0,5% de sal (Figura 17) ocorreu após 10 horas de cultivo, iniciando-se na fase exponencial. Após 8 horas de incubação, atingiu população máxima de 8,62 log UFC.mL⁻¹, seguido de suave declínio até fim do processo. O pH teve uma menor diminuição (1,61) em relação ao controle.

No meio de cultivo contendo 1,5% de sal (Figura 18) o crescimento populacional atingiu o máximo de 9,36 log UFC.mL⁻¹ após 8 horas e a produção máxima de bacteriocina (4000 UA.mL⁻¹) após 10 horas de fermentação (fase estacionária). A variação do pH foi de 1,77.

Para o meio de cultivo contendo 3,0% de sal (Figura 19) o máximo crescimento populacional (8,95 log.mL⁻¹) foi alcançado após 8 horas de cultivo. A produção de bacteriocinas iniciou-se a 8 horas de fermentação (fase estacionária), sendo que a atividade de bacteriocinas máxima (3200 UA.mL⁻¹) ocorreu após 10 horas de fermentação, durante a fase estacionária. A variação do pH 1,70.

Figura 16 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH, durante fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura, sem adição de NaCl, a 37°C por 48 horas

Figura 17 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH durante fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura com adição de 0,5% de sal, a 37°C por 24 horas

Figura 18 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH durante fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura com adição de 1,5% de sal, a 37°C por 24 horas

Figura 19 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH durante fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura com adição de 3,0% de sal, a 37°C por 24 horas

Pelos resultados obtidos, verificou-se que para a concentração de 1,5% de sal foram obtidos os maiores valores de atividade de bacteriocinas (4000 UA.mL^{-1}) e de crescimento populacional ($9,36 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$), em relação às outras concentrações de sal avaliadas (0; 0,5%; 3,0%).

Entretanto, para a concentração de 3,0% de sal, os valores de crescimento populacional ($8,95 \log \text{ mL}^{-1}$) e de atividade de bacteriocinas (3200 UA. mL^{-1}) foram semelhantes quando comparado ao meio de cultivo sem adição de sal e neste caso, pode-se considerar que a concentração salina utilizada (3,0%) não influenciou na produção e desenvolvimento da linhagem. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, podendo esta ser aplicada na fabricação de queijo Minas Frescal.

Vinderola et al. (2002) estudaram a influência de diversos compostos associados a produtos lácteos fermentados, como o cloreto de sódio, no crescimento de fermentos lácticos e bactérias lácticas probióticas. Verificou-se que concentrações de NaCl a 1 e 2% influenciaram negativamente no desenvolvimento celular, sendo fermentos lácticos mais sensíveis que as bactérias lácticas probióticas.

Neysens et al. (2003) constataram que baixas concentrações salinas, como 5 a 10 g.L^{-1} de cloreto de sódio, favorecem o crescimento da população bacteriana e a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471.

6.3 Comparação do espectro de atividade das bacteriocinas, sob condições ótimas de produção, sobre diferentes linhagens de *L. monocytogenes*

Devido à queda na quantidade de células viáveis, de $9,12 \log \text{ mL}^{-1}$ (32 horas) para $7,73 \log \text{ mL}^{-1}$ (48 horas), durante o processo de fermentação, procurou-se avaliar o efeito da lise celular sobre a atividade de bacteriocinas. Para tanto, linhagens de *L. monocytogenes*, isoladas em diferentes pontos de contaminação em laticínios, uma linhagem referência (ATCC 7644) e uma isolada de alface, foram avaliadas quanto à sensibilidade a ação da bacteriocina. Os espectros de atividade (UA.mL^{-1}) das soluções de bacteriocinas sobre diferentes linhagens de *L. monocytogenes* são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Espectro de atividade (UAmL⁻¹) das soluções de bacteriocinas obtidas por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com extrato de levedura 1% e glicose 1%, após 48h e 56h de fermentação, respectivamente

Linhagens de <i>L. monocytogenes</i>	Atividade bactericina (UA.mL ⁻¹)	
	Após 48h*	Após 56h
ATCC 7644	3600 ^{a,b}	4800 ^a
34.B.P3	3600 ^{a,b}	3400 ^a
24.D.P2	2400 ^{a,b}	3600 ^a
34.4.P4	2800 ^{a,b}	4000 ^a
14.A.J4	1400 ^b	2400 ^a
23.1.J4	2000 ^{a,b}	3200 ^a
24.2.J4	1400 ^b	3200 ^a
34.A.P3	1600 ^b	3600 ^a
51B.P4	1200 ^b	2400 ^a
A1	5600 ^a	3200 ^a

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.

Estatisticamente, os resultados indicam que o extrato contendo bacteriocina obtida após 48 horas de fermentação apresenta uma ação de inibição diferente sobre as múltiplas linhagens de *L. monocytogenes*, quando comparado com o extrato obtido após 56 horas. Após as 48 horas, a bacteriocina obtida apresentou uma diferença significativa, com maior efeito de inibição sobre a culturas A1 (isolada a partir de alface), e menor efeito sobre a linhagem 51.B.P4 (ponto de isolamento em queijo prato, em laticínio na região de Piracicaba, São Paulo). A atividade da bacteriocina foi reduzida em cerca de 75% em relação a máxima atividade observada neste intervalo.

No entanto, ao avaliar os dados obtidos numericamente, observa-se que a ação da bacteriocina aumenta após 56 horas de incubação para as linhagens avaliadas, com exceção da *L. monocytogenes* A1, que possui seu valor diminuído de 5600 para 3200 UA.mL⁻¹. Pode-se observar que a bacteriocina obtida apresenta características de interesse, uma vez que apresenta atividade antimicrobiana, independente das características de resistência da linhagem de *L. monocytogenes* utilizada neste estudo.

Harris *et al.* (1989) demonstraram poder inibitório de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* sobre oito linhagens de *L. monocytogenes*. Motlagh *et al.* (1992), Lewus *et al.* (1992), Blom *et al.* (1999) e

Callewaert *et al.* (2000) observaram efeito inibitório de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas sobre *Listeria*.

6.4 Avaliação dos processos de secagem e esterilização do bio-ingrediente

Após a fermentação por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 do LDE 10% suplementado com extrato de levedura (1%) e glicose (1%) por 56 horas à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ (condições ótimas de produção), foi realizada a secagem do material por *spray-drying*

Para avaliação do processo de secagem, foram realizadas análises microbiológicas, como contagem de bactérias lácticas e de bolores e leveduras, produção de ácido láctico e de bacteriocinas, no processo de fermentação (antes e após 56 horas de fermentação), e após a secagem, expressos na Figura 20.

Simultaneamente, foi avaliada a resistência térmica da bacteriocina obtida por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 presente no bio-ingrediente, através da aplicação de tratamento térmico ($85^{\circ}\text{C}/5$ minutos). Para tanto, 1g do material foi diluído em 9 mL de água peptonada 0,1%.

Após o período de incubação (56 horas), foi obtido 12800 UA.mL^{-1} de atividade de bacteriocina, um aumento de $3,94 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ em relação ao início do processo e uma diminuição de pH de 1,75. Em seguida, após o processo de secagem, o pH manteve-se constante e a atividade de bacteriocina foi concentrada em 10 vezes, com a obtenção de 128000 UA.g^{-1} . A atividade e o pH do extrato seco de bacteriocina não foram alterados após os procedimentos de hidratação e de tratamento térmico a 85°C por 5 minutos.

Figura 20 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH no início e após a fermentação da linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% suplementado com glicose e extrato de levedura, a 37°C por 56 horas, após o processo de secagem para o bio-ingrediente sem e com tratamento térmico

Morgan *et al.* (1999) obtiveram uma redução de 3 log no número de células viáveis de *Listeria monocytogenes* Scott A e de *Staphylococcus aureus* 10, através da aplicação de solução contendo 10% de laticina 3147, obtida por *Lactococcus lactis* DPC3147 seca em *spray-dryer*. Já em formulação láctea infantil, a utilização do pó contendo laticina 3147 resultou em lise de 99% de *L. monocytogenes*.

Devido à contaminação ambiental por bolores e leveduras no processo de secagem, resultado da realização do processo em condições ambientais não estéreis, e pela sobrevivência de cepas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, optou-se pela esterilização do bio-ingrediente por radiação gama.

Neste estudo, foram realizados testes preliminares para determinação da dose de radiação ionizante (kGy) necessária para a descontaminação do material, sem contudo, alterar sua atividade antimicrobiana frente às linhagens de *L. monocytogenes* avaliadas. Os resultados obtidos estão representados pela Figura 21.

Observa-se que para todas as doses de radiação ionizante aplicadas não houve perda de atividade de bacteriocina (128000 UA.mL⁻¹) para a linhagem de *L.*

monocytogenes ATCC 7644. Entretanto, para *L. monocytogenes* 34.4.P4 houve perda de atividade de bacteriocinas para as doses de radiação com valores de 5, 7 e 15 kGy, sendo que para as doses de 3, 10 e 12 kGy, a atividade de bacteriocina (96000 UA.mL⁻¹) foi igual ao do bio-ingrediente não submetido à radiação (controle).

Figura 21 - Crescimento da população bacteriana (log UFC.mL⁻¹), atividade bacteriocina (UA.mL⁻¹) e pH para bio-ingrediente contendo bacteriocinas submetido a diferentes doses de radiação (kGy), *in natura* e após tratamento térmico

A mínima dose aplicada (3kGy) foi adequada a este estudo pois não alterou a atividade de bacteriocinas, além de eliminar tanto a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, quanto bolors e leveduras, resultante da contaminação ambiental.

6.5 Efeito da adição do bio-ingrediente sobre *L. monocytogenes* inoculada em queijo Minas Frescal

Na Figura 22 são apresentados os resultados do crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 nas amostras das massas e soros dos queijos, logo após a contaminação (0 dia), e dos queijos Controle (sem adição de bacteriocina e patógeno), Tratamento I (com adição de bacteriocina) e Tratamento II (com adição de bacteriocina e patógeno) no 3º, 5º, 7º, 15º e 21º dia de estocagem a $6,0 \pm 1^\circ\text{C}$ por 21 dias.

Nos queijos do Controle, *L. monocytogenes* ATCC 7644 não foi detectada e o pH variou de 6,9 e 6,83 em 21 dias de estocagem a $6,0 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 22 - Crescimento da população ($\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) de *L. monocytogenes* ATCC 7644 presentes na massa e no soro dos queijos T1 (*L. monocytogenes*) e T2 (*L. monocytogenes* + bacteriocina)

Ao longo do armazenamento, observa-se que tanto a massa quanto o soro das amostras de queijo avaliadas, exibem comportamento semelhante quanto à ação da bacteriocina, demonstrando que há migração da bacteriocina presente na massa para o soro. Nas massas dos queijos do Tratamento I, a população de *L. monocytogenes*

7644, inicialmente inoculada ($4,0 \text{ Log UFC.g}^{-1}$), aumentou $6,2 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ no 15º dia, onde foi observada população máxima. Uma diminuição de $1,2 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ ocorreu entre o 15º dia e 21º dia de estocagem. Para as massas dos queijos do Tratamento II, a população de *L. monocytogenes* 7644, inicialmente inoculada ($4,0 \text{ Log UFC.g}^{-1}$), aumentou somente 2 Log UFC.g^{-1} no 21º dia de estocagem, onde foi observado população máxima. Após 21 dias, para o soro, enquanto em T1 houve um aumento da população de $5,10 \text{ log UFC.g}^{-1}$, em T2 o aumento foi de $1,66 \text{ log UFC.g}^{-1}$.

Portanto, a adição de 10% do bio-ingrediente à massa, antes da etapa de enformagem do queijo Minas Frescal, promoveu à inibição máxima de $4,0 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ de *L. monocytogenes* ATCC 7644 no 15º dia de estocagem a 6°C comparativamente ao Tratamento I.

Morgan *et al.* (2001) obtiveram uma redução de 98,3% da linhagem *L. monocytogenes* Scott A em iogurte natural, após aplicação de 10% de extrato seco contendo lacticina 3147 por 5 minutos a 30°C . Para a mesma aplicação em queijo Cottage, reduziu-se 85% o número de células viáveis, após 120 minutos de aplicação da bacteriocina.

Em seus estudos, McAuliffe *et al.* (1999) avaliaram a aplicação de *Lc. lactis* DPC 4268 e *Lc. lactis* DPC 4275 para a produção de lacticina 3147 e inibição de *L. monocytogenes* em queijo Cottage, com a obtenção de uma redução de 99,9% no número de células viáveis do patógeno avaliado.

7 CONCLUSÕES

Em relação à seleção de linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas, a cultura *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 demonstrou-se adequada para aplicação em leite desnatado, devido à baixa produção de ácidos e por não haver atividade proteolítica e produção de aromas.

Com a adição de extrato de levedura e glicose ao meio de cultivo LDE 10%, o desempenho da linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em relação à máxima produção de bacteriocinas (após 56 horas de cultivo) foi 43 vezes maior em comparação ao meio sem suplementação e até 25,6 vezes melhor do que aquele onde adicionou suplementos (glicose; extrato de levedura; inulina; oligofrutose e extrato de levedura) ao meio LDE 10%.

A suplementação do meio com 1,5% de cloreto de sódio não afetou o crescimento de *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, mas a atividade máxima da bacteriocina foi aumentada em 66,7%.

Com relação ao espectro de inibição, a bacteriocina produzida pela linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 demonstrou-se efetiva frente a diferentes linhagens de *L. monocytogenes*, em sua maioria isoladas de laticínios.

A atividade da bacteriocina produzida em LDE 10% suplementada com extrato de levedura e glicose foi concentrada em cerca de 10 vezes após o processo de secagem por *spray-drying*. Após os processos de secagem e de esterilização com aplicação de doses de 3kGy de radiação gama ao bio-ingrediente, não houve perda de atividade da bacteriocina. Após o processo de radiação ionizante houve eliminação completa de células viáveis da bactéria láctica produtora.

O emprego de bacteriocinas ao queijo Minas Frescal promoveu um retardamento da fase lag e inibição no desenvolvimento da população de *L. monocytogenes* ATCC 7644, com diminuição de até 4,2 logUFC.mL⁻¹ para a massa de queijo e 3,83 logUFC.mL⁻¹ no soro resultante da dessoragem.

A linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 demonstrou propriedades tecnológicas adequadas para sua aplicação em queijo Minas Frescal. Porém, outros

estudos são necessários para viabilizar a aplicação desta cultura na bioconservação de diferentes tipos de queijos.

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitro benzene sulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, Nov. 1979.
- AGUIRRE, M; COLINS, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.75, p.95-107, 1993.
- ALLENDE, A.; MARTÍNEZ, B.;SELMA, V.;GIL, M.I.; SUAREZ, J.E.;RODRÍGUEZ, A. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 7-8, p.759-766, Oct./Dec. 2007.
- ALTENA, K.; GUDER, A.; CRAMER, C.; BIERBAUM, G. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p.2565-2571, 2000.
- ALVES, V.F.; MARTINEZ, R.C.R.; LAVRADOR, M.A.S.; DE MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 623-627, 2006.
- ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 68, n. 2, p. 303-316, 2001.
- AUDISIO, M.C.; OLIVER, G.; APELLA, M.C. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 63, p. 235–241, 2001.
- ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 15, n. 2, p. 145-153, Feb. 2005.
- AVONTS, L.; Van UYTVEN, E.; DE VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 14, n. 11, p. 947-955, 2004.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Maerdel Decker, 2004. chap. 1, p.1-63.
- BARANCELLI, G.V.; ARRUDA, N.F.; CAMARGO, T.M.; BARBOSA, A.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F.; HOFER, E. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em linha de produção e ambiente de processamento de queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25; 2009, Porto de Galinhas. **Anais...** Porto de Galinhas: CBM, 2009. 1CD-ROM.

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E.; TANTAQUI-ELARAKI. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.17, p.78-81, 1993.

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; GHALFI, H.; ELMEJDOUB, T.; ROBLAIN, D.; JACQUES, P.; THONART, P. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model culture milk by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis lactis*. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 55, n. 3, p. 145-151, 2002.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 11, p. 259–274, 2001.

BERRY, E.D.; LIEWEN, M.B.; MANDIGO, R.W.; HUTKINS, R.W. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 194–197, 1990.

BERRY, E.D.; HUTKINS, R.W.; MANDIGO, R.W. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post-processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, p.681–686, 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Diário Oficial** de 11 de março de 1996, Seção 1, p. 3977, Brasília, 1996.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Instrução Normativa nº 4 de 01 de março de 2004. **Diário Oficial** de 05 de março de 2004, Seção 01, p.5. Brasília, 2004.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 135-144, 2006.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R. ; CINTRA, H.C. ; OLIVEIRA, P.T.V. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and the effect of this compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, AZ Dordrecht, v. 21, p. 351-358, 2005.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1-2, p. 137-144, Jan.-June 2004.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.; DELBUONE, R.; LERAYER, A. L. Occurrence and isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 7., 2000, Buenos Aires. **Anais...**Buenos Aires, 2000. v. 64. p. 61.

BROOME, M. C. Starter culture development for improved cheese flavour. In: WEIMER, B. C. **Improving the flavour of cheese**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. chap. 7, p.157-174.

BUCHMAN, W.B.; BANERJEE, S.; HANSEN, J.N. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **Journal of Biology and Chemistry**, Baltimore, v.263, p.16260-16266, Feb. 1988.

BUYONG, N.; KOK, J.; LUCHANSKY, J.B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter-culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4842–4845, 1998.

CAMARGO, A.C de; WALTER, J.M.M. **Divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais**. Princípios da Irradiação. Mar. 2007. Disponível em: < <http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm>>. Acesso em 02 dez. 2010

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, Barking, v. 87, p. 321–329, 2011.

CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas – SP**. 2003. 107p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia e Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: bacteriocin of lactic acid bacteria. **Food Science Technology International**, London, v.7, n.4, p.281-305, Aug. 2001.

CHHABRA, A.T.; CARTER, W.H.; LINTON, R.H.; COUSIN, M.A. A predictive model to determine the effects of pH, milkfat, and temperature on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, n.10, p.11493-1149, 1999.

CHUNG, K.T.; DICKSON, J.S.; CROUSE, J.D. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.55, n.6, p.1329-1333, 1989.

CLEGG, K.M.; LEE, Y.K.; MCGILLIGAN, J.F. Technical note: Trinitrobenzene sulphonic acid and ninhydrin reagents for the assessment of protein degradation in cheese samples. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 517-520, 1982.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p. 1–20, 2001.

COVENTRY, M.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 246-258, 1997.

COTTER, P.C.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 777-788, 2005.

CRIADO, M.T.; SUAREZ, B.; FERREROS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v.48, p.123-126, 1994.

DABES, A.C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E.M.. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 mar. 2011.

DAESCHEL, M.A. Application of bacteriocin in food systems. In: BILLS, D.D.; KUNG, S. (Ed.). **Biotechnology and food safety**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. p. 55-74.

DE MAN, J.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.23, p.130-145, 1960.

DE VUYST, L. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* spp. *lactis* strains. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 16, n. 2, p. 287-292, Feb.1994.

DEEGAN, L.C.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DEGNAN, A.J.; BUYONG, N.; LUCHANSKY, J.B. Antilisterial activity of pediocin AcH model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.18, p.127-138, 1993.

DELGADO, A.; LOPEZ, F.N.A.; BRITO, D.; PERES, C.; FEVEREIRO, P.; GARRIDO-FERNANDEZ, A. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**. v. 130, n. 2, p. 193–201, jun. 2007.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as food preservative. **Journal of the Society for Dairy Technology**, Cumbria, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990.

DELVES-BROUGHTON, J.; BLACKBURN, P.; EVANS, R. J.; HUGENHOLTZ, J. Applications of the bacteriocin nisin. **Antonie Van Leeuwenhok**, Dordrecht, v. 69, p. 193-202, 1996.

DORNELLAS, J.R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e “shelf life” do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. 197 p. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1997.

ESMAZEAUD, M. Le lait: milieu de culture. **Microbiologie Aliments Nutrition**, Kyoto, v. 8, p. 313–325, 1990.

ECKNER, K.F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.12, n.4, p.204-209, 1992.

EL-ZINEY, M.G.; DEBEVERE, J.M. The effect of reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.10, p.1275-1280, 1998.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, sep. 1991.

FAO/WHO. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, 2002. 50 p.

FIELDS, F.O. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. **Journal of Food Protection**, Washington, v.1, p. 72-77, 1996.

FOEGEDING, P.M.; THOMAS, A.B.; PILKINGTON, D.H.; KLAENHAMMER, T.R. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, p.884–890, 1992.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; SWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Maryland: Aspen Publication, 2000. 587 p.

FRAZER, A.C.; SHARRATT, M.; HICMAN, J.R. The biological effects of food additives. I. Nisin. **Journal of Science and Food Agricultural**, Ames v.13, p. 32-42, 1962.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2.ed. São Paulo: Globo, 1991. 297p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo fresco de leite de cabra**. São Paulo, 2010. 86 p. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 19, p. 89-95, 2009.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.120, p. 51-70, 2007.

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, New York, v. 28, p. 125–152, 2008.

GARDE, S.; TOMILLO, J.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis in Hispánico cheese manufactured using a mesophilic starter, a thermophilic starter, and bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415 adjunct culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 12, p. 3479-3485, 2002.

GARCIA, S. **Isolamento e seleção de culturas lácticas para a fabricação de queijos**. 1984. 89 p. Dissertação (Mestrado em ciências agrárias) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1984.

GOKTEPE, I. Probiotics as biopreservatives for enhancing food Safety. In: GOKTEPE, I.; JUNEJA, V.K.; AHMEDNA, M. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. chap. 13, p 285-307.

GOULD, G.W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, Ames, suppl. v.59, p.82-86, 1996.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.52, n.3, p.665-671, Aug. 2005.

GREEN, G.; DICKS, L. M.T.; BRUGGEMAN, G.; VANDAMME, E.J.; CHIKINDAS, M.L. Pediocin-PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, p. 127-132, 1997.

HAARMAN, M.; KNOL, J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.71, n.5, p.2318-2324, 2005.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of DairyTechnology**, Oxford, v. 60, n.2, p. 105-108, 2007.

HARRIGAN, W.F.; MAC CANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London: Academic Press, 1976. 452p.

HÉQUET, A. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.113, p.67-74, 2007.

HOLZAPFEL, W.H., GEISEN, R.; CHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protetive cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 343-362, 1995.

HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego: Academic Press, 1993. 274p.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic Lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, p. 139-150, 1998.

HURST, A. Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. In: SKINNER, F.A.; QUESNEL, L.B. (Ed.). **Streptococci**. New York: Academic Press, 1978. p.297-314.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Lactic acid bacteria**. Belgium: FIL/IDF, 1991. 3p. (Guidance on Methods of Sampling and Analysis FIL-IDF, 149).

IVANOVA, I.; KABADJOVA, P.; PANTEV, A.; DANOVA, S.; DOUSSET, X. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza – bulgarian traditional cereal beverage. **Biocatalysis - 2000: Fundamentals & Applications**, v.41, n.6, Supplement, p.47-53, 2000.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 7th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers. 2005, 854p.

JEEVARATNAM, K; JAMUNA, M; BAWA, A. S. Biological preservation of foods–Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 4, p. 446-454, oct. 2005.

JOSEPH, B. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p. 367–72, 2001.

JUILLARD, V., SPINLER, H.E., DESMAZEAUD, M.J., BOQUIEN, C.Y. **Le Lait**, Paris. v.67, p. 149, 1985.

KABUKI, D.Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo hispânico dos Estados Unidos, utilizando subtipagem molecular**. 2004. 145p. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.91, n.2, p 67-174, 2004.

KELLY, W.J.; DAVEY, G.P.; WARD, L.J. Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.45, p. 85-92, 1998.

KIM, M.H.; KONG, Y.J.; BAEK, H.; HYUN, H.H. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. **Journal Biotechnology**, Amsterdam, v. 121, p. 54-61, 2006.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology letters**, Amsterdam, v.12, p. 39-86, 1993.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in food: Incidence in dairy products. **Food Control**, Guildford, v.7, p.215-221, 1996.

LEAL-SÁNCHEZ, M.V.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J.L. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, n.9, p.4465-4471, 2002.

LEROY, F.; De VUYST, L. A combined model to predict the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC494. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, p 1093–1099, 2003.

LIANOU, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.56, p.2551-2558, 1990.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p.1063-1067, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em 31 jan. 2011.

LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin-phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v.193, n.2, p.265-275, 1951.

LÜCKE, F.-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, Barking, v.56, p.105-115, 2000.

MAGRO, M.L.; CORBACHIO, J.M.M.; SORRIBES, C.H.; GEA, A.M.S.; GOMEZ, J.M.G. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, Madri, v. 37, p. 59-66, 2000.

MARTINIS, E.C.P. de; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 18, p. 191-208, 2002.

MÄYRÄ-MÄKINEN, A.; BIGRET, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004. chap. 5, p. 175-198.

MATIJASIC, B.B.; RAJSP, M.K.; PERKOB.; ROGELJ, I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 17, p. 157–166, 2007.

MATIJASIC, B. B.; ROGELJ, I. *Lactobacillus* k7 – A new candidate for a probiotic strain. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v.38, n.2, p.113-119, 2000.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W. (Ed.). **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972. chap. 7, p.315-422.

McLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.92, p.15-33, 2004.

McMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection**, Ames, vol. supplement, p.64-71, 1996.

MEGHRIUS, J.; EULOGE, P.; JUNELLES, A.M.; BALLONGUE, J.; PETITDEMANGE, H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. **Biotechnology Letters**, Kew, v.12, p.575-580, 1991.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp..** 2003. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MERCENIER, A; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v.8, p.99-110, 2002.

MILLETTE, M.; SMORAGIEWICZ, W; LACROIX, M. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* ATCC 11454 against select bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n.6, p. 1184-1189, 2004.

MITRA, S.; CHAKRABARTTY, P.K.; BISWAS, S.R. Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-producing strain. **LWT-Food Science and Technology**, London, v. 43, p. 337–342, 2010.

MOLL, G.N.; KONING, W.N.; DRIESSEN, A.J. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.69, p.185-191, 1999.

MORGAN, S. M.; GALVIN, M.; KELLY, J.; ROSS, R.P.; HILL, C. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibition activity against foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Ames, v.62, p. 1011-1016, 1999.

MORGAN, S. M.; GALVIN, M.; S.M.; ROSS, R.P.; HILL, C. Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 387-391, 2001.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 62, p. 163-167, 2003.

MOSCALEWSKY, W. S.; LEONE, M. A. B.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, P. R. S.; MONTEIRO, C. L. B. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. 1 CD ROM.

MOURA, S. M., DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.229-237, 1993.

MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59 Supplement, p. 54-63, 1996.

NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal elaboração pelo método convencional e por acidificação direta**. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal**. 2007. 184 p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NEL, H.A.; BAUER, R.; VANDAMME, E.J.; DICKS, L.M.T. Growth optimisation of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 1131–1138, 2001.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.70, p.113-128, 1996.

NEYSENS, P.; MESSENS, W.; DE VUYST, L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocina production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, p. 29–39, 2003

NIELSEN, J. W.; DICKSON, J. S.; CROUSE, J. D.. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 2142–2145, 1990.

NOGUEIRA, V.C.; MORENO, I.; PORTO, E.; BROMBERG, R.; VIEIRA, A.P.; MAGOSSO, L. Growth of and bacteriocin production by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ctc 204 in different culture media. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2009. **Holos Environment**, América do Norte, 9, out. 2009. Disponível em: <<http://www.periodicos.rc.biblioteca.unesp.br/index.php/holos/article/view/3103/2557>>. Acesso em: 31 jan. 2011.

NOGUEIRA, V.C. **Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservante**. 2010.104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

OLIVEIRA, S.M.C. **Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos**. 2000. 45p. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

OCAÑA, V.S.; NADER-MACÍAS, M.E. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II. Screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. **Methods in Molecular Biology**, Hardcover, v. 268, p. 347-353, 2004.

ORTOLANI, M.B.T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo Minas frescal**: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. Viçosa: 2009. 123 p. Dissertação (M.S. em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

O'SULLIVAN, G.C.; KELLY, P.; O'HALLORAN, S.; COLLINS, C.; COLLINS, J.K.; DUNNE, C.; SHANAHAN, F. Probiotics: an emerging therapy. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v.11, p.3-10, 2005.

O'SULLIVAN, L.; MORGAN, S.M.; ROSS, R.P.; HILL, C. Bacteriocins: changes in cheese flora and flavour. In: WEIMER, B. C. (Ed.). **Improving the flavour of cheese**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. chap. 15, p.326-342.

OUMER, A.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. The effects of cultivating lactic starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 1, p. 81-86, 2001a.

OUMER, A.; GAYA, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MARIACA, R.; GARDE, S.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. **Journal of Dairy Research**, London, v. 68, n. 1, p.117-129, 2001b.

OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von; OUWEHAND, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria**: microbiological and functional aspects. New York: Marcel Dekker, 2004. chap. 11, p. 375-396.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FABER, J.; WARBURTON, D. Health products and food branch. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. Government of Canada. 2001. Disponível em: <<http://www.hc-sc.ca/food-aliment>>. Acesso em: 20 set. 2009.

PARENTE, E.; RICCIARD. Influenc of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 41, p. 388-394, 1994

PEREZ, K.J.; GUARIENTI, C.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa da microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v. 18, n.1, 2007.

PIARD, J.C.; DELORME, F.; GIRAFFA, G.; COMMISSAIRE, J.; DESMAZEAUD, M. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. **Netherlands Milk Dairy Journal**, Wageningen, v.44, n.3/4, p.143-158, 1992.

PINTO, M.E.R. **Estudo da acção antibacteriana da nisina**. 1996. 207p. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmaceuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 1996.

PITT, W.M.; HARDEN, T.J.; HULL, R.R. Behavior of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk during fermentation with latic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, n.7, p.916-920, 2000.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, F.M.; LARA, J.A.F. Variação sazonal e correlação entre as propriedades do leite utilizadas na avaliação das qualidades. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.64, p. 35-39, 1999.

PORTO, E. ***Listeria monocytogenes*: ocorrência em hortaliças, resistência aos sanificantes e sobrevivência em alface (*Lactuca sativa*) minimamente processada e acondicionada em atmosfera modificada**. 2001. 188p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RAVISHANKAR, S.; JUNEJA, V.K. Sodium chloride. In: Naidu, A. S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton : CRC Press, 2000. chap. 26, p. 234-278.

RAY, B. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**, Ann Arbor, v. 59, n. 6, p. 285-291, 1993.

REVIRIEGO, C.; FERNÁNDEZ, A.; HORN, N.; RODRÍGUEZ, E.; MARÍN, M. L.; FERNÁNDEZ, L. Production of pediocin PA-1, and coproduction of nisin A and pediocin PA-1, by wild *Lactococcus lactis* strains of dairy origin. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 15, p. 45–49, 2005.

RILLA, N.; MARTNEZ, B.; RODRIGUEZ, A. inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n.5, p. 928-933, 2004.

RICHARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.; KOLENBRANDER, P.E.; HANDLEY, P.S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.2 , Feb. 2003.

RICHARDSON, G.H.; ERNSTON, C.A.; KIM, J.M., DALY, C. Proteinase negative variants of *Streptococcus cremoris* for cheese starters. **Journal dairy science**, Lancaster, v. 66, p. 2278-2286, 1983.

RODRIGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v.68, p.131-137, 2001.

RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, B.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw Milk. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 10, n. 1-2, p. 7-15, jan. 2000.

ROZA, C.R. **Caracterização molecular de linhagens de *Bacillus sporothermodurans* isoladas de leite UHT de diferentes origens no Brasil**. 2004. 57 p. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos) – Faculdade de engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A. (Ed.) **Lactic acid bacteria**. New York: Maercel Decker, 1993. 442p.

SALT INSTITUTE. **History of salt**. Disponível em: <<http://www.saltinstitute.org/Uses-benefits/Salt-in-history/Salt-in-ancient-history>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J.L.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, n.10, p.2891-2898, 1993.

SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technology**, Champaign, v.53, n.11, p.67-77, 1999.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, Alberta, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SATIN, M. **La irradiación de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1997. 175 p.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T; BASSOLE, I.H.N; TRAORE, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 5, n. 9, p. 678-683, 2006.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.70, p.473-478, 1989.

SCHILLINGER, U. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: BILLS, D.D.; KUNG, S. (Ed.) **Biotechnology and Food Safety**, Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. p.55-74.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocin for the biological preservation of food. **Trends in Food Science and Technology**, Norwich, v. 7, p. 58-64, 1996.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 623 p.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C.C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.81, n.3, p.241-248, Mar. 2003.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v. 17, p. 439-47, 2000.

STILES, M.E.; HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 2, p.247-251, 1991.

STEVENS, K. A.; KLAPES, N. A.; SHELDON, B. W.; KLAENHAMMER, Y. R. Antimicrobial action of nisin against *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.58, p. 1786–1788, 1992.

STONE, L.S.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopy of stainless-steel finishes used in food processing equipment. **Food Technology**, v. 39, p. 110-14, 1985.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, p.722-756, 1976.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, p.943, 1971.

TODOROV, S.; ONNO, B.; SOROKINE, O.; CHOBERT, J.M.; IVANOVA, I.; DOUSSET, X. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.48, p.167-177, 1999.

TODOROV, S.; GOTCHEVA, B., DOUSSET, X., ONNO, B., IVANOVA, I. Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* ST31. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 14, p. 50–55, 2000.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. D. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, AZ Dordrecht, v. 20, p. 643–650, 2004.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. D. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p.166-172, 2007.

VAMANU, E.; VAMANU, A. **African Journal of Microbiology Research**, Johannesburg, v. 4, n. 7, p. 534-537, 2010

van de GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 82, p.187-216, 2002.

VAN DENDER, A. G. F.; MORENO I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista de Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 47, n. 279/281, p. 76-77, 1992.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑÓNEZ-RAMÍREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 177-181, Apr., 2001.

VIEIRA, M. A.S. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas frescal através de tratamento termoquímico**. 2000. 195p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

VIEIRA, S.D.; POIATTI, M.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; VIEIRA, H.; ANDRADE, T.M. *Listeria monocytogenes* in type “Minas Frescal” craft cheese, marketed in the area of Araguaína-TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, 2001. p. 405.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Alberta, v.12, p.579–589, 2002.

YANG, R.; JOHNSON, M.; RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.58, p.3355-3359, 1992.

YEZZI, T.L.; AJAO, A.B.; ZOTOLLA, E.A. Increased nisin in Cheddar-type cheese prepared with pH control of the bulke starter cultures system. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, n.10, p.2827-2831, Oct. 1993.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 7 - Preparação do caldo LAPTg-YE (extrato de levedura/peptona/ triptona/ tween80/glicose) para *Listeria monocytogenes* (OCAÑA; NADER-MACÍAS, 2004)

Triptona	3,0 g
Peptona	4,5 g
Extrato de levedura	3,0 g + 0,6%
Glicose	3,0 g
Tween 80	0,3 g

Suspender os ingredientes em 300 mL de água destilada. Ferver o meio até completa dissolução. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Para o preparo de LAPTg-YE semi-sólido é adicionado, antes da adição de água, 2,1 g de ágar bacteriológico.

ANEXO B

Tabela 8 - Resultados de crescimento da população bacteriana e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em leite desnatado estéril (LDE 10%), com e sem suplementação

Tempo (horas)	Parâmetros	Meios						
		LDE 10% ¹	LDE 10%+I 2% ²	LDE 10%+O2% ³	LDE 10%+G1% ⁴	LDE 10%+ EL1% ⁵	LDE 10% +EL1%+ G1% ⁶	LDE 10% +EL1%+O 2% ⁷
0	Ph	6,36	6,43	6,42	6,41	6,39	6,20	6,25
	Log UFC.mL ⁻¹	5,63	5,92	5,51	5,65	5,56	5,71	5,68
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	0	0	0	0	0	0	0
8	pH	6,36	6,50	6,50	6,50	6,15	4,94	5,51
	Log UFC.mL ⁻¹	7,33	7,42	7,31	7,32	8,73	9,17	8,88
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	100	0	300	200	800	6400	2400
24	pH	6,19	6,14	6,12	6,03	5,73	4,22	5,30
	Log UFC.mL ⁻¹	7,77	7,67	7,68	7,66	9,13	9,22	9,22
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	300	500	300	500	1200	8000	1400
32	pH	6,13	6,2	6,15	6,03	5,79	4,18	5,29
	Log UFC.mL ⁻¹	7,75	7,47	7,72	7,84	9,11	9,12	9,15
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	200	400	500	700	1000	12800	2400
48	pH	6,02	5,77	5,85	5,67	5,71	4,18	5,18
	Log UFC.mL ⁻¹	7,84	8,08	7,94	8,04	9,04	7,73	8,89
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	200	200	100	600	300	11200	1200
56	pH	5,94	5,53	5,71	5,59	5,70	4,16	5,02
	Log UFC.mL ⁻¹	7,84	8,18	7,96	7,98	9,12	7,42	8,93
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	300	100	200	300	100	12800	1700
72	pH	5,85	5,28	5,62	5,48	5,78	4,19	4,77
	Log UFC.mL ⁻¹	7,9	7,67	7,92	7,90	9,16	8,74	8,31
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	200	0	0	0	0	8000	500
80	pH	5,78	5,16	5,54	5,40	5,71	4,15	4,63
	Log UFC.mL ⁻¹	7,78	8,1	8,16	7,92	9,17	8,85	8,29
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	200	0	0	0	0	8800	500

Tabela 8 - Resultados de crescimento da população bacteriana e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em leite desnatado estéril (LDE 10%), com e sem suplementação (continuação)

Tempo (horas)	Parâmetros	Meios						
		LDE 10% ¹	LDE 10%+I 2% ²	LDE 10%+O2% ³	LDE 10%+G1 % ⁴	LDE 10%+EL 1% ⁵	LDE 10%+EL1%+G 1% ⁶	LDE 10%+EL1%+O 2% ⁷
96	pH	5,78	5,01	5,50	5,30	5,69	4,19	4,55
	Log UFC.mL ⁻¹	7,68	7,7	8,04	7,94	8,40	9,02	7,93
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	0	0	0	0	0	4800	200
104	pH	6,01	4,92	5,50	5,21	5,60	4,405	4,76
	Log UFC.mL ⁻¹	7,72	7,88	7,91	7,60	8,28	9,25	7,97
	Atividade (UA.mL ⁻¹)	0	0	0	0	0	4000	300

¹ LDE 10%: Leite desnatado estéril; ² LDE 10%+I 2%: leite enriquecido com inulina (2%); ³LDE 10%+O2%: leite enriquecido com oligofrutose (2%); ⁴LDE 10%+G1%: leite enriquecido com glicose (1,0%); ⁵LDE 10%+EL1%: leite enriquecido com extrato de levedura(1,0%); ⁶LDE 10%+EL1%+G1%: leite enriquecido com extrato de levedura (1,0%) e glicose (1,0%); ⁷LDE 10%+EL1%+O2%: leite enriquecido com extrato de levedura(1,0%) e oligofrutose (2%).

ANEXO C

Tabela 9 - Indicativo dos parâmetros cinéticos de crescimento (Δ máximo Log.UFCmL⁻¹), acidificação (Δ máximo de pH) e produção de bacteriocinas (UA.mL⁻¹) durante fermentação da linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em LDE 10% sem suplementação e LDE 10% suplementado com extrato de levedura e glicose a 37°C

Meios	Crescimento celular ¹				Rendimento de Bacteriocina		Acidificação	
	n ²	g ³ (h)	μ^4 (h ⁻¹)	Δ Log	X ⁵ (Log UFCmL ⁻¹)	B _{max} ⁶ (UA mL ⁻¹)	Y _{max} ⁷ (B/X)	Δ pH ⁸
LDE 10%	5,58	0,72	0,97	1,68	7,56	400	247,79	0,10
LDE 10% +EL1%+G1%	11,32	0,53	1,31	3,41	9,34	3600	1110,91	2,08

¹ N , g (h), μ (h⁻¹), X= UFC mL⁻¹ no momento de alcançar a atividade de bacteriocina máxima (B_{max}).

² n: número de gerações.

³ g: tempo de geração.

⁴ μ : taxa específica de crescimento bacteriano.

⁵ X:concentração de biomassa final

⁶ Bmax: Título máximo observado.

⁷ Ymax: Rendimento máximo de produção de bacteriocina expresso como o rendimento da bacteriocina por unidade formadora de colônia.

⁸ Δ pH: diferença entre o valor de pH obtido em 0 e 24 horas de crescimento