UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
Área de Bromatologia

**Efeito combinado de bacteriocina produzida por
Lactobacillus sake 2a e embalagem em atmosfera
modificada no controle de *Listeria monocytogenes* em
lingüiça frescal refrigerada**

ALCINA MARIA LISERRE

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

**SÃO PAULO
2001**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Liserre, Alcina Maria

L769e Efeito combinado de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a e embalagem em atmosfera modificada no controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada / Alcina Maria Liserre. -- São Paulo, 2001.
89 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Microbiologia de alimentos 2. Ciência dos alimentos
3. Carne: Tecnologia de alimentos I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

664.07 CDD

ALCINA MARIA LISERRE

**Efeito combinado de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a
e embalagem em atmosfera modificada no controle de *Listeria
monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Prof^a. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Orientadora/Presidente

Prof^a. Dra. Elaine C. Pereira de Martinis
1º Examinador

Prof^a. Dra. Maria Teresa Destro
2º Examinador

São Paulo, 17 de setembro de 2001

*Aos meus pais, Geraldo (in memoriam) e Júlia,
e ao meu companheiro, Elizeu,
pelo amor e dedicação em
todos os momentos.*

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profª Dra. Bernadette D. G. M. Franco**, pela orientação segura, confiança no trabalho e por todo o apoio durante o curso de mestrado.

À **Profª Dra. Mariza Landgraf**, pelo apoio, amizade e dedicação.

À **Profª Dra. Maria Teresa Destro**, pelo incentivo e pelas sugestões nos momentos de dúvida.

Aos **Professores Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva e Édio Vizoni**, da Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio na assessoria prestada nas análises estatísticas.

À **Profª Maricê Nogueira**, pelo apoio à realização do projeto.

Ao **Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli**, pela ajuda imprescindível.

À **Profª Elaine C. P. de Martinis**, pelas sugestões na realização do trabalho.

À bibliotecária **Leila**, da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela grande colaboração na revisão das referências bibliográficas.

À Empresa **EMBRARAD**, pela colaboração na execução deste trabalho, em especial a **Ary Araújo Rodrigues Jr.** e **Beatriz W. Hutzler Artel**.

A **Andréa e Sandra** do Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Cárneos, pelo auxílio na análise sensorial.

Aos colegas **João, Juliana, César, Chiu, Denise, Suzana, Nilton, Oscar, Ivani ...** do Departamento de Tecnologia Bioquímica e Farmacêutica pelo valioso auxílio na análise sensorial.

À **Cyleni R. A. Souza**, pelo apoio imprescindível na realização das análises de gases.

À **Kátia** e a **Lúcia**, funcionárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, **Alexandra, Ângela, Cristina, Cristiano, Cláudia, Dory, Elisa, Emilieme, Flávia Heller, Flávia Silvestre, Gunnar, Jane, Juliana, Lina, Luciano, Maria, Paula, Paula Marques, Paula Tavoraro, Solange, Vanessa e Viviane**, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação **Jorge, Elaine e Benê**, pela paciência e disposição.

Às secretárias **Ângela, Mônica e Isabel**, pela colaboração e ajuda nos momentos necessários.

À **Patrícia, Dulce Ângelo e Áurea**, pela preciosa amizade e apoio nos momentos difíceis.

Ao **Eduardo D. Treno**, da Cryovac, que gentilmente forneceu material de embalagem.

À **Carolina Meirelles e Maria Regina Damin**, da White Martins, que forneceram os gases para a embalagem em atmosfera modificada.

À **FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro ao projeto, através dos processos 99/5660-0 e 00/8485-4.

SUMÁRIO

Introdução	1
1. Revisão Bibliográfica	3
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2. Bactérias lácticas e a utilização de “culturas starters” como bioconservadores	4
1.3. Aplicação de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em produtos alimentícios	7
1.4. Bacteriocinas	9
1.4.1. Bacteriocinas da Classe I	12
1.4.2. Bacteriocinas da Classe II	13
1.4.3. Fatores que afetam a eficácia de bacteriocinas em alimentos e bebidas	15
1.5. Atmosfera modificada	16
1.5.1. Gases utilizados em embalagens com atmosfera modificada	18
1.5.2. Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> através do uso de atmosfera modificada	19
2. Objetivo	21
3. Materiais e Métodos	21
3.1. Culturas microbianas	21
3.2. Preparo dos inóculos	21
3.3. Avaliação da sensibilidade de <i>L. monocytogenes</i> à bacteriocina produzida por <i>L. sake</i> 2a	22
3.4. Fabricação e inoculação das linguiças	23
3.5. Embalagem	25
3.6. Análise da composição da atmosfera	26
3.7. Monitoramento do pH	27
3.8. Amostragem das linguiças preparadas	27
3.9. Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>, <i>L. sake</i> 2a e de bactérias mesófilas aeróbias nas linguiças	28
3.10. Análise Sensorial	28
3.11. Avaliação da qualidade microbiológica das linguiças utilizadas na análise sensorial	31
3.12. Análise Estatística	31

4. Resultados e Discussão	32
4.1. Verificação da atividade antagonística da linhagem <i>Lactobacillus sake</i> 2a	32
4.2. Enumeração de bactérias mesófilas aeróbias nas lingüiças	33
4.3. Multiplicação de <i>Lactobacillus sake</i> 2a	33
4.4. Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> F5069r	36
4.5. Efeito combinado de bacteriocina e atmosfera modificada no controle de <i>L. monocytogenes</i>	39
4.6. Análise de pH	45
4.7. Análise da atmosfera gasosa	46
4.8. Análise sensorial	49
5. Conclusões	58
6. Referências Bibliográficas *	59
Resumo	71
Abstract	72
ANEXO I. Artigo.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das etapas de preparo e acondicionamento das lingüiças. _____	23
Figura 2. População de <i>Lactobacillus sake</i> 2a em lingüiça embalada em ar, 50%CO ₂ +50%N ₂ e 100% CO ₂ durante estocagem a 6°C. _____	35
Figura 3. População de <i>Listeria monocytogenes</i> F5069r em lingüiça embalada em ar, 50%CO ₂ +50%N ₂ e 100%CO ₂ durante estocagem a 6°C. _____	40
Figura 4. Efeito combinado de <i>Lactobacillus sake</i> 2a e embalagem em ar, 50%CO ₂ /50%N ₂ e 100% CO ₂ sobre a multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> F5069r em lingüiça frescal, durante estocagem a 6°C. _____	41
Figura 5. População de microrganismos psicrótrófos, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 11 dias. _____	52
Figura 6. População de bactérias lácticas, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 11 dias. _____	53
Figura 7. População de microrganismos mesófilos, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 11 dias. _____	54
Figura 8. População de microrganismos psicrótrófos, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 5 dias. _____	55
Figura 9. População de bactérias lácticas, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 5 dias. _____	56
Figura 10. População de microrganismos mesófilos, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 5 dias. _____	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Importância comercial de produtos resultantes do metabolismo de bactérias láticas.	5
Tabela 2. Vantagens e desvantagens da embalagem em atmosfera modificada.	17
Tabela 3. Formulação de lingüiça frescal.	24
Tabela 4. Tratamentos aplicados às amostras de lingüiça em função do tipo de inóculo e da condição de embalagem utilizada.	26
Tabela 5. Formação de halos devido à ação de bacteriocina produzida por <i>L. sake</i> 2a.	32
Tabela 6. População média (log UFC/g) de <i>Lactobacillus sake</i> 2a nas amostras de lingüiça submetidas aos tratamentos 3, 4, 7, 8, 11 e 12, durante estocagem a 6°C.	34
Tabela 7. População média de <i>Listeria monocytogenes</i> F5069r nas amostras de lingüiça determinadas nos meios de cultura Palcam (Oxoid) e TSAyea (Oxoid).	37
Tabela 8. População média de <i>Listeria monocytogenes</i> F5069r (log UFC/g) em amostras de lingüiça com e sem <i>Lactobacillus sake</i> 2a embaladas em ar, 50%CO ₂ +50%N ₂ ou 100% CO ₂ , durante estocagem a 6°C.	38
Tabela 9. Média dos valores de pH das lingüiças durante o tempo de estocagem, em função do tratamento utilizado.	47
Tabela 10. Composição da atmosfera gasosa nas embalagens das lingüiças, em função do tratamento utilizado.	48
Tabela 11. Avaliação sensorial das lingüiças com e sem <i>Lactobacillus sake</i> 2a, embaladas em ar, 50%CO ₂ +50%N ₂ e 100%CO ₂ .	51

Introdução

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico presente em muitos tipos de alimentos, o que representa um sério risco à saúde, pois este microrganismo sobrevive e prolifera ativamente em temperaturas de refrigeração. Casos de listeriose têm sido relacionados ao consumo de vários alimentos. A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Ryser, 1999). Vale ressaltar que, por todos estes fatores, *L. monocytogenes* tem preocupado não somente as autoridades sanitárias, mas também as empresas processadoras de carnes, um mercado de considerável importância econômica.

Com a emergência de microrganismos patogênicos de origem alimentar tolerantes ao frio, surge a necessidade do aumento de “barreiras” no alimento para inibir a multiplicação microbiana. Além disso, no mercado de carnes cruas e processadas, a deterioração bacteriana também caracteriza-se como uma preocupação constante. Quando a carne é embalada em atmosfera modificada, a sua microbiota predominante é alterada de bactérias aeróbias e deteriorantes para bactérias láticas. Bactérias láticas em carnes têm adquirido uma grande importância pelo seu uso como culturas “starters” em lingüiças fermentadas. As bactérias láticas preservam a carne através da formação de ácido láctico e o associado decréscimo do pH, mas também podem produzir compostos antimicrobianos específicos, como as bacteriocinas (Ahn e Stiles 1990, McMullen e Stiles 1996, Montville e Winkowski 1997).

Bacteriocinas produzidas por bactérias láticas são proteínas biologicamente ativas, que apresentam atividade bactericida contra uma série de microrganismos patogênicos de origem alimentar, tais como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Por isso, bactérias láticas produtoras de bacteriocinas podem ser empregadas como um conservador natural (Lewus *et al.*, 1991). A aplicação de bacteriocinas, juntamente com outras tecnologias convencionais de conservação, além da utilização de Boas Práticas de Fabricação, pode ser considerada uma importante medida para a conservação de produtos cárneos (Eckner, 1992).

Também convém comentar que o uso de embalagens em atmosferas modificadas para produtos cárneos tem se intensificado nos últimos anos. A aplicação de concentrações diversas de O₂, CO₂ e/ou N₂ pode aumentar a vida-de-prateleira do produto através da inibição de bactérias aeróbias deteriorantes. Por outro lado, ainda restam dúvidas quanto a inibição de bactérias patogênicas, como por exemplo *L. monocytogenes*. Sheridan *et al.* (1995) relataram que a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida totalmente em carne de carneiro embalada com 100% de CO₂, mas em atmosferas contendo 20% ou 50% de CO₂ a 5°C, essa inibição não foi observada. Mano *et al.* (1995) relataram que a multiplicação de *Listeria monocytogenes* ocorreu em carne de porco a 7°C em embalagem comum, mas foi inibida totalmente em embalagem com atmosfera modificada (100% N₂, 20%/80% e 40%/60% CO₂/O₂) a 1°C.

De Martinis e Franco (1997, 1998) demonstraram que a multiplicação de *L. monocytogenes* em lingüiça de porco foi inibida por uma linhagem de *Lactobacillus sake* (*L. sake* 2a). Esses autores demonstraram que a atividade inibitória ocorreu devido à produção de um ou mais compostos de natureza protéica caracterizados como bacteriocinas. A inibição devido a peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriófagos foi descartada.

O principal objetivo do presente estudo foi analisar o efeito combinado de bacteriocina produzida por *L. sake* 2a e embalagem em atmosfera modificada no controle de *L. monocytogenes* em lingüiça fresca refrigerada.

1. Revisão Bibliográfica

1.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico presente em muitos tipos de alimentos. Embora este microrganismo seja conhecido há mais de 70 anos, a literatura somente traz referências da sua existência em alimentos a partir da década de 80, devido à ocorrência de diversos surtos de origem alimentar (Ryser, 1999).

Johnson *et al.* (1990) estimaram a presença deste microrganismo em cerca de 5 a 13% das carnes prontas para consumo e dos produtos a base de carne. Estudos realizados entre 1971 e 1994 revelaram uma incidência média de 16% de *L. monocytogenes* em carnes provenientes de vários países, sendo que maiores índices de contaminação foram encontrados em carnes processadas e produtos à base de frango (Jay, 1996). No Brasil, Destro *et al.* (1991) relataram uma incidência de 32% de *L. monocytogenes* em amostras de carne, lingüiça, salsicha, leite *in natura* e queijo “Minas Frescal”. Segundo Farber e Peterkin (1999), em pesquisa realizada na Itália entre 1990 e 1997, houve uma incidência de 24% de *L. monocytogenes* em embutidos a base de carne de porco e de 60% em embutidos a base de carnes.

L. monocytogenes caracteriza-se como um bacilo Gram-positivo, móvel, não formador de esporos e anaeróbio facultativo, apresentando reação positiva para catalase e negativa para oxidase (Franco e Landgraf, 1996). *L. monocytogenes* encontra-se amplamente distribuído pela natureza. Em alimentos, esta bactéria representa um sério risco à saúde, pois sobrevive e prolifera ativamente em temperaturas de refrigeração. Além disso, *L. monocytogenes* é tolerante ao estresse causado pelo pH ácido e alta concentração de sal (Buchanan *et al.*, 1989). A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* é particularmente perigosa para mulheres grávidas, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Os sintomas clínicos envolvem infecção do Sistema Nervoso Central e bacteremia, mas também pode ocorrer endocardite, aborto, parto prematuro e septicemia neonatal (Ryser 1999, Franco e Landgraf 1996).

Recentes surtos de listeriose de origem alimentar têm causado muita preocupação na indústria de alimentos. A taxa de mortalidade é alta, estando em torno de 27 a 34%. Devido à essa elevada mortalidade, estima-se que o custo de um surto de listeriose seja mais alto que os de outras doenças de origem alimentar, mais comuns e menos sérias (Nielsen *et al.*, 1990).

1.2. Bactérias láticas e a utilização de “culturas starters” como bioconservadores

Bactérias láticas têm sido utilizadas freqüentemente como culturas “starters” em carnes (McMullen e Stiles, 1996). As bactérias láticas compreendem um grupo de microrganismos que possuem em comum características morfológicas, metabólicas e fisiológicas. São bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, cocos ou bacilos anaeróbios facultativos, os quais produzem ácido lático como o principal produto resultante da fermentação de carboidratos (Axelsson, 1993).

O grupo das bactérias láticas é compreendido por 11 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Entre esses, os principais são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Streptococcus* (Jay, 1999a).

As bactérias láticas podem ser divididas em dois grupos baseados nos produtos finais resultantes do metabolismo da glicose. Aquelas bactérias láticas que produzem ácido lático como principal metabólito são denominadas homofermentativas. Aquelas que produzem iguais quantidades de lactato, dióxido de carbono e etanol de hexoses são designadas heterofermentativas. As homoláticas são capazes de extrair duas vezes mais energia de uma dada quantidade de glicose que as heteroláticas (Landgraf, 1996).

Todas as espécies do gênero *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* e algumas do gênero *Lactobacillus* são homofermentativas. As heterofermentativas correspondem às bactérias láticas dos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e algumas espécies de *Lactobacillus* (Jay, 1999a).

Ao longo de milhares de anos, o homem tem, por tentativa e erro, desenvolvido métodos de fermentação controlada para retardar a deterioração de produtos de origem vegetal e animal. Assim, a competitividade natural de bactérias lácticas tem sido explorada através da história na produção de alimentos fermentados. Microrganismos com características adequadas foram selecionados pela sua capacidade de retardar a deterioração dos alimentos e inibir microrganismos indesejáveis (Holzapfel *et al.*, 1995). Culturas “starters” para produtos fermentados vêm sendo utilizadas extensivamente pela indústria para a obtenção de produtos de qualidade uniforme em alimentos como iogurtes, queijos e salames. O uso de bactérias lácticas em processos biotecnológicos aumenta a cada dia, em virtude da crescente busca pela conservação biológica de alimentos.

O metabolismo das bactérias lácticas pode contribuir de diversas formas no controle de microrganismos patogênicos, vida-de-prateleira e características sensoriais (Tabela 1).

Tabela 1. Importância comercial de produtos resultantes do metabolismo de bactérias lácticas.

Produtos	Benefícios	Malefícios
Ácido láctico	Conservação Melhora sensorial Contribuição para digestão e absorção de nutrientes	Acidificação
Ácido acético	Aroma	Sabores indesejáveis
Diacetil/acetoína	Aroma (produtos lácteos)	Sabores indesejáveis (cerveja)
CO ₂	Conservação Desenvolvimento do sabor	Estufamento da embalagem
H ₂ O ₂	Conservação	Descoloração Formação de cor verde
Aminas biogênicas	-----	Alergias
Gomas	Estabilização (iogurtes)	Alteração das características sensoriais
Bacteriocinas	Inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos	Inibição de bactérias lácticas benéficas

Fonte: Holzapfel *et al.* (1995)

Na indústria de carnes as bactérias lácticas são amplamente utilizadas como culturas “starters” para a fermentação de embutidos. Elas contribuem para o desenvolvimento do sabor, assim como para a conservação dos produtos cárneos (salsichas/linguiças). Um importante papel das bactérias lácticas é inibir a microbiota desses produtos, a qual inclui bactérias deteriorantes e, ocasionalmente, patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Na maioria dos alimentos fermentados, a formação dos ácidos láctico e acético, a partir da fermentação de açúcares, e o resultante decréscimo do pH são responsáveis pelo efeito antagônico. No entanto, em muitos alimentos, altas concentrações de ácidos são indesejáveis. Há, ainda, vários produtos cárneos, como “mettwurst” fresco (um tipo de salsicha alemã), que contém somente um pouco, se nenhum, açúcar adicionado. Para estes produtos, a inibição de microrganismos indesejáveis deve ser obtida pelo menos parcialmente por outros meios além da acidificação (McMullen e Stiles, 1996).

Por todos esses motivos, a busca por bactérias lácticas capazes de inibir outras bactérias através da formação de compostos antimicrobianos, tais como as bacteriocinas é grande (Shillinger e Lücke 1989, Ahn e Stiles 1990, Lewus *et al.* 1991). Há muitas espécies de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas que já foram avaliadas por seu potencial como bioconservadores em alimentos. Pode-se citar, por exemplo, *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* (Nettles e Barefoot 1993, McMullen e Stiles 1996).

1.3. Aplicação de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em produtos alimentícios

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são proteínas biologicamente ativas, que apresentam atividade bactericida contra uma série de microrganismos patogênicos de origem alimentar, como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Por este motivo, vários estudos sobre o emprego de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas como um conservador natural em alimentos vêm sendo realizados (Lewus *et al.* 1991, Abee *et al.* 1995).

Nielsen *et al.* (1990) demonstraram que é possível reduzir a população de *L. monocytogenes* em carne fresca de 0,5 a 2,2 ciclos logarítmicos com uma bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici*. Esses pesquisadores observaram, ainda, que a eficácia do processo de inibição depende da concentração de bacteriocina e da população da microbiota contaminante.

Foegeding *et al.* (1992) analisaram a inibição de *L. monocytogenes* causada por duas cepas de *Pediococcus acidilactici*, uma produtora e outra não produtora de bacteriocina, em um embutido à base de carne de porco, chegando à conclusão de que a produção de bacteriocina aumentou a inibição de *L. monocytogenes* durante os processos de fermentação e secagem, embora a redução do pH (abaixo de 4,9) tenha sido um fator relevante.

Winkowski *et al.* (1993) investigaram a inibição de *L. monocytogenes* por *L. bavaricus* MN em carne cortada em cubos, carne em cubos com molho sem glicose e carne em cubos com molho acrescido de glicose. A 4°C, houve uma redução de cinco ciclos logarítmicos na população de *Listeria monocytogenes* na carne com molho sem glicose, 6 ciclos logarítmicos na carne com molho acrescido de glicose e 3 ciclos logarítmicos na carne sem molho. A bacteriocina produzida foi detectada nas amostras e a inibição não foi atribuída à acidificação. Temperaturas de refrigeração mais baixas, a adição de glicose no molho e o uso de inóculos mais altos melhoraram significativamente a inibição de *L. monocytogenes*.

Campos *et al.* (1997) relataram que a aplicação da cepa produtora de bacteriocina *Carnobacterium piscicola* DX em frango cozido embalado a vácuo

resultou na inibição de *L. monocytogenes* em 3 ciclos logarítmicos a 4 e 8°C após 30 e 20 dias de estocagem, respectivamente.

Nilsson *et al.* (1999) avaliaram o uso de *L. sake* LKE5 e de mais 4 linhagens de *Carnobacterium piscicola* como culturas bioconservadoras para controlar a proliferação de *L. monocytogenes* em salmão embalado a vácuo armazenado a 5°C. As linhagens de *C. piscicola* não causaram alterações sensoriais, mas *L. sake* LKE5 foi rejeitado como cultura bioconservadora por alterar as características organolépticas do produto. Nas amostras com *C. piscicola* não produtora de bacteriocinas, a população de *L. monocytogenes* manteve-se constante durante os 32 dias de armazenamento. Por outro lado, nas amostras com *C. piscicola* produtora de bacteriocina, houve redução na população de *L. monocytogenes* de 10^3 para 10 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) após o mesmo tempo de armazenamento, fato que coincidiu com a detecção de compostos antilisteria.

De Martinis e Franco (1997, 1998) isolaram de lingüiça uma linhagem de *Lactobacillus sake* (*L. sake* 2a), com atividade inibitória contra *L. monocytogenes*. Demonstrou-se que a inibição era causada por compostos protéicos, devido à sua sensibilidade a enzimas proteolíticas. A inibição devido a peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriófagos foi descartada. A atividade inibitória foi observada em meio de cultura e em lingüiça fresca refrigerada. A inibição de *L. monocytogenes* em lingüiça fresca inoculada com *L. sake* 2a foi de 6 ciclos logarítmicos após 4 semanas a 8°C. Estes resultados indicam que *L. sake* 2a produz uma substância, tipo bacteriocina, que pode ser utilizada para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em lingüiças.

1.4. Bacteriocinas

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas constituem um grupo de pequenas proteínas sintetizadas por ribossomos. Essas proteínas são biologicamente ativas e apresentam atividade inibitória sobre diversos microrganismos patogênicos de origem alimentar, incluindo *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Lewus *et al.* 1991, Montville e Winkowski 1997, Montville e Chen 1998).

Algumas bacteriocinas são proteínas simples. Outras, como as produzidas por *Staphylococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, podem conter grupos ativos de proteínas, lipídeos e carboidratos. Especula-se que são as proteínas que interagem com as células bacterianas sensíveis, através da superfície da membrana. As moléculas de bacteriocinas possuem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica, sendo essas diferentes regiões as responsáveis pelas suas interações com a superfície da célula microbiana (Eckner, 1992).

Quanto ao modo de ação, as bacteriocinas causam alterações na membrana citoplasmática. A interação entre a bacteriocina e a célula ocorre em dois estágios. O primeiro consiste na adsorção da bacteriocina na membrana celular de uma célula sensível. Nesta etapa, nenhum dano é causado à célula e a adsorção é reversível. No segundo estágio, a bacteriocina causa alterações letais à célula, com danos irreversíveis. Para microrganismos Gram-positivos, nota-se anormalidades no transporte da membrana e/ou permeabilidade da membrana, produção de energia e síntese de macromoléculas (Eckner 1992, Desmazeaud 1997). A nisina e a pediocina são as bacteriocinas melhor estudadas quanto ao modo de ação.

A nisina, primeira bacteriocina a ser citada na literatura, foi descoberta em 1928. Inicialmente considerada um antibiótico de aplicação clínica, hoje é apenas um conservador de alimentos. No entanto, a maioria das bacteriocinas de bactérias lácticas foram identificadas nas últimas duas décadas. Nisina e pediocina são exemplos de bacteriocinas de bactérias lácticas para as quais foram encontradas aplicações práticas como conservadores em alimentos (Montville e Chen 1998).

O mecanismo principal da atividade letal de bacteriocinas produzidas por bactérias láticas está associado à dissipação da força próton motriz (FPM). Bacteriocinas de bactérias láticas podem dissipar fatores como o potencial de membrana ($\Delta\psi$) e o gradiente de pH (ΔpH) que são componentes da FPM. A nisina dissipa esses dois fatores, enquanto que as bacteriocinas da classe IIa pediocina PA-1 e bavaricina MN dissipam totalmente o ΔpH e uma considerável quantidade de $\Delta\psi$ (Montville e Chen 1998). Como as bacteriocinas produzidas por bactérias láticas apresentam mecanismos comuns, é importante determinar os traços comuns entre esses peptídeos que possam identificar o modo de ação. Sob esse aspecto, a maioria das bacteriocinas são proteínas que possuem características anfifílicas. Há dois diferentes esquemas que podem explicar a ação da bacteriocina na permeabilização da membrana. Um deles consiste na formação de poros na membrana citoplasmática de células sensíveis e, o outro, na desestabilização da integridade da membrana citoplasmática onde a bacteriocina atuaria como um detergente (Montville *et al.*, 1995).

A atividade inibitória destas substâncias é limitada a bactérias Gram-positivas. Este fato pode ser explicado através da comparação da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em ambos os tipos, a membrana citoplasmática é envolvida por uma camada de peptidoglicano, o qual é significativamente mais fino nas bactérias Gram-negativas. As Gram-negativas possuem, ainda, membrana externa, composta de fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), impermeável à maioria das moléculas. A presença de poros nesta camada pode permitir a passagem de moléculas, mas apenas daquelas com um peso molecular inferior a 600 Da. A menor bacteriocina produzida por bactérias láticas possui aproximadamente 3 kDa e é, portanto, muito grande para passar pela membrana citoplasmática (Klaenhammer 1993, Abee *et al.* 1995). No entanto, Stevens *et al.* (1992) e Cutter e Siragusa (1995) demonstraram que as espécies de *Salmonella* e outras bactérias Gram-negativas podem tornar-se sensíveis à nisina após exposição a tratamentos que mudam as propriedades de permeabilidade da membrana externa.

O fato de bacteriocinas aderirem à membrana citoplasmática através de receptores pode ocorrer devido à sua natureza hidrofóbica. No caso da pediocina AcH, ácidos lipoteicóicos podem ser responsáveis por esta ligação, uma vez que bacteriocinas só são adsorvidas por bactérias Gram-positivas. Convém comentar que bactérias Gram-negativas não possuem ácidos lipoteicóicos (Ray e Hoover 1993, Desmazeaud 1997).

Chen *et al.* (1997) sugerem que a pediocina não requer um receptor protéico para o reconhecimento e ligação à membrana de *Listeria*. Esses autores listaram dois mecanismos possíveis: o reconhecimento de fosfolipídeos específicos da membrana pela pediocina e a interação eletrostática da pediocina à superfície da membrana.

As bacteriocinas diferem no seu espectro de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. A maioria das bacteriocinas apresentam peso molecular entre 3 e 10 kDa, tem um alto ponto isoeletrico, e contêm partes hidrofóbicas e hidrofílicas, simultaneamente (Montville e Winkowski 1997). Portanto, as bacteriocinas podem ser classificadas de acordo com o espectro de atividade, o modo de ação, o peso molecular, a origem genética e suas propriedades bioquímicas.

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas podem ser classificadas em quatro classes distintas:

- I) Lantibióticos: pequenos peptídeos (<5kDa) que contêm aminoácidos incomuns, tais como lantionina, β -metil-lantionina e resíduos desidratados de deidroalanina e deidrobutirina. Exemplos: nisina, lacticina 481, carnocina UI49 e lactocina S;
- II) Pequenos peptídeos estáveis ao calor (<10kDa) que não contêm lantionina. Exemplos: pediocina PA-1, lactococina A,B e M, leucocina A, sakacina P, e lactacina F. Subgrupos podem ser definidos como descrito no item 1.4.2.
- III) Proteínas grandes termolábeis (>30kDa). Exemplos: helveticina J, helveticina V-1829, acidofilucina A, lactacinas A e B;
- IV) Proteínas complexas, cuja atividade depende da associação de um ou mais grupos funcionais (carboidratos ou fosfolipídeos). Exemplos: plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27, pediocina SJ-1.

Dentre essas quatro classes, serão discutidas neste trabalho com mais detalhes as bacteriocinas da primeira e da segunda classe, por serem mais estudadas e terem maior aplicação na indústria de alimentos. Além disso, Rosa (2001), recentemente, caracterizou a bacteriocina produzida por *L. sake* 2a como pertencente à classe IIa.

1.4.1. Bacteriocinas da Classe I

As bacteriocinas da Classe I (lantibióticos) contêm aminoácidos incomuns e anéis de lantionina. A nisina A é um peptídeo antibacteriano de 3500 Da com 34 resíduos de aminoácidos, produzido por várias linhagens de *Lactococcus lactis* durante a fase logarítmica de crescimento. Esse peptídeo apresenta várias características pouco comuns, como os resíduos de deidroalanina, deidrobutirina, lantionina e β -metil-lantionina. Lantionina e β -metil-lantionina apresentam pontes dissulfeto intramoleculares (Nettles e Barefoot 1993, Montville e Winkowski 1997).

A nisina é ativa contra muitas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum*, mas é ineficiente contra bactérias Gram-negativas e fungos. A nisina é estável ao calor, pois resiste a 100°C por 10 min. Por outro lado, a solubilidade da nisina diminui com o aumento do pH, sendo de 57mg/ml em pH 2 e 0,25 mg/ml em pH 8-12. Além disso, a nisina pode ser inativada em meio alcalino, por isso aconselha-se o uso desta bacteriocina em alimentos com pH inferior a 6,0 (Daeschel, 1993).

A atividade da nisina está diretamente relacionada com a membrana celular. Durante tratamento com nisina, células sensíveis exibem um aumento no fluxo de cátions e aminoácidos. A nisina dissipa a força próton motriz da membrana celular, o que resulta na perda imediata dos íons potássio, despolarizando a membrana citoplasmática, e causando a hidrólise e o fluxo parcial de ATP celular. O resultado é um colapso no potencial da membrana, com consequente interferência na biossíntese celular resultando na morte da célula (Hansen 1993, Nettles e Barefoot 1993, Abee *et al.* 1995).

Bruno *et al.* (1992) estudaram a influência da nisina sobre a força próton motriz (FPM) em células de *L. monocytogenes* Scott A. Em ausência de nisina,

a FPM manteve-se constante a -160 mV em um intervalo de pH externo de 5,5 a 7,0. A adição de nisina em concentrações iguais ou superiores a $5\mu\text{g/ml}$ dissipou completamente o gradiente de pH e o potencial de membrana em valores de pH externo de 5,0 e de 7,0.

A lacticina 481, lactocina S, e carnocina UI 49, produzidas por *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sake* e *Carnobacterium piscicola*, respectivamente, são bacteriocinas que possuem estruturas semelhantes à da nisina e também pertencem à Classe I (Abee *et al.*, 1995).

1.4.2. Bacteriocinas da Classe II

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas da classe II podem ser divididas em três subgrupos:

- Ila) Peptídeos ativos contra *Listeria* com seqüência comum dos seguintes aminoácidos na porção N-terminal: Tyr-Gly-Asn-Gly-Val (tirosina, glicina, asparagina, glicina e valina);
- IIb) Moléculas formadoras de poros na membrana celular com a presença de dois peptídeos diferentes;
- IIc) Peptídeos ativados com um grupo tiol que requerem um resíduo de cisteína oxidados para tornarem-se ativos.

No entanto, investigações sobre um grande número de bacteriocinas da classe II confirmaram a existência dos dois primeiros grupos (IIa e IIb), mas não a existência do terceiro grupo (IIc), que ainda é incerta (Ennahar *et al.*, 2000).

A classe IIa é o mais estudado subgrupo da classe II de bacteriocinas. Essas bacteriocinas caracterizam-se principalmente por seu efeito inibidor sobre *L. monocytogenes*. A pediocina PA-1 é a bacteriocina que melhor representa a classe IIa de bacteriocinas, e possui um significativo potencial como um bioconservador de alimentos (Ennahar *et al.*, 2000).

1.4.2.1. Bacteriocinas da Classe IIa

As bacteriocinas da Classe IIa são reconhecidas por serem semelhantes à pediocina, ou seja, contém a sequência de aminoácidos Tyr-Gly-Asn-Gly-Val na porção N-terminal do peptídeo catiônico e possuem entre 37 e 48 resíduos de aminoácidos. Como exemplos, pode-se citar a pediocina PA-1, pediocina AcH, sakacinas A e P, leuconocina A, bavaricina MN e curvacina A (Jack *et al.* 1995, Montville e Winkowski 1997, Ennahar *et al.* 2000). A pediocina PA-1, que melhor representa este grupo, é um peptídeo altamente hidrofóbico, carregado positivamente com 44 aminoácidos que age sobre a membrana citoplasmática dissipando o gradiente de íons e inibindo o transporte de aminoácidos (Chikindas *et al.* 1993, Abee *et al.* 1995).

O mecanismo de ação das bacteriocinas da classe IIa é baseado na permeabilização das membranas de microrganismos sensíveis através da formação de poros. O efeito dessa permeabilização é o mesmo para bacteriocinas como sakacina A e P, leuconocina e carnobacteriocina B2 e BM1 e pediocina PA-1 (Abee *et al.*, 1995). O contato inicial é promovido por interações eletrostáticas. Como consequência da formação dos poros, ocorre a desestabilização da força próton motriz (FPM), que envolve a dissipação do potencial de membrana e/ou do gradiente de pH. Enquanto os lantibióticos dissipam esses dois fatores, as bacteriocinas da classe IIa provocam rapidamente a dissipação total do gradiente de pH e apenas a dissipação parcial do potencial de membrana (Montville e Chen, 1998). A atividade letal das bacteriocinas da classe IIa envolve também, como consequência do desequilíbrio da FPM e do aumento da fluidez da membrana, a dissipação do ATP intracelular. Supõe-se que este fato ocorra devido a um acelerado consumo de ATP para manter ou restaurar a FPM (Ennahar *et al.*, 2000).

Chikindas *et al.* (1993) sugeriram que a pediocina PA-1 forma poros hidrofílicos na membrana citoplasmática de células alvo através de um receptor protéico, processo análogo à ação de lactococcina A. Entretanto, Chen *et al.* (1997) comprovaram que a pediocina pode permeabilizar lipossomos formados apenas por fosfolípidos obtidos de células sensíveis e, portanto, não requer um receptor protéico para o reconhecimento e ligação à membrana de *Listeria*. Esses pesquisadores propuseram que o mecanismo da pediocina é baseado

no reconhecimento de fosfolipídeos específicos da membrana e/ou na interação eletrostática com a superfície da membrana.

1.4.3. Fatores que afetam a eficácia de bacteriocinas em alimentos e bebidas

A demonstração da atividade de bacteriocinas em condições controladas de laboratório pode ser simples, porém sua eficácia como bactericida em alimentos ainda é um grande desafio. A nisina é um exemplo de bacteriocina que superou todos estes obstáculos através das pesquisas.

Entre os fatores que afetam a eficácia de bacteriocinas na sua aplicação em alimentos (Daeschel, 1993), pode-se citar:

1. Emergência de microrganismos patogênicos ou deterioradores resistentes a bacteriocinas.
2. Condições que podem desestabilizar a atividade biológica de proteínas:
 - a) enzimas proteolíticas não específicas
 - b) oxidação
 - c) metais pesados
 - d) excessiva agitação, formação de espuma
 - e) descongelamento
3. Interação com componentes dos alimentos.
4. Inativação por outros aditivos dos alimentos.
5. Efeito do pH:
 - a) solubilidade
 - b) atividade ótima em determinada faixa de pH
6. Temperatura.

Segundo Holzapfel *et al.* (1995), também há fatores que prejudicam a eficácia da aplicação de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em alimentos. São eles:

1. Meio inadequado para a multiplicação da bactéria láctica e/ou produção de bacteriocina.
2. Perda espontânea da habilidade da produção de bacteriocinas.
3. Sensibilidade aos parâmetros do processo.

4. Competição com outros microrganismos.
5. Desenvolvimento de microbiota resistente à bacteriocina.
6. Formação de “off-flavors”.

1.5. Atmosfera modificada

A embalagem em atmosfera modificada pode ser definida de modo abrangente como sendo qualquer técnica que modifica o ambiente ao redor de um produto recoberto por materiais de alta barreira (Young, 1993). Existem duas técnicas amplamente utilizadas na indústria de alimentos, uma é a embalagem a vácuo e a outra é a injeção de gás ou mistura de gases na embalagem. A atmosfera modificada limita a concentração de oxigênio em contato com o alimento, inibe a multiplicação de microrganismos e a deterioração enzimática, aumentando assim a vida-de-prateleira do produto (Young *et al.* 1988, Young 1993).

A embalagem a vácuo é obtida através da remoção do ar e selagem hermética do filme plástico. A embalagem com injeção de gases pode ser obtida com um fluxo de gás direto, ou através da remoção do ar com posterior injeção de gás (processo denominado vácuo compensado), sendo ambos os processos seguidos de selagem hermética do filme plástico (Sarantópoulos *et al.*, 1998).

A atmosfera modificada é uma tecnologia cara, mas que pode aumentar significativamente a vida-de-prateleira do produto. A carne fresca, por exemplo, quando acondicionada em filmes plásticos permeáveis ao oxigênio, apresenta no máximo 3 dias de vida-de-prateleira a 4°C antes que a descoloração comece a ocorrer (Cornforth, 1994). Usando-se uma combinação de gases adequada, é possível conseguir, para o mesmo produto, uma vida-de-prateleira de 7 a 10 dias (Young, 1993).

Muitos profissionais da área de alimentos consideram que a embalagem em atmosfera modificada pode representar um risco à segurança alimentar devido a sobrevivência e multiplicação de bactérias patogênicas em temperaturas de refrigeração (Palumbo, 1987). Apesar dessa polêmica, esse sistema de embalagem é amplamente utilizado na Europa e nos EUA, onde

produtos como massas frescas, sanduíches, carnes cruas e de frango têm sido comercializados com sucesso (Hotchkiss, 1988).

O aumento da procura por produtos frescos e refrigerados, o desejo dos consumidores de adquirir produtos sem conservadores químicos e o declínio do consumo de alimentos enlatados ou congelados são fatores que contribuíram para o aumento da demanda de produtos embalados com atmosfera modificada (Farber, 1991). As vantagens obtidas com o uso de embalagem em atmosfera modificada são inúmeras, mas ainda existem desvantagens que devem ser consideradas (Tabela 2).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da embalagem em atmosfera modificada.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da vida-de-prateleira de 50 a 400%. • Redução das perdas econômicas. • Distribuição dos produtos a longas distâncias com menor número de pessoas envolvidas, o que reduz os custos. • Garantia de alta qualidade do produto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo adicional. • Necessidade de controle da temperatura. • Necessidade de diferentes misturas de gases, de acordo com a natureza do produto, o que pode elevar os custos. • Necessidade de equipamentos e treinamentos específicos.

Fonte: Farber (1991)

Há vários fatores que influenciam diretamente a vida-de-prateleira e a segurança dos produtos embalados em atmosfera modificada. São considerados fatores críticos o pH, a atividade de água (A_w), a presença de aditivos ou conservadores, o nível de contaminação e a microbiota predominante de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores. Quanto à embalagem, pode-se citar como fatores importantes o espaço-livre, a permeabilidade e a integridade física (Hotchkiss, 1988).

A efetividade da embalagem em atmosfera modificada decresce quando a temperatura aumenta, pois a solubilidade do gás no líquido ou produto também decresce. Os efeitos das temperaturas são particularmente

importantes para a manutenção da segurança alimentar do produto (Farber, 1991).

1.5.1. Gases utilizados em embalagens com atmosfera modificada

Os principais gases utilizados para o enchimento de embalagens são o oxigênio, o nitrogênio e o gás carbônico. O nitrogênio é utilizado apenas como um gás de enchimento para reduzir ou eliminar a concentração de outros gases dentro da embalagem. O oxigênio favorece a formação da oximioglobina em carnes frescas, inibe a multiplicação de microrganismos patogênicos anaeróbios, mas não prolonga a vida-de-prateleira. O dióxido de carbono é um gás bacteriostático e fungistático, sendo eficiente para aumentar a vida-de-prateleira de alimentos perecíveis através da inibição do crescimento microbiano (Miyagusku e Gianezi 1998, Farber 1991).

O efeito geral do dióxido de carbono está associado ao aumento da fase lag e do tempo de geração de microrganismos deterioradores. Supõe-se que o mecanismo de ação desse gás esteja relacionado com a alteração da permeabilidade da membrana celular (captura e absorção de nutrientes), alteração do pH intracelular através da rápida penetração na membrana bacteriana, alteração nas propriedades físico-químicas e efeitos negativos em várias vias enzimáticas e bioquímicas (Miyagusku e Gianezi, 1998). Em alimentos com alta atividade de água, o CO_2 dissolve-se na fase líquida do tecido tratado formando o ácido carbônico (H_2CO_3), o que leva à desestabilização do sistema metabólico da célula (Daniels *et al.* 1985, Debs-Louka *et al.* 1999).

Atmosferas com concentrações de CO_2 maiores que 5% são particularmente efetivas para aumentar o período lag de crescimento de muitos microrganismos psicrotróficos Gram-negativos, como *Pseudomonas* spp., que proliferam em temperaturas de refrigeração e causam o desenvolvimento de limosidade e odores desagradáveis na carne. Quanto maior a concentração de CO_2 e menor a temperatura, maior será o poder de dissolução do gás no alimento, e conseqüentemente, maior será o efeito bacteriostático (Farber 1991, Daniels *et al.* 1985). Entretanto, níveis superiores a 25% causam

descoloração da carne devido à acidificação superficial e à desnaturação de proteínas (Sofos, 1994).

A microbiota deterioradora Gram-negativa de carnes refrigeradas geralmente é sensível ao dióxido de carbono, enquanto que bactérias lácticas são menos afetadas (Silliker e Wolfe 1980, Enfors e Molin 1984; Grau *et al.* 1985, Kakouri e Nychas 1994). Espécies de *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, as mais importantes bactérias deterioradoras de carnes frescas estocadas em aerobiose, são geralmente inibidas em concentrações iguais ou superiores a 20% de CO₂, enquanto microrganismos Gram-positivos, como *Lactobacillus* spp. e *Brochothrix thermosphacta* são resistentes ao dióxido de carbono. Assim sendo, em carnes estocadas em atmosfera modificada ocorre uma mudança da microbiota inicial Gram-negativa para uma predominantemente Gram-positiva anaeróbia facultativa, dominada por *Lactobacillus* spp. (Farber 1991, Venugopal *et al.* 1993). Este fato é benéfico, pois os lactobacilos são menos agressivos à carne em comparação com as pseudomonas que produzem odores típicos de deterioração e se multiplicam muito rápido. Outros microrganismos que constituem um problema em carnes são *Alteromonas putrefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, e *Yersinia enterocolitica*, os quais são inibidos com a atmosfera modificada (Xavier, 1990).

1.5.2. Inibição de *Listeria monocytogenes* através do uso de atmosfera modificada

O uso de embalagens com atmosferas modificadas para produtos cárneos tem se intensificado nos últimos anos, mas as pesquisas a respeito de sua influência sobre a proliferação de *L. monocytogenes* têm resultado em dados contraditórios. Este microrganismo não proliferou em vários produtos embalados com 100% de CO₂, como carne de frango estocada a 1 e 6°C (Hart *et al.*, 1991), carne bovina a 5°C (Gill e Reichel, 1989), carne de carneiro a 5°C (Sheridan *et al.*, 1992) e rosbife a -1,5°C (Hudson *et al.*, 1994). Por outro lado, *Listeria* proliferou em carne de carneiro a 5°C embalada com 50% CO₂/50% N₂ (Nychas, 1994), em salsichas "Frankfurter" a 4°C, 7°C e 10°C embaladas com diferentes proporções de N₂ e CO₂ (Krämer e Baumgart, 1992), e em rosbife embalado com 100% CO₂ a 3°C (Hudson *et al.*, 1994).

Farber *et al.* (1996) estudaram o efeito do pH (5,6 e 6,5) e do CO₂ sobre a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em caldo infusão cérebro coração (BHI). De acordo com estes pesquisadores, com pH 6,5, 50%CO₂ e 7°C, a população de *L. monocytogenes* aumentou de 3 a 8 log UFC/ml em 12 dias de estocagem. A inibição deste microrganismo somente foi observada a 4°C, na presença de 50, 70 ou 90% CO₂, quando houve um declínio na população de 0,3 a 0,6 ciclos logarítmicos.

Geralmente, a atmosfera modificada tem efeito bacteriostático e não bactericida sobre o controle de *L. monocytogenes*. Porém, características do alimento, como Aw, pH, temperatura de estocagem e, até mesmo, a presença de microbiota competitiva podem afetar a multiplicação deste microrganismo (Garcia de Fernando *et al.*, 1995).

O sucesso das embalagens em atmosfera modificada depende de muitos fatores, incluindo as boas práticas de fabricação e o correto uso da mistura de gases, filmes plásticos e equipamentos, além da manutenção de uma temperatura de estocagem adequada. É importante comentar que o controle da temperatura e a atmosfera modificada não irão melhorar a qualidade do produto, mas com certeza irão retardar o desenvolvimento dos microrganismos e a conseqüente deterioração do alimento.

2. Objetivo

Esse trabalho teve como principal objetivo analisar o efeito combinado de bacteriocina produzida por *L. sake* 2a e embalagem em atmosfera modificada no controle de *L. monocytogenes* em lingüiça fresca refrigerada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Culturas microbianas

Utilizou-se a cepa de *Lactobacillus sake* 2a isolada de lingüiça de frango por De Martinis e Franco (1997), e as cepas de *Listeria monocytogenes* F5069r, *Listeria monocytogenes* ATCC 11915r e *Listeria monocytogenes* Scott Ar que carregam o plasmídeo pGK12 que confere resistência a cloranfenicol e eritromicina (Foegeding *et al.*, 1992). As cepas mutadas foram fornecidas pelo Dr. Thomas J. Montville (Cook College, Rutgers, The State University of New Jersey, NY).

Inicialmente, a atividade antagonística da bacteriocina foi determinada (de acordo com método descrito no item 3.3) contra as três cepas de *L. monocytogenes* resistentes a eritromicina e cloranfenicol. Posteriormente, *L. monocytogenes* F5069r foi escolhida para a continuidade do trabalho por ser a mais sensível à bacteriocina produzida por *L. sake* 2a.

3.2. Preparo dos inóculos

L. monocytogenes F5069r foi cultivada a 37°C por 18 a 24 horas em 5 ml de caldo BHI adicionado de 5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma) e 0,5 µg/ml de eritromicina (Sigma). *Lactobacillus sake* 2a foi cultivado a 30°C por 18 a 24 horas em 5 ml de caldo MRS formulado, contendo 0,5% de glicose. As culturas foram submetidas à centrifugação a 1600g (Centrífuga Hettich Mikro 22R) por 20 min. Após a remoção do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em salina 0,85% de forma a reconstituir o volume inicial. Os tubos foram agitados e novamente centrifugados. A etapa de lavagem foi repetida por mais duas

vezes. As culturas lavadas foram empregadas na inoculação das lingüiças e o primeiro sobrenadante proveniente da cultura de *L. sake* 2a foi submetido a teste de produção de bacteriocina, conforme descrito no item 3.3. O número de UFC/ml das culturas lavadas de *L. monocytogenes* F5069r e de *L. sake* 2a foi determinado por semeadura nos meios TSAyea (Ágar Triptose Soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura, 5µg/ml de cloranfenicol (Sigma) e 0,5µg/ml de eritromicina (Sigma)) e MRS, respectivamente. As placas de TSAyea foram incubadas a 37°C e as de MRS a 30°C, por 48 horas.

Todos os meios utilizados neste trabalho foram da marca Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

3.3. Avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* à bacteriocina produzida por *L. sake* 2a

Para a avaliação da produção de bacteriocina e/ou da sensibilidade de *Listeria monocytogenes* utilizou-se a técnica de difusão em poços (Harris *et al.*, 1989). Caldo BHI adicionado de 1% de ágar foi fundido e mantido em banho aquecedor (Julabo 19 MP) a 45°C. Após a inoculação de 10^5 - 10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes* F5069r, este meio foi transferido para uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro. Após a solidificação do meio, perfurou-se poços de 3 a 4 mm de diâmetro. A esses poços adicionou-se 40µl do sobrenadante da cultura de *L. sake* 2a, proveniente do caldo MRS incubado a 30°C por 18 horas, centrifugado a 1600g por 20 min, neutralizado (pH 7,0) com solução de NaOH (10N) e esterilizado por filtração em membrana 01300 0,22 µm (Millipore). As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. O antagonismo foi detectado pela formação de um halo de inibição de crescimento da cultura indicadora ao redor do sobrenadante de *L. sake* 2a.

3.4. Fabricação e inoculação das lingüiças

A Figura 1 mostra as principais etapas da fabricação de lingüiças.

Figura 1. Representação esquemática das etapas de preparo e acondicionamento das lingüiças.

As matérias-primas utilizadas na elaboração dos embutidos foram adquiridas no comércio de São Paulo. A formulação para a fabricação da massa da lingüiça encontra-se na Tabela 3. Para o embutimento utilizou-se tripa de porco natural salgada.

Tabela 3. Formulação de lingüiça frescal.

Matéria-prima	g/kg de produto
Carne suína (pernil sem osso)	967,0
Sal	20,0
Açúcar	1,0
Condimentos	7,0
Nitrito de Sódio	0,145
Antioxidante (Exacor)	2,5
Emulsificante (Ligatari)	3,0

Optou-se pela utilização de nitrito de sódio na proporção de 150ppm (limite estabelecido pela Portaria nº1.004 – SVS/MS de 11/12/1998) para substituir misturas comerciais de sal de cura. O antioxidante Exacor (Exato Ind. e Com. Ltda.) contém em sua formulação ácido ascórbico e dióxido de silício, que atuam como antioxidante e antiumectante, respectivamente. O emulsificante Ligatari (Exato Ind. e Com. Ltda.) contém o estabilizante ET-IV (metafosfato de sódio) que mantém a aparência homogênea no produto final.

No laboratório, a carne foi cortada em pedaços e, em seguida, moída (moedor CAF, modelo mini). Todas as peças do moedor em contato com a carne foram esterilizadas por autoclavação a 121°C por 15 min. A seguir, adicionou-se os temperos e a mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma espátula estéril.

A massa de lingüiça (mistura da carne com os condimentos e aditivos), bem como a tripa para o embutimento, previamente lavada e congelada, foram submetidos à irradiação com 10 KGy (Fonte de cobalto 60, Empresa Brasileira de Radiações Ltda. – Embrarad, Cotia – SP), com o objetivo de eliminar a microbiota natural.

As culturas microbianas, obtidas conforme descrito no item 3.2, foram submetidas a diluições decimais em salina 0,85%. A seguir, adicionou-se 80 ml da diluição adequada a cada 800 g de massa de lingüiça de modo a obter 10^5 UFC/g de bactéria láctica e/ou 10^4 UFC/g de *L. monocytogenes* F5069r. Controles negativos, inoculados apenas com salina estéril, foram também preparados.

A homogeneização dos inóculos na massa de lingüiça foi feita por massageamento manual dos sacos plásticos usados para o acondicionamento. Antes do uso, a tripa foi assepticamente imersa em água destilada estéril. As lingüiças foram preparadas assepticamente em uma capela de fluxo laminar vertical, sendo a manipulação feita com luvas cirúrgicas desinfetadas com etanol 70%. O embutimento foi feito utilizando-se uma ensacadeira de alumínio com capacidade de 2 litros. Após o enchimento com a massa de lingüiça, a tripa foi torcida para a obtenção de gomos de aproximadamente 50g. Os gomos foram separados com uma lâmina de bisturi estéril e acondicionados individualmente em bandejas de plástico, que foram inseridas em sacos plásticos.

Nos períodos entre o enchimento das lingüiças e a selagem das embalagens, as amostras foram mantidas em ambiente refrigerado. Após a selagem das embalagens (com ou sem atmosfera modificada), as amostras foram refrigeradas a 6°C. O experimento foi repetido quatro vezes.

3.5. Embalagem

As bandejas, com os gomos de lingüiça, foram embaladas individualmente nas seguintes atmosferas:

- Ar
- Atmosfera modificada - 100% CO₂
- Atmosfera modificada - 50% CO₂ e 50% N₂

A Tabela 4 mostra os 12 tratamentos principais, correspondentes às três condições de embalagem (ar, 50%CO₂+50%N₂, 100%CO₂) e à combinação de quatro condições de inoculação (amostra não inoculada, amostra com *L. monocytogenes* F5069r apenas, amostra com *L. sake* 2a apenas e amostra com *L. monocytogenes* F5069r e *L. sake* 2a).

Tabela 4. Tratamentos aplicados às amostras de lingüiça em função do tipo de inóculo e da condição de embalagem utilizada.

Tratamento	Tipo de inóculo	Tipo de embalagem
1	Amostra não inoculada	Ar
2	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ar
3	<i>Lactobacillus sake</i> 2a	Ar
4	<i>L. monocytogenes</i> e <i>L. sake</i> 2a	Ar
5	Amostra não inoculada	50%CO ₂ + 50%N ₂
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	50%CO ₂ + 50%N ₂
7	<i>Lactobacillus sake</i> 2a	50%CO ₂ + 50%N ₂
8	<i>L. monocytogenes</i> e <i>L. sake</i> 2a	50%CO ₂ + 50%N ₂
9	Amostra não inoculada	100%CO ₂
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	100%CO ₂
11	<i>Lactobacillus sake</i> 2a	100%CO ₂
12	<i>L. monocytogenes</i> e <i>L. sake</i> 2a	100%CO ₂

O CO₂ e o N₂ foram fornecidos pela White Martins Gases Industriais SA. Para a embalagem das amostras em atmosfera modificada foi utilizado filme tipo “Barrier Bag” da Cryovac com estrutura EVA multicamadas (permeabilidade máxima ao oxigênio de 30 cm³/m².dia a 23°C e permeabilidade máxima ao vapor d’água de 10g/cm².dia a 23°C), enquanto que para as amostras embaladas em ar, utilizou-se sacos plásticos de polietileno permeáveis ao oxigênio.

O ar foi removido das embalagens antes da introdução de N₂ ou CO₂. O equipamento utilizado nesta etapa foi uma seladora Engevac 20 L dotada de sistema de vácuo e bicos injetores de gás.

3.6. Análise da composição da atmosfera

O acompanhamento da composição gasosa no interior das embalagens foi efetuado amostrando-se 50μl da atmosfera com uma microseringa especial para análise de gases através de um septo para cromatografia em fase gasosa colado sobre a embalagem. A seguir, a análise foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo Star CX, equipado com detector de condutividade térmica e

integrador eletrônico modelo CG-300. Foi utilizada coluna 60/80 carboxentm-1000 de 15ft X 1/8in.

O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. As condições no equipamento foram: fluxo na coluna: 30 ml/min; fluxo na coluna de referência: 30 ml/min; temperatura do injetor: 45°C; temperatura do detector: 170°C; temperatura do filamento: 125°C; temperatura da coluna: no início 35°C por 5 min e, então, aumento na taxa de 20°C/min até a temperatura final de 150°C, a qual foi mantida por 10 min (Souza *et al.*, 2001).

A composição qualitativa foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os dos respectivos padrões de gases. A composição quantitativa foi calculada através da integralização da área dos picos, sendo expressa como porcentagem em massa.

No primeiro ensaio, a análise da atmosfera gasosa foi realizada semanalmente, após 2, 8, 15, 22 e 29 dias de armazenamento. Como não houve alteração significativa na composição da atmosfera nesse período, nos demais ensaios essa análise foi realizada após 8 e 29 dias de armazenamento.

3.7. Monitoramento do pH

Após a abertura das embalagens, 10 g de amostra foram retiradas e homogeneizadas em 10 ml de água para que fosse medido o pH com fitas indicadoras de pH (Merck) com escala de 4,0 a 7,0.

3.8. Amostragem das lingüiças preparadas

As embalagens foram abertas assepticamente e de cada gomo de 50g foram retiradas 25g, os quais foram diluídos em 225 ml de água peptonada 0,1% estéril. A homogeneização foi efetuada em aparelho Stomacher (Seward 400) por 30 segundos. A partir dessa diluição (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais seriadas, as quais foram semeadas nos meios de cultura adequados, conforme o microrganismo a ser enumerado.

3.9. Enumeração de *L. monocytogenes*, *L. sake* 2a e de bactérias mesófilas aeróbias nas lingüiças

A enumeração da população de *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sake* 2a, inoculados nos gomos de lingüiça, foi realizada no tempo zero e a cada 7 dias durante 4 semanas.

Para a enumeração de *L. sake* 2a, semeou-se 0,1 ml de cada diluição em superfície em ágar MRS (Vedamuthu *et al.*, 1992). As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas em jarra de anaerobiose (Merck), empregando-se o sistema Anaerogen (Oxoid). A enumeração de *L. monocytogenes* F5069r foi feita por semeadura em superfície, em Palcam e TSAyea (De Martinis e Franco, 1998). Todos os meios, com exceção do ágar MRS, foram incubados a 37°C por 48 horas. Após esse período, a contagem das colônias foi realizada nas placas com 25 a 250 colônias e relatadas como unidades formadoras de colônias por g (UFC/g) de lingüiça.

A enumeração da população de microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada somente nas lingüiças não inoculadas. Após o preparo das diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%, 0,1ml de cada diluição foi semeado na superfície de placas de ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 h (Swanson *et al.*, 1992).

3.10. Análise Sensorial

As lingüiças destinadas à análise sensorial não foram inoculadas com *Listeria monocytogenes*, nem foram submetidas à irradiação, para evitar a oxidação da gordura.

Na análise sensorial foram incluídos parâmetros subjetivos e objetivos. A avaliação da cor, odor, consistência e presença de limosidade foram os fatores subjetivos, enquanto que a população microbiana foi o fator objetivo.

Os testes com lingüiças embaladas em atmosfera modificada foram realizados após 11 dias de estocagem a 6°C, e aqueles com lingüiças embaladas com filme permeável ao oxigênio foram realizados após 5 dias nessa temperatura. Esses tempos foram estabelecidos em experimento piloto, nos quais foi monitorada a população de bactérias psicrotróficas. Segundo

Ehioba *et al.* (1987), quando essa população atinge 7,5 log UFC/g, a carne de porco não deve ser mais consumida (vida-de-prateleira).

O método sensorial utilizado foi o teste triangular, de acordo com Meilgaard *et al.* (1999). Esse teste é discriminativo e serve para determinar se amostras que sofreram tratamentos diversos diferem sensorialmente entre si ($P \leq 0,05$). Neste estudo, o objetivo foi detectar ou não diferença significativa entre as características sensoriais de lingüiças inoculadas com *Lactobacillus sake* 2a e de lingüiças não inoculadas, e entre as amostras embaladas com atmosfera modificada e embaladas com ar. A equipe de provadores foi composta por 16 pessoas.

Cada provador recebeu três amostras codificadas e foi informado que duas amostras eram iguais e uma era diferente. Em seguida, o provador foi solicitado a provar as três amostras e identificar a amostra diferente. Para a análise do resultado, o número de respostas corretas foi contabilizado e uma tabela apropriada foi usada para a obtenção de conclusões (Meilgaard *et al.*, 1999). Os provadores não foram treinados, mas receberam uma breve orientação antes da realização do teste para familiarizarem-se com os procedimentos.

As amostras foram servidas aos provadores em todas as combinações possíveis: AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB. Quando o provador não conseguiu detectar a amostra diferente, ainda assim ele foi forçado a fazer uma escolha ao acaso, sendo essa escolha considerada na análise estatística dos resultados.

As condições dos testes foram cuidadosamente controladas para que as amostras fossem homogêneas em todos os aspectos, tais como peso, volume e formato. As amostras também foram servidas em recipientes iguais.

Vale lembrar que esse teste verifica apenas se existe diferença entre as amostras, mas não avalia a razão da diferença, ou o grau de diferença entre as amostras (se elas diferem muito ou pouco), ou ainda, se uma amostra é melhor que a outra.

Segue abaixo um exemplo das fichas utilizadas para a realização do teste:

Ficha de Aplicação

Nome: _____ Data: _____

Por favor, prove as amostras codificadas de lingüiça da esquerda para a direita. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente.

885	502	742
-----	-----	-----

Comentários: _____

As amostras de lingüiça empregadas nos testes de análise sensorial foram padronizadas empregando-se os seguintes procedimentos:

1. Cozimento em água durante 10 minutos;
2. Fritura em óleo previamente aquecido com fogo baixo durante 6 a 8 minutos;
3. Retirada do excesso de óleo nas lingüiças em papel toalha;
4. Corte das lingüiças em rodela uniformes de 2-3 mm de espessura.

A análise sensorial foi realizada logo após o preparo das amostras, sendo estas reaquecidas em forno de microondas por 4 segundos.

Como o teste triangular só pode ser realizado com dois tipos de amostras diferentes de cada vez, as sete comparações realizadas foram as seguintes:

1. Amostra s/ inóculo em ar VS. Amostra c/ *L. sake* 2a em ar
2. Amostra s/ inóculo em ar VS. Amostra c/ *L. sake* 2a em 100% CO₂
3. Amostra s/ inóculo em ar VS. Amostra c/ *L. sake* 2a em 50% N₂/50% CO₂
4. Amostra s/ inóculo em ar VS. Amostra s/ inóculo em 100% CO₂
5. Amostra s/ inóculo em ar VS. Amostra s/ inóculo em 50% N₂/50% CO₂
6. Amostra s/ inóculo em 100% CO₂ VS. Amostra c/ *L. sake* 2a em 100% CO₂
7. Amostra s/ inóculo em 50%N₂/50%CO₂ VS. Amostra c/ *L. sake* 2a em 50%N₂/50%CO₂

3.11. Avaliação da qualidade microbiológica das lingüiças utilizadas na análise sensorial

A população microbiana nas lingüiças empregadas na análise sensorial foi avaliada através da enumeração de bactérias psicrotróficas, bactérias mesófilas aeróbias e bactérias lácticas.

Bactérias psicrotróficas foram enumeradas por semeadura em superfície (Cousin *et al.*, 1992). Após o preparo de diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%, 0,1ml de cada diluição foi semeada, por espalhamento, em PCA. As placas foram incubadas a 5°C por 7-10 dias. Após esse tempo, a contagem das colônias foi realizada em placa contendo de 25 a 250 colônias. As contagens foram relatadas como UFC/g de lingüiça. Bactérias mesófilas aeróbias e lácticas foram enumeradas conforme descrito no item 3.9.

3.12. Análise Estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o “planejamento experimental em parcelas subdivididas” (Gomes, 1987), recomendável para casos em que se pretende estudar dois ou mais tipos diferentes de tratamentos.

O delineamento para a avaliação das contagens de *Lactobacillus sake* 2a foi realizado inteiramente ao acaso em parcelas subdivididas, enquanto que o delineamento para a avaliação das contagens de *Listeria monocytogenes* F5069r foi realizado em parcelas subdivididas em blocos completos. Utilizou-se o programa SAS 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA Copyright @ 1989-1996, Release 6.12 TS level 0020) para a execução dos cálculos.

Foram realizadas quatro repetições genuínas. O período de armazenamento da lingüiça foi de 28 dias, sendo as análises realizadas semanalmente (T_0 , T_7 , T_{14} , T_{21} , e T_{28}). Desta forma, o número total de ensaios foi de 240, ou seja, 12 tratamentos x 4 repetições x 5 tempos.

A interação (Txt) também foi desdobrada para a verificação do melhor tratamento dentro de cada tempo. Neste caso, utilizou-se para a comparação múltipla o teste de Tukey.

4. Resultados e Discussão

4.1. Verificação da atividade antagonística da linhagem *Lactobacillus sake* 2a

A Tabela 5 mostra os resultados da atividade da bacteriocina de *L. sake* 2a sobre as três cepas de *L. monocytogenes* resistentes a eritromicina e cloranfenicol.

Tabela 5. Formação de halos devido à ação de bacteriocina produzida por *L. sake* 2a.

Cepas testadas	Tamanho do halo de inibição (mm) ^a
<i>Listeria monocytogenes</i> F5069r	3
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 11915	2
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott Ar	2

a. Medido da borda do poço até o limite extremo do halo.

Dentre as três cepas utilizadas no teste preliminar, *L. monocytogenes* F5069r apresentou maior sensibilidade à bacteriocina e, por isso, foi escolhida para a continuidade do trabalho. Antes do início de cada ensaio experimental, a bactéria láctica foi novamente testada quanto à sua capacidade de produzir bacteriocina. Em todos os testes, obteve-se halos de 2 a 3mm de largura.

4.2. Enumeração de bactérias mesófilas aeróbias nas lingüiças

A população de bactérias mesófilas aeróbias nas lingüiças controle, correspondentes aos tratamentos 1, 5 e 9 (Tabela 4), em PCA foi inferior a 10^2 UFC/g para todas as amostras. Isso comprova que o processo de irradiação com 10 KGy foi eficiente para a redução da microbiota natural do produto, e se houve contaminação remanescente, a metodologia utilizada não foi sensível o suficiente para a sua detecção. Como a contagem permaneceu a mesma durante as quatro semanas de análise, conclui-se que, se havia microrganismos remanescentes, eles não foram capazes de se multiplicar durante a estocagem em refrigeração.

4.3. Multiplicação de *Lactobacillus sake* 2a

Os resultados da enumeração de *L. sake* 2a nas lingüiças submetidas aos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 6.

Pode-se observar pela Tabela 6 e pela Figura 2 que a embalagem em atmosfera modificada não teve influência na multiplicação de *L. sake* 2a, pois a população deste microrganismo foi aproximadamente a mesma nas lingüiças submetidas aos três tratamentos. Nota-se também que esta bactéria proliferou com facilidade em lingüiça frescal a 6°C, o que já era esperado, devido à cepa ter sido isolada de um produto cárneo.

A análise estatística, através da análise de variância, indicou um coeficiente de variação dos resultados, obtidos nas quatro repetições, de 7,2%, que pode ser considerado um valor baixo por tratar-se de um experimento biológico.

Tabela 6. População média^a (log UFC/g) de *Lactobacillus sake* 2a nas amostras de lingüiça submetidas aos tratamentos 3, 4, 7, 8, 11 e 12, durante estocagem a 6°C.

Tempo		L. sake 2a (logUFC/g)					
(dias)		Trat. 3 ^b	Trat. 4 ^b	Trat. 7 ^b	Trat. 8 ^b	Trat. 11 ^b	Trat. 12 ^b
0		4,9	5,0	4,9	5,1	4,9	5,0
7		6,2	6,2	6,3	6,2	6,2	6,2
14		8,5	8,5	7,8	8,2	7,9	7,5
21		8,8	8,8	8,5	8,6	8,6	8,1
28		8,7	8,7	8,5	8,4	8,6	8,6

a. Média de 4 repetições.

b. Tratamentos: consultar Tabela 4.

Figura 2. População de *Lactobacillus sake* 2a em lingüiça embalada em ar, 50%CO₂+50%N₂ e 100% CO₂ durante estocagem a 6°C.

4.4. Multiplicação de *L. monocytogenes* F5069r

Os resultados da enumeração de *L. monocytogenes* F5069r nas lingüiças em função do tratamento, do meio de cultura empregado para contagem e do período de estocagem encontram-se na Tabela 7. Estatisticamente, as contagens de *L. monocytogenes* F5069r realizadas nos meios de Palcam e TSAyea não diferiram significativamente. Apesar do Palcam ser um meio seletivo, as células de *L. monocytogenes* desenvolveram-se bem, mesmo com a ausência de um pré-enriquecimento.

A análise de variância mostrou que o modelo foi significativo, isto é, os tratamentos aplicados (atmosfera modificada e/ou adição de *L. sake* 2a) influenciaram significativamente a multiplicação de *L. monocytogenes* F5069r ($P \leq 0,05$) nas condições testadas. O coeficiente de variação dos resultados da enumeração de *L. monocytogenes* F5069r nas amostras de lingüiça foi 15,44%, valor aceitável para experimentos biológicos.

Na Tabela 8, encontram-se as populações de *L. monocytogenes* F5069r nas lingüiças embaladas nas três atmosferas testadas e armazenadas em refrigeração, o desvio padrão e a comparação estatística entre as médias. Os dados indicam, ao final da quarta semana, que:

- a população de *L. monocytogenes* F5069r nas amostras sem *L. sake* 2a foi 3,7 ciclos logarítmicos maior que nas amostras com a bactéria láctica produtora de bacteriocina e embaladas com filme permeável ao oxigênio;
- na amostra co-inoculada com *L. sake* 2a embalada com 50%CO₂/50%N₂, a multiplicação de *L. monocytogenes* F5069r foi reduzida de 2,6 ciclos logarítmicos em relação ao respectivo controle;
- na amostra co-inoculada com *L. sake* 2a embalada com 100%CO₂, a multiplicação de *L. monocytogenes* F5069r foi reduzida de 0,7 ciclos logarítmicos em relação ao respectivo controle;
- nas amostras inoculadas com *L. monocytogenes* F5069r e *L. sake* 2a simultaneamente e embaladas em atmosfera modificada, verificou-se que a população de *L. monocytogenes* F5069r foi 6,4 ciclos logarítmicos inferior ao controle inoculado apenas com *L. monocytogenes* F5069r e embalado com ar.

Tabela 7. População média^a de *Listeria monocytogenes* F5069r nas amostras de lingüiça determinada nos meios de cultura Palcam (Oxoid) e TSAyea (Oxoid).

<i>L. monocytogenes</i> F5069 (logUFC/g)													
Tempo (dias)	Palcam						TSAyea						
	Trat. 2 ^b	Trat. 4 ^b	Trat. 6 ^b	Trat. 8 ^b	Trat. 10 ^b	Trat. 12 ^b	*Trat. 2 ^b	Trat. 4 ^b	Trat. 6 ^b	Trat. 8 ^b	Trat. 10 ^b	Trat. 12 ^b	
0	3,5	3,6	3,5	3,6	3,6	3,7	3,5	3,6	3,5	3,6	3,7	3,7	
7	5,5	5,1	4,0	3,9	3,9	3,8	5,4	5,0	4,0	3,9	3,9	3,8	
14	7,0	5,8	4,4	3,5	3,7	3,5	6,9	5,6	4,4	3,5	3,7	3,5	
21	8,3	5,7	5,1	3,1	3,8	2,9	8,2	5,5	5,0	3,1	3,7	3,0	
28	9,4	5,7	5,5	2,8	3,7	2,9	9,3	5,5	5,5	3,0	3,6	2,8	

a. Média obtida com os resultados de 4 repetições.

b. Tratamentos: consultar Tabela 4.

Tabela 8. População média ^a de *Listeria monocytogenes* F5069r (log UFC/g) em amostras de lingüiça com e sem *Lactobacillus sake* 2a embaladas em ar, 50%CO₂+50%N₂ ou 100% CO₂, durante estocagem a 6°C.

Tipo de embalagem	Microorganismos	Tempo (dias)														
		0 ^b		7 ^b		14 ^b		21 ^b		28 ^b						
Ar	<i>L. monocytogenes</i>	3,5	a A	0,24	5,4	a B	1,26	7,0	a C	1,58	8,2	a D	1,25	9,3	a E	0,27
	somente ^b															
50%CO ₂ + 50%N ₂	<i>L. monocytogenes</i>	3,6	a A	0,41	5,0	a B	0,82	5,7	b B	0,83	5,6	b B	0,82	5,6	b B	0,76
	+ <i>L. sake</i> 2a ^b															
	<i>L. monocytogenes</i>	3,5	a A	0,21	4,0	b AB	0,40	4,4	c BC	0,75	5,0	b CD	0,74	5,5	b D	1,13
	somente ^b															
	<i>L. monocytogenes</i>	3,6	a AB	0,29	3,9	b A	0,37	3,5	d AB	0,47	3,1	c B	0,20	2,9	c B	0,18
	+ <i>L. sake</i> 2a ^b															
100%CO ₂	<i>L. monocytogenes</i>	3,7	a A	0,29	3,9	b A	0,47	3,7	d A	0,16	3,7	d A	0,47	3,6	d A	0,68
	somente ^b															
	<i>L. monocytogenes</i>	3,7	a A	0,34	3,8	b A	0,61	3,5	d AB	0,39	3,0	c B	0,21	2,9	c B	0,16
	+ <i>L. sake</i> 2a ^b															

a. Média de 4 repetições genuínas, considerando-se os resultados obtidos com os dois meios de cultura utilizados, Palcam e TSAyea.

b. Para cada coluna, valores relacionados com letras minúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$). Para cada linha, valores relacionados com letras maiúsculas iguais não são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

c. DP= Desvio Padrão.

4.5. Efeito combinado de bacteriocina e atmosfera modificada no controle de *L. monocytogenes*

Pode-se observar pela Figura 2, que a atmosfera modificada não afetou a multiplicação de *Lactobacillus sake* 2a em lingüiça. O número de células viáveis, inicialmente de 10^5 UFC/g, chegou a 10^8 UFC/g em 15 dias e não mudou significativamente até 28 dias, independentemente do tipo de atmosfera na embalagem.

Por outro lado, a atmosfera modificada afetou intensamente a multiplicação de *L. monocytogenes* na lingüiça (Figura 3). Como indicado na Tabela 8, em amostras embaladas em ar que continham somente *L. monocytogenes*, a população deste microrganismo aumentou 1,9 log em 7 dias, 3,5 log em 14 dias, 4,7 log em 21 dias e 5,8 log em 28 dias. Quando embaladas com 50%CO₂:50%N₂, a multiplicação de *L. monocytogenes* foi lenta e gradativa, aumentado 0,5 log na primeira semana, 0,9 log após 14 dias e 2 log após 28 dias. O efeito do CO₂ foi ainda mais intenso. A multiplicação de *L. monocytogenes* foi completamente inibida em atmosfera com 100% CO₂, uma vez que o número de células viáveis permaneceu praticamente constante até o final do tempo de amostragem, o que sugere um efeito bacteriostático.

O efeito da presença de *L. sake* 2a sobre a inibição de *L. monocytogenes* em lingüiça refrigerada de acordo com o tipo de embalagem pode ser observado na Tabela 8 e na Figura 4. Em amostras contendo *L. sake* 2a, sem nenhum sistema especial de embalagem, a população de *L. monocytogenes* aumentou 1,4 log após 7 dias, 2,1 log após 14 dias, e então permaneceu constante até o final do tempo de estocagem, 28 dias. Nessas amostras, a população de *L. monocytogenes*, após 7 dias, foi 0,4 log menor que as amostras sem *L. sake* 2a. No tempo remanescente de estocagem, as diferenças na população de *L. monocytogenes* foram 1,3 log para 14 dias, 2,6 log para 21 dias e 3,7 log para 28 dias. Em amostras embaladas com 50%CO₂/50%N₂, essas diferenças foram 0,1 log, 0,9 log, 1,9 log e 2,6 log, respectivamente. Em amostras embaladas com 100% CO₂, as diferenças permaneceram constantes até 14 dias, mas com 21e 28 dias, o número de

Figura 3. População de *Listeria monocytogenes* F5069r em lingüiça embalada em ar, 50%CO₂+50%N₂ e 100%CO₂ durante estocagem a 6°C.

Figura 4. Efeito combinado de *Lactobacillus sake* 2a e embalagem em ar, 50%CO₂/50%N₂ e 100% CO₂ sobre a multiplicação de *Listeria monocytogenes* F5069r em lingüiça fresca, durante estocagem a 6°C.

células viáveis foi menor que a população inicial (redução de 0,7 log), o que sugere um efeito bactericida.

Nas duas amostras co-inoculadas e embaladas em atmosfera modificada verificou-se que a redução na contagem de *L. monocytogenes* F5069r em relação ao controle inoculado apenas com *L. monocytogenes* F5069r e embalado com ar foi de aproximadamente 1,6 log após 7 dias, 3,5 log após 14 dias, 5,1 log após 21 dias e 6,5 log após 28 dias. A avaliação estatística dos resultados indicou que essas diferenças foram significativas (Tabela 8).

A ação inibitória de *L. monocytogenes* por *L. sake* 2a e sua bacteriocina em lingüiça de porco já havia sido inicialmente comprovada por De Martinis e Franco (1998).

Alguns estudos anteriores também avaliaram o efeito combinado de bacteriocina e atmosfera modificada na multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Hugas *et al.* (1998) observaram que somente a aplicação de vácuo ou atmosfera modificada (20% CO₂, 80% O₂) não foi suficiente para inibir a multiplicação de *Listeria* em carne de porco moída, peito de frango e carne de porco cozida. Neste mesmo estudo, a aplicação de *L. sakei* CTC494 ou da bacteriocina sakacina K inibiu a proliferação de *L. monocytogenes* em diferentes níveis quando comparado ao controle, em todos os produtos estudados embalados em ar, vácuo ou atmosfera modificada. Resultados similares foram obtidos por Schöbitz *et al.* (1999) que concluíram que uma substância inibitória produzida por *Carnobacterium piscicola* e embalagem a vácuo foram capazes de inibir completamente a multiplicação de *L. monocytogenes* em carne.

Szabo e Cahill (1998) estudaram o efeito combinado de atmosfera modificada (ar, 100% N₂, 40%CO₂:60%N₂, e 100% CO₂) e nisina sobre a proliferação de *L. monocytogenes* em TSB. Foi observado que a atmosfera modificada isoladamente influenciou, de forma significativa, a taxa de crescimento de *L. monocytogenes*. A 4°C a multiplicação não ocorreu na presença de 100% CO₂. Na presença de nisina (400 IU/ml), um aumento máximo de 2 log na população foi observado em todas as atmosferas, exceto em 100% CO₂, quando a multiplicação foi inibida.

Nilsson *et al.* (2000) realizaram um estudo sobre a utilização de nisina e de CO₂ no controle de *L. monocytogenes* Scott A, concluindo também que houve um efeito sinérgico sobre o controle desta bactéria patogênica. Segundo estes pesquisadores, o CO₂ causou uma modificação na composição de ácidos graxos da membrana. A presença de CO₂ induziu uma maior proporção de ácidos graxos de cadeia curta, o que provocou um aumento na fluidez da membrana. Este fato, então, facilitou a formação de poros pela nisina. O aumento da ação letal da nisina sobre células crescidas em atmosfera com dióxido de carbono, portanto, pode ser atribuída a uma mudança na permeabilidade da membrana.

Abee *et al.* (1994) relataram que a temperatura de incubação também influencia a composição de ácidos graxos da célula. Células crescidas em baixas temperaturas (4°C) foram mais sensíveis à nisina que células crescidas em altas temperaturas (30°C), reduzindo a preocupação em relação ao desenvolvimento de células resistentes à nisina em temperaturas de refrigeração. Isto pode ser explicado através da proporção de ácidos graxos insaturados na membrana, sendo que quanto maior a proporção de ácidos graxos insaturados, maior a fluidez. O conteúdo de ácidos graxos com menor ponto de fusão é maior em células crescidas em temperaturas mais baixas. A alteração dos ácidos graxos então pode sugerir o aumento da fluidez na membrana, o qual está associado ao aumento na eficiência da bacteriocina. Esses estudos indicam que a atmosfera modificada e a estocagem em baixas temperaturas melhoram a atividade da bacteriocina.

A utilização de 100% de CO₂ já é suficiente para a inibição total da multiplicação de *L. monocytogenes* em produtos estocados em baixas temperaturas, como foi observado no presente estudo. Entretanto, o uso concentrações inferiores de CO₂ reduzem a taxa de crescimento mas não impedem a multiplicação de *L. monocytogenes*. Estudos realizados sobre a influência do CO₂ sobre a proliferação de *L. monocytogenes* mostram resultados contraditórios.

Gill e Reichel (1989) inocularam *L. monocytogenes* em carne com pH>6,0 e avaliaram a influência da temperatura (-2, 0, 2, 5 e 10°C) e do sistema de embalagem (a vácuo e 100% CO₂) sobre a proliferação deste microrganismo. Nas amostras embaladas a vácuo, *L. monocytogenes* não se

multiplicou a -2°C e, nas temperaturas mais altas, apresentou fase lag mais extensa e cresceu em taxas mais lentas que a microbiota deterioradora. Em embalagem com 100% de CO_2 , *L. monocytogenes* foi totalmente inibida em amostras estocadas em temperaturas inferiores a 2°C . A 10°C , nessa mesma atmosfera, a população aumentou 2,1 ciclos logarítmicos após 10 dias de estocagem.

Hart *et al.* (1991) investigaram a multiplicação de *L. monocytogenes* em peito de frango sem pele estocado a 1, 6 e 15°C em várias atmosferas. A 1°C , o microrganismo não se multiplicou em nenhuma das atmosferas testadas. A 6°C , o microrganismo multiplicou-se vagorosamente na presença de atmosfera com 30% CO_2 /70% N_2 e 100% CO_2 . No entanto, não houve um aumento significativo da população durante os 15 dias de estocagem.

Mano *et al.* (1995) estudaram a multiplicação de *L. monocytogenes* a 1 e 7°C em carne de porco embalada com ar, 100% N_2 , 20%/80% e 40%/60% CO_2 / O_2 . A 1°C , a multiplicação deste microrganismo foi inibida durante 30 dias de armazenamento, principalmente nas amostras com CO_2 . A 7°C , a população de *L. monocytogenes* aumentou em 2 ciclos logarítmicos nas amostras embaladas em ar após 10 dias de armazenamento.

Sheridan *et al.* (1995) analisaram as taxas de crescimento de *L. monocytogenes* em carne de carneiro embalada com atmosfera modificada (vácuo, 20% CO_2 /80% O_2 , 50% CO_2 /50% N_2 e 100% CO_2) e em ar. A 5°C , *L. monocytogenes* desenvolveu-se na carne picada embalada em ar e em todas as atmosferas modificadas, exceto com 100% de CO_2 . A 0°C , a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida em todas as amostras.

Barakat e Harris (1999) estudaram o efeito da atmosfera modificada, da microbiota natural e da adição dos aditivos lactato de sódio e ALTA 2341 sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* em produtos de frango cozidos. As amostras foram embaladas em 44%:56% de CO_2 : N_2 , e estocadas a 3,5, 6,5 ou 10°C por até 5 semanas. Ambos os microrganismos cresceram em todas as condições testadas. A presença da microbiota natural de bactérias lácticas e *Brochothrix* spp. não alterou o desenvolvimento dos patógenos. A adição dos conservadores prolongou a fase lag de ambos os patógenos, mas não preveniu sua multiplicação, sendo que sua eficiência diminuiu com o aumento do tempo de estocagem.

4.6. Análise de pH

Os valores de pH obtidos nas lingüiças submetidas aos diversos tratamentos em função do tempo de armazenamento estão apresentados na Tabela 9. Nota-se que o pH começou a decrescer nas amostras inoculadas com *L. sake* 2a somente após a segunda semana de estocagem, atingindo o valor mínimo de 5,4 ao final da quarta semana.

Considerando que algumas linhagens de *L. monocytogenes* podem proliferar em um valor de pH de 4,3, pode-se afirmar que o valor mínimo de 5.4 não é suficiente para inibir este microrganismo (Jay 1999b, Lou e Yousef, 1999).

Fernández *et al.* (1997) relataram que, em meio de cultura TSBye (3g/l de extrato de levedura) com 0,5% de sal e pH 5,5 a 4°C, a população de *L. monocytogenes* aumentou de 2,4 para 7,8 log UFC/ml após 15 dias de incubação. Com 100% de CO₂, essa população, nas mesmas condições, aumentou 0,5 e 1,4 ciclos logarítmicos após 15 e 30 dias, respectivamente.

Hugas *et al.* (1998) realizaram um estudo com a inoculação de *L. sakei* CTC494 ou sakacina K em amostras de carne e afirmaram que, em amostras inoculadas com *L. curvatus* CTC371 (não produtora de bacteriocina), *L. innocua* atingiu uma população final de 2-3 log maior do que nas amostras inoculadas com a linhagem produtora de bacteriocina. Assim sendo, a inibição observada nestas amostras deve ser atribuída à produção de bacteriocina e não à presença de ácido láctico.

Campos *et al.* (1997) avaliaram a influência das cepas *Carnobacterium piscicola* DX produtora de bacteriocina e *C. piscicola* 2818 não produtora de bacteriocina sobre a multiplicação de *L. monocytogenes* a 4, 8 e 15°C em frango cozido. O pH decresceu de 6,14 para um valor mínimo de 5,65 durante o período de armazenamento. A 4 e 8°C, *C. piscicola* DX inibiu a multiplicação de *L. monocytogenes* em 3 ciclos logarítmicos, redução significativamente maior que a obtida com *C. piscicola* 2818. A 15°C, ambas as cepas de *C. piscicola* inibiram *L. monocytogenes* em 1 ciclo logarítmico.

Segundo Foegeding *et al.* (1992), a adição de bacteriocinas é especialmente importante quando a produção de ácido láctico no produto não é suficiente para reduzir o pH significativamente durante a fermentação. Nesse

caso, a produção de bacteriocinas por culturas "starters" poderá facilitar a redução da população de microrganismos patogênicos.

4.7. Análise da atmosfera gasosa

As misturas padrões de gases estavam calibradas com 50%CO₂/50%N₂ e 100%CO₂, porém, variações mínimas, de até 2%, são normais. Além disso, durante os procedimentos de embalagem (remoção do ar, introdução dos gases e selagem) e de análise podem ocorrer falhas provocando alterações na concentração final dos gases.

Os resultados obtidos através da análise da atmosfera gasosa nas embalagens estão expressos na Tabela 10. Nota-se, pelos resultados obtidos, que as variações não foram significativas, sendo em média de 1 a 3% superiores ou inferiores aos limites inicialmente esperados.

Tabela 9. Média^a dos valores de pH das lingüiças durante o tempo de estocagem, em função do tratamento utilizado.

Tempo (dias)	pH											
	Trat. 1 ^b	Trat. 2 ^b	Trat. 3 ^b	Trat. 4 ^b	Trat. 5 ^b	Trat. 6 ^b	Trat. 7 ^b	Trat. 8 ^b	Trat. 9 ^b	Trat. 10 ^b	Trat. 11 ^b	Trat. 12 ^b
0	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
7	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
14	6,1	6,1	5,7	5,7	6,1	6,1	5,7	5,7	6,1	6,1	5,8	5,8
21	6,1	6,1	5,5	5,5	6,1	6,1	5,5	5,5	6,1	6,1	5,5	5,6
28	6,1	5,9	5,4	5,4	6,1	6,1	5,4	5,4	6,1	6,1	5,4	5,5

a. Média de 4 repetições.
b. Tratamentos: consultar Tabela 4.

Tabela 10. Composição da atmosfera gasosa nas embalagens das lingüiças, em função do tratamento utilizado.

Concentração de Gases (%)													
Resultados	Tempo (dias)	CO ₂								N ₂			
		Trat. 5 ^a	Trat. 6 ^a	Trat. 7 ^a	Trat. 8 ^a	Trat. 9 ^a	Trat. 10 ^a	Trat. 11 ^a	Trat. 12 ^a	Trat. 5 ^a	Trat. 6 ^a	Trat. 7 ^a	Trat. 8 ^a
Primeiro Experimento ^b	2	48,9	48,7	49,1	48,9	99,6	99,6	99,4	99,6	51,1	51,3	50,9	50,9
	8	49,1	49,4	49,1	49,1	99,5	99,6	99,5	99,0	50,9	50,6	51,9	50,9
	15	51,5	50,4	51,9	49,3	99,4	99,6	95,2	96,2	48,5	48,9	48,0	50,5
	22	51,5	51,2	51,0	51,2	100,0	99,4	98,5	99,7	48,3	48,8	48,8	48,8
	29	51,2	50,9	50,4	50,6	100,0	99,6	100,0	99,4	48,8	49,0	49,6	49,4
Média ^c	8	51,3	49,9	52,8	50,4	98,5	99,1	99,5	98,3	49,0	48,7	47,8	47,9
	29	51,3	49,9	52,3	49,8	97,9	97,4	97,4	98,3	48,1	49,4	47,2	48,9

a. Tratamentos: consultar Tabela 4.

b. Resultados do primeiro experimento aos 2, 8, 15, 22 e 29 dias.

c. Resultados médios de quatro experimentos aos 8 e 29 dias.

4.8. Análise sensorial

Durante o experimento piloto, notou-se que após 6 dias a 6°C, as lingüiças embaladas com filme permeável ao oxigênio começaram a apresentar odor característico de produto em início de deterioração e formação de limosidade. Nas amostras embaladas com atmosfera modificada, as alterações apareceram após 12 dias a 6°C, com o desenvolvimento de odor ácido e presença de limosidade. Assim sendo, os testes que envolviam lingüiças embaladas em ar foram realizados após 5 dias de estocagem, enquanto que os testes que envolviam apenas lingüiças embaladas em atmosfera modificada foram realizados após 11 dias de estocagem (Tabela 11).

Os resultados referentes à avaliação sensorial das lingüiças embaladas nas atmosferas modificadas estão apresentados na Tabela 11. Verificou-se que até 11 dias a 6°C a bactéria láctica *L. sake* 2a não influenciou o sabor da lingüiça. Por outro lado, o sabor das lingüiças embaladas em atmosfera modificada, com 100%CO₂ e 50%CO₂/50%N₂, alterou-se após 5 dias em refrigeração. Vale ressaltar que o produto embalado em atmosfera modificada não foi rejeitado pelos provadores, ou seja, a atmosfera modificada alterou o sabor e a textura da lingüiça, mas manteve o produto em perfeitas condições de consumo por até 11 dias de estocagem a 6°C.

As populações de bactérias psicrotróficas, bactérias lácticas e bactérias mesófilas aeróbias nas lingüiças submetidas à análise sensorial podem ser observadas nas Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Observa-se que a população de bactérias psicrotróficas manteve uma média entre 7 e 8 log UFC/g após 10 dias (Figura 5) e 6 dias (Figura 8) de estocagem, exceto para o tratamento 11, quando a população desses microrganismos variou entre 5,5 e 7 log UFC/g. Como o limite estabelecido para microrganismos psicrotróficos foi de 7,5 log UFC/g, nota-se que as lingüiças foram submetidas à análise sensorial no limite de sua vida-de-prateleira após 5 ou 11 dias.

As populações de bactérias lácticas e mesófilos aeróbios mantiveram uma média entre 6 e 8 log UFC/g após 10 dias (Figuras 6 e 7) e 6 dias (Figuras 9 e 10) de estocagem, com exceção do tratamento 11, quando a população desses microrganismos variou entre 5 e 6 log UFC/g.

A coloração das lingüiças variou de acordo com a atmosfera utilizada na embalagem. As lingüiças embaladas em ar apresentaram coloração bege, enquanto que as embaladas em atmosfera modificada apresentaram coloração rosada. Com relação à consistência, notou-se que quando a população de bactérias lácticas alcançava 8 log UFC/g, a carne tornava-se mais compacta, de forma que quando se passava a faca no produto cru a carne não mais aderiria ao metal, ao contrário do que acontecia com as outras amostras.

Considerando que a vida-de-prateleira de lingüiça frescal refrigerada é, em média, 5 dias, a atmosfera modificada é capaz de duplicar o tempo de comercialização do produto. A presença de *L. sake* 2a nesse produto irá aumentar sua segurança microbiológica, sem interferir no sabor.

McMullen e Stiles (1994) também determinaram o efeito da estocagem em atmosfera com 100% CO₂ sobre a qualidade sensorial de carne de porco e concluíram que os odores característicos de deterioração (ácido e de enxofre) acumulam-se dentro da embalagem e podem restringir o tempo de vida-de-prateleira. Esses pesquisadores mantiveram as amostras a -1,5°C por três semanas com o objetivo de simular o tempo envolvido no processo de exportação. Após esse período, as amostras foram armazenadas a 4 e 7°C e submetidas à análise sensorial. As amostras armazenadas a 7°C e 4°C foram rejeitadas após 1 e 2 semanas, respectivamente. Após esses períodos, a carne apresentou características indesejáveis, tais como odor ácido e característico de enxofre.

Tabela 11. Avaliação sensorial das lingüiças com e sem *Lactobacillus sake* 2a, embaladas em ar, 50%CO₂/50%N₂ ou 100%CO₂.

Tratamentos comparados ^a		Nº de provadores que identificaram corretamente a amostra de lingüiça diferente ^b		Conclusão ^c ($\alpha \leq 0.05$)	
1) ^d	Lingüiça em ar	X	Lingüiça com <i>L. sake</i> 2a em ar	6	Não há diferença entre as amostras
2) ^d	Lingüiça em 50%CO ₂ /50%N ₂	X	Lingüiça com <i>L. sake</i> 2a em 50%CO ₂ /50%N ₂	6	Não há diferença entre as amostras
3) ^d	Lingüiça em 100%CO ₂	X	Lingüiça com <i>L. sake</i> 2a em 100%CO ₂	5	Não há diferença entre as amostras
4) ^d	Lingüiça em ar	X	Lingüiça em 50%CO ₂ /50%N ₂	9	Há diferença significativa entre as amostras
5) ^d	Lingüiça em ar	X	Lingüiça em 100%CO ₂	11	Há diferença significativa entre as amostras
6) ^d	Lingüiça em ar	X	Lingüiça com <i>L. sake</i> 2a em 50%CO ₂ /50%N ₂	9	Há diferença significativa entre as amostras
7) ^d	Lingüiça em ar	X	Lingüiça com <i>L. sake</i> 2a em 100%CO ₂	9	Há diferença significativa entre as amostras

a. As comparações foram realizadas pelo teste triangular.

b. Número total de provadores: 16.

c. As conclusões foram obtidas em consulta à tabela T8 segundo Meilgaard *et al.* (1999).

d. Os testes 1, 4, 5, 6 e 7 foram realizados após 5 dias de estocagem a 6°C, enquanto que os testes 2 e 3 foram realizados após 11 dias de estocagem a 6°C.

Figura 5. População de microrganismos psicrotróficos, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 11 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

Figura 6. População de bactérias lácticas, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça fresca submetida à análise sensorial após 11 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

Figura 7. População de microrganismos mesófilos, após 1, 10 e 14 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 11 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

Figura 8. População de microrganismos psicrotróficos, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 5 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

Figura 9. População de bactérias lácticas, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça frescal submetida à análise sensorial após 5 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

Figura 10. População de microrganismos mesófilos, após 1 e 6 dias de estocagem a 6°C, em lingüiça fresca submetida à análise sensorial após 5 dias.

Obs.: consultar Tabela 4 para identificar os tratamentos aplicados.

5. Conclusões

De acordo com as condições experimentais e resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

1. O uso combinado de atmosfera modificada e bacteriocina produzida por *L. sake* 2a resultou em um efeito sinérgico sobre o controle de *L. monocytogenes* F5069r em lingüiça frescal refrigerada.
2. Isoladamente, o tratamento com atmosfera modificada foi mais eficiente que o tratamento com a cepa produtora de bacteriocina *L. sake* 2a no controle de *L. monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada.
3. Em até 11 dias, a 6°C, a bactéria láctica *L. sake* 2a não alterou o sabor das lingüiças submetidas a qualquer um dos tratamentos aplicados. Por outro lado, o acondicionamento do produto em atmosferas com 100%CO₂ e com 50%CO₂:50%N₂ provocou a alteração do sabor das lingüiças após 5 dias à mesma temperatura.
4. O acondicionamento em atmosfera modificada estendeu a vida-de-prateleira da lingüiça frescal de 5 dias para 11 dias.
5. Entre os tratamentos testados em lingüiça frescal, a melhor combinação para o aumento da vida-de-prateleira e controle de *L. monocytogenes* F5069r foi a embalagem em atmosfera modificada, com 100% CO₂ ou 50%CO₂/50%N₂, e a adição da cepa produtora de bacteriocina *L. sake* 2a.

6. Referências Bibliográficas *

- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, p.169-185, 1995.
- ABEE, T., ROMBOUTS, F.M., HUGENHOLTZ, J., GUIHARD, G., LETELLIER, L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.60, n.6, p.1962-1968, 1994.
- AHN, C., STILES, M.E. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.56, n.8, p.2503-2510, 1990.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., Von Wright, A., eds. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.1-64.
- BARAKAT, R.K., HARRIS, L.J. Growth of *L. monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified-atmosphere-packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.1, p.342-345, 1999.
- BRUNO, M.E.C., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, n.7, p.2255-2259, 1992.

*De acordo com a NBR 6023/90 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASI) 1999 [CD-ROM].

BUCHANAN, R.L., STAHL, H.G., WHITING, R.C. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, p.844-851, 1989.

CAMPOS, C.A., MAZZOTA, A.S., MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* in vacuum-packaged cooked chicken at refrigeration temperatures. **J. Food Saf.**, Trumbull, v.17, p.151-160, 1997.

CHEN, Y., SHAPIRA, R., EISENSTEIN, M., MONTVILLE, T.J. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.2, p.524-531, 1997.

CHIKINDAS, M.L., GARCERÁ, M.J.G., DRIESSEN, A.J.M., LEDEBOER, A.M., NISSEN-MEYER, J., NES, I.F., ABEE, T., KONINGS, W.N., VENEMA, G. Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pedococcus acidilactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, p.3577-3584, 1993.

CORNFORTH, D. Color: its basis and importance. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R., eds. **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. p.43-78. (Advances in meat research series, 9).

COUSIN, M.A., JAY, J.M., VASAVADA, P.C. Psychrotrophic microorganisms. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.153-168.

CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R. Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.9, p.977-983, 1995.

DAESCHEL, M.A. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: HOOVER, D.G., STEENSON, L.R., eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego: Academic Press, 1993. p.63-91.

DANIELS, J.A., KRISHNAMURTHI, R., RIZVI, S.S.H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.48, n.6, p.532-537, 1985.

DE MARTINIS, E.C.P., FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp. and *Lactobacillus sake* isolated from "lingüiça frescal". **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.28, p.284-287, 1997.

DE MARTINIS, E.C.P., FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.42, p.119-126, 1998.

DEBS-LOUKA, E., LOUKA, N., ABRAHAM, G., CHABOT, V., ALLAF, K. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.2, p.626-631, 1999.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the higienic quality of products. **Tecnol. Lactea Latinoam.**, Buenos Aires, v.28, n.8, p.38-43, 1997.

DESTRO, M.T., SERRANO, A.M., KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Amsterdam, v.2, p.110-112, 1991.

- ECKNER, K.F. Bacteriocins and food applications. **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, v.12, n.4, p.204-209, 1992.
- EHIOBA, R.M., KRAFT, A.A., MOLINS, R.A., WALKER, H.W., OLSON, D.G., SUBBARAMAN, G., SKOWRONSKI, R.P. Effect of low-dose (100 krad) gamma radiation on the microflora of vacuum-packaged ground pork with and without added sodium phosphates. **J. Food Sci.**, Chicago, v.52, n.6, p.1477-1480, 1987.
- ENFORS, S.O., MOLIN, G. Carbon dioxide evolution of refrigerated meat. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.10, n.3, p.197, 1984.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K., ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.24, p.85-106, 2000.
- FARBER, J.M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.54, p.58-70, 1991.
- FARBER, J.M., CAI, Y., ROSS, W.H. Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.32, p.133-144, 1996.
- FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999, p.505-564.
- FERNÁNDEZ, P.S., GEORGE, S.M., SILLS, C.C., PECK, M.W. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.37, p.37-45, 1997.

- 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, n.3, p.884-890, 1992.
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M., eds. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.33-81.
- GARCÍA DE FERNANDO, G.D., NYCHAS, G.J.E., PECK, M.W., ORDÓÑEZ, J.A. Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, p.221-231, 1995.
- GARRIGA, M., HUGAS, M., GOU, P., AYMERICH, M.T., ARNAU, J., MONFORT, J.M. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.32, p.173-183, 1996.
- GILL, C.O., REICHEL, M.P. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. **Food Microbiol.**, London, v.6, p.223-230, 1989.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1987. p.61-72.
- GRAU, F.H., EUSTACE, I.J., BELL, B.A. Microbial flora of lamb carcasses stored at 0°C in packs flushed with nitrogen or filled with carbon dioxide. **J. Food Sci.**, Chicago, v.50, p.482, 1985.
- HANSEN, J.N. The molecular biology of nisin and its structural analogues. In: HOOVER, D.G., STEENSON, L.R., eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego: Academic Press, 1993. p.93-120.

HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A., STILES, M.E., KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, n.6, p.384-387, 1989.

HART, C.D., MEAD, G.C., NORRIS, A.P. Effects of gaseous environment and temperature on the estorage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.70, p.40-46, 1991.

HITCHINS, A.D., HARTMAN, P.A., TODD, E.C.D. *Coliforms – Escherichia coli and its toxins*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.325-369.

HOLZAPFEL, W.H., GEISEN, R., SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.24, p.343-362, 1995.

HOTCHKISS, J.H. Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres. **Food Technol.**, Chicago, v.42, n.9, p.55-64, 1988.

HUDSON, J.A., MOTT, S.J., PENNEY, N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.3, p.204-208, 1994.

HUGAS, M., PAGÉS, F., GARRIGA, M., MONFORT, J.M. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. **Food Microbiol.**, London, v.15, p.639-650, 1998.

JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.

JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, Amsterdam, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.

JAY, J.M. Fermentation and Fermented Dairy Products. In: JAY, J.M., ed. **Modern food microbiology**. New York: Aspen Publishers, Inc., 1999a. p.113-130.

JAY, J.M. Foodborne Listeriosis. In: JAY, J.M., ed. **Modern food microbiology**. New York: Aspen Publishers, Inc., 1999b. p. 485-510.

JOHNSON, J.L., DOYLE, M.P., CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, n.1, p.81-91, 1990.

KAKOURI, A., NYCHAS, G.J.E. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.76, p.163-172, 1994.

KIM, W.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Rev. Int.**, Monticello, v.9, n.2, p.299-313, 1993.

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

KONE, K, FUNG, D.Y.C. Understanding bacteriocins and their use in foods. **Dairy Food Environ. Sanit.**, Ames, v.12, n.5, p.204-209, 1992.

KRAMER, K.H., BAUMGART, J. Sliced frantfurker-type sansage-inhibiting *listeria monocytogenes* by means of a modified atmosphere. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.73, n.11, p. 1279-1280, 1993.

LANCETTE, G.A., TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the**

- microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.533-550.
- LANDGRAF, M. Alterações químicas causadas por microrganismos. In: FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M., eds. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.83-92.
- LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.
- LOU, Y., YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999, p.131-224.
- MANO, S.B., GARCIA DE FERNANDO, G.D., LOPEZ-GALVEZ, D., SELGAS, M.D., GARCIA, M.L., CAMBERO, M.I., ORDOÑEZ, J.A. Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey package under modified atmospheres. **J. Food Saf.**, Trumbull, v.15, p.305-319, 1995.
- McMULLEN, L.M., STILES, M.E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meat. **J. Food Prot.**, Des Moines, suppl., p.64-71, 1996.
- MCMULLEN, L.M., STILES, M.E. Quality of fresh retail pork cuts stored in modified atmosphere under temperature conditions simulating export to distant markets. **Meat Sci.**, Amsterdam, v.38, p.163-177, 1994.
- MEILGAARD, M., CIVILLE, G.V., CARR, B.T. Overall difference tests: does a sensory difference exist between samples?. In: _____. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p.59-98, 369.

- MIYAGUSKU, L., GIANEZI, J.A. Desempenho de acondicionamento em atmosfera modificada em comparação com embalagens a vácuo e gás permeável. **Rev. Nac. Carne**, São Paulo, v.23, n.262, p.66-72, 1998.
- MONTVILLE, J.M., WINKOWSKI, K., LUDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.5, p.797-805, 1995.
- MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.50, p.511-519, 1998.
- MONTVILLE, T.J., WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food microbiology fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p.557-578.
- NETTLES, C.G., BAREFOOT, S.F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.56, n.4, p.338-356, 1993.
- NIELSEN, J.W., DICKSON, J.S., CROUSE, J.D. Use of a bacteriocin produced by *Pedococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, n.7, v.56, p.2142-2145, 1990.
- NILSSON, L., CHEN, Y., CHIKINDAS, M., HUSS, H.H., GRAM, L., MONTVILLE, T.J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.2, p.769-774, 2000.
- NILSSON, L., GRAM, L., HUSS, H.H. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.4, p.336-342, 1999.

NYCHAS, G.J.E. Modified atmospheres packaging of meats. In: OLIVEIRA, F.A.R., ed. **Minimal processing of foods and process optimization: an interface**. London: CRC Press, 1994. p.417-436.

PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? **J. Food Prot.**, Des Moines, v.49, p.1003, 1987.

RAY, B., HOOVER, D.G. Pediocins. In: HOOVER, D.G., STEENSON, L.R., eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. San Diego: Academic Press, 1993. p.181-210.

ROSA, C.M. Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de lingüiça frescal. São Paulo, 2001. 98 p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

RYSER, E.T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999, p.299-358.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L., ALVES, R.M.V., OLIVEIRA, L.M., GOMES, T.C. Atmosfera modificada: equipamentos e aplicações. **Rev. Nac. Carne**, São Paulo, v.23, n.260, p.46-54, 1998.

SCHILLINGER, U., LÜCKE, F. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.55, n.8, p.1901-1906, 1989.

SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEÓN, O., COSTA, M. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. **Food Microbiol.**, London, v.16, p.249-255, 1999.

SHERIDAN, J.J., DOHERTY, P.A., MCDOWELL, D.A., BLAIR, I.S., HARRINGTON, D. Investigation on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb packaged under modified atmospheres. **Food Microbiol.**, London, v.12, p.259-266, 1995.

SILLIKER, J.H., WOLFE, S.K. Microbiological safety considerations in controlled atmosphere storage of meats. **Food Technol.**, Chicago, v.34, n.3, p.59, 1980.

SOFOS, J.N. Microbial growth and its control in meat, poultry and fish. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R., eds. **Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. p.359-391. (Advances in meat research series, 9).

SOUZA, C.R.A., SAAD, S.M.I., OLIVEIRA, M.N. Use of antioxidants as previous treatment of fresh meat under modified atmosphere packaging. **Ital. Food Beverage Technol.**, v.23, n.3, p.1-8, 2001.

STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.55, p.763-766, 1992.

SWANSON, K.M.J., BUSTA, F.F., PETERSON, E.H., JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.75-95.

SZABO, E.A., CAHILL, M.E. The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTATM 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.43, p.21-31, 1998.

VEDAMUTHU, E.R., RACCACH, M., GLATZ, B.A., SEITZ, E.W., REDDY, M.S. Acid-producing microorganisms. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F., eds. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.225-238.

VENUGOPAL, R.J., INGHAM, S.C., MCCURDY, A.R., JONES, G.A. Anaerobic microbiology of fresh beef packaged under modified atmosphere or vacuum. **J. Food Sci.**, Chicago, v.58, n.5, p.935-938, 1993.

VIALLO, C., BERDAGUE, J.L., MONTEL, M.C., TALON, R., MARTIN, J.L., KONDOYAN, N., DENOYER, C. The effect of stage of ripening and packaging on volatile content and flavour of dry sausage. **Food Res. Int.**, v.29, n.7, p.667-674, 1996.

WINKOWSKI, K., CRANDALL, A.D., MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.8, p.2552-2557, 1993.

WINKOWSKI, K., MONTVILLE, T.J. Use of meat isolate, *Lactobacillus bavaricus* MN, to inhibit *Listeria monocytogenes* growth in a model meat gravy system. **J. Food Saf.**, Trumbull, v.13, p.19-31, 1992.

WAVIER, C.V.A. Estudo da vida-de-prateleira da carne suína embalada sob atmosfera modificada. São Paulo, 1990. 132 p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

WOUNG, L.L. Carnes: embalagens a vácuo e de atmosfera modificada nos EUA. **Rev. Nac. Carne**, São Paulo, v.17, n.197, supl., p.28-32, 1993.

WOUNG, L.L., REVIERE, R.D., COLE, A.B. Fresh red meats: a place to apply modified atmospheres. **Food Technol.**, Chicago, v.42, n.9, p.65-69, 1988.

Resumo

O efeito combinado de bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a e embalagem em atmosfera modificada sobre o controle de *Listeria monocytogenes* F5069r em lingüiça frescal foi avaliado. A cepa *L. sake* 2a foi co-inoculada com *L. monocytogenes* F5069r (resistente a cloranfenicol e eritromicina) em lingüiça frescal. As lingüiças foram embaladas com ar, 100% CO₂ ou 50%CO₂/50%N₂ e armazenadas a 6°C. A multiplicação de *L. monocytogenes* F5069r e *L. sake* 2a foi monitorada durante 4 semanas em intervalos de 7 dias. A avaliação sensorial, por meio do teste triangular, foi realizada após 5 e 11 dias, os quais foram estipulados de acordo com a vida-de-prateleira do produto. Após 28 dias de estocagem, a população de *L. monocytogenes* nas amostras inoculadas com *L. sake* 2a e embaladas com atmosfera modificada foi 6,4 ciclos logarítmicos menor que no controle sem a bactéria láctica e embalado em ar. No entanto, a influência da atmosfera modificada sobre as características sensoriais do produto foram detectáveis após cinco dias de estocagem, independente da adição de *L. sake* 2a. Ao final da primeira semana, a influência de *L. sake* 2a sobre *L. monocytogenes* foi menos importante (redução de 0,4 log, não significativa) que a influência da embalagem em atmosfera modificada (redução de 1,4 log, significativa). No décimo primeiro dia, nenhuma diferença sensorial foi encontrada entre as amostras com e sem *L. sake* 2a embaladas em atmosfera modificada. Após 14 dias, a população de *L. monocytogenes* nas amostras com *L. sake* 2a embaladas em atmosfera modificada foi 3,5 log menor que no controle sem a bactéria láctica e embalado em ar. Os resultados sugerem que o uso combinado de atmosfera modificada e bacteriocina produzida por *L. sake* 2a apresenta um efeito sinérgico sobre o controle de *L. monocytogenes* F5069r em lingüiça frescal refrigerada.

PALAVRAS-CHAVE: bacteriocina, atmosfera modificada, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sake*, lingüiça frescal.

Abstract

Lactobacillus sake 2a is a bacteriocinogenic strain isolated from “lingüiça frescal”, a Brazilian sausage. The combined effect of modified-atmosphere packaging and addition of *L. sake* 2a on inhibition of *L. monocytogenes* in “lingüiça” was evaluated. Samples were inoculated with *L. monocytogenes* and/or *L. sake* 2a, packed with oxygen-permeable film, 100%CO₂ or 50%CO₂+50%N₂ and stored at 6°C. Microbial counts were performed weekly. Sensorial evaluation (triangle tests with 16 subjects) was performed after 5 and 11 days (shelf-life). After the fourth week, *L. monocytogenes* population in samples packed with modified atmosphere containing *L. sake* 2a was 6.4 log lower than in samples without any treatment. However, the influence of the modified atmosphere on the sensorial characteristics of the product was already detectable on the fifth day (α risk of 5%), regardless the addition of *L. sake* 2a. By the end of the first week, the influence of *L. sake* 2a on the inhibition of *L. monocytogenes* was less important (reduction of 0.4 log, non significant) than the influence of the packaging (reduction of 1.4 log, significant). On the 11th day, no significant sensorial difference was found between the samples with and without *L. sake* 2a packed with modified atmosphere. By the end of the second week, *L. monocytogenes* counts in samples packed with modified atmosphere containing *L. sake* 2a were 3.5 log lower than counts in samples without any treatment. Combination of results suggests that modified atmosphere and *L. sake* 2a act synergistically on inhibition of *L. monocytogenes* in “lingüiça frescal”.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sake*, bacteriocins, modified atmosphere, meat products.

ANEXO I. Artigo.**Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere packaged Brazilian sausage**

Alcina M. Liserre, Bernadette D.G.M. Franco*

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

* Corresponding author. Phone: 55-11-38182191, Fax: 55-11-38154410, e-mail: bfranco@usp.br

Abstract

Lactobacillus sake 2a is a bacteriocinogenic strain isolated from “lingüiça frescal”, a Brazilian sausage. The combined effect of modified-atmosphere (MA) packaging (100%CO₂ and 50%CO₂/50%N₂) and addition of *L. sake* 2a on inhibition of growth of *Listeria monocytogenes* was evaluated in “lingüiça” stored at 6°C. By the end of the first week, the inhibition of *L. monocytogenes* due to MA was significant ($P \leq 0.05$) while the presence of *L. sake* 2a did not influence significantly the growth of the pathogen. After 14 days, a reduction of 1.3 –1.4 log in counts of *L. monocytogenes* was observed in samples containing *L. sake* 2a only or MA packaged only, while a reduction of 3.5 log was detected in those submitted to both treatments. Results indicate that inhibition of *L. monocytogenes* in “lingüiça frescal” by the bacteriocinogenic *L. sake* 2a is enhanced by the packaging of the product in MA.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sake*, bacteriocins, modified atmosphere, meat products.

Introduction

Listeria monocytogenes is a pathogenic microorganism that has been isolated from many types of foods. This microorganism is ubiquitous in the environment and the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996) considers that when the contamination level that is lower than 100 CFU/g at the point of food consumption, the food is acceptable for individuals who are not at risk. Thus, proper control of multiplication of *L. monocytogenes* within the food may minimize the risk of foodborne listeriosis (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996; Jay, 1996).

In meat products, *L. monocytogenes* may represent a serious health hazard due to survival and active proliferation at refrigeration temperatures. Additional hurdles should be used in combination with cold storage to enhance the safety of refrigerated meat products. Among the possible hurdles, the packaging under modified atmosphere (MA) seems to be the most effective (García de Fernando et al., 1995). Sheridan et al. (1995) demonstrated that proliferation of *L. monocytogenes* was completely inhibited in lamb meat stored at 5°C packaged under 100% CO₂, while atmospheres containing only 20% or 50% of CO₂ were less inhibitory. Mano et al. (1995) also reported complete growth inhibition in refrigerated pork meat packaged under 100% N₂, 20%CO₂/80%O₂ and 40%CO₂/60%O₂. Farber et al. (1996) observed that the inhibition was temperature and pH dependent. Many additional studies confirm that modified atmospheres in packaging of many types of meat products interfere with the survival and growth of *L. monocytogenes* (Hart et al., 1991; Hudson et al., 1994; García de Fernando et al., 1995; Hugas et al., 1998).

Bacteriocinogenic lactic acid bacteria can also exert an inhibitory activity against *L. monocytogenes* in meats and meat products (Schillinger & Lucke, 1989; Ahn & Stiles, 1990; Lewus et al., 1991; De Martinis & Franco, 1998). Recently, Nilsson et al. (2000) reported that nisin and CO₂ atmosphere acted synergistically on the cytoplasmic membrane of *L. monocytogenes* by enhancing membrane permeabilization.

“Lingüiça”, a popular Brazilian meat product, is a mixture made of minced pork, curing salts and spices filled in natural gut casings. The percentage of fat

varies according to the meat used in the manufacturing. The product has a pH around 6.0 and is frequently consumed undercooked, representing a risk to human health. De Martinis and Franco (1998) reported that a *Lactobacillus sake* strain (*L. sake* 2a) isolated from lingüiça was capable of inhibiting growth of *L. monocytogenes* in the product. The inhibition was due to a bacteriocin also active against other Gram positive pathogens (De Martinis & Franco, 1997).

In this study, the combined effect of MA packaging and use of the bacteriocinogenic *L. sake* 2a strain on the inhibition of growth of *L. monocytogenes* in “lingüiça” was evaluated. A possible synergistic effect of these two hurdles could be an interesting technological tool to increase the safety and extend the shelf life of this product.

Materials and methods

Microbial strains. *Lactobacillus sake* 2a, isolated from lingüiça (De Martinis & Franco, 1997) and *Listeria monocytogenes* F5069r, resistant to chloramphenicol and erythromycin, kindly provided by Dr. Thomas J. Montville, Rutgers - The State University of New Jersey, NJ, USA.

Preparation of inocula. *L. monocytogenes* F5069r was grown in 5 mL BHI containing 5 µg/mL of chloramphenicol (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) and 0.5 µg/mL erythromycin (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO), at 35°C for 18-24h. *L. sake* 2a was grown in 5 mL MRS broth containing 0.5% glucose, at 30°C for 18-24h. Both cultures were centrifuged at 1600 g for 20 min and washed three times with equal volume of 0.85% saline. The resuspended pellets were used for inoculation of lingüiça and the supernatant of *L. sake* 2a culture was used to test for bacteriocin activity. The approximate number of CFUs in the cultures of *L. monocytogenes* and *L. sake* was determined by plating on Tryptic Soy Agar supplemented with 6% yeast extract (TSAYE) and deMan Rogosa Sharpe agar (MRS), respectively. TSAYE and MRS agar plates were incubated for 48h at 37°C and 30°C, respectively. All culture media were from Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

Testing for bacteriocin activity. The well-diffusion test according to Harris et al. (1989) was used. Melted BHI (20ml) containing 1% agar was inoculated with a fresh culture of *L. monocytogenes* F5069r to achieve a concentration of 10^5 - 10^6 CFU/mL and transferred to a empty Petri dish. After solidification, wells (3-4 mm diameter) were cut in the medium and filled with 40 μ l of the neutralized supernatant of the *L. sake* culture, prepared as described above. Plates were incubated at 30°C for 24 h and observed for the presence of growth inhibition halos around the wells.

Preparation and inoculation of lingüiça. For 1 kg of product, the following ingredients were used: 967g of pork shank, 20g salt, 1g sugar, 7g spices (a ready-to-use commercial product), 3g emulsifier, 2.5g Exacor (ascorbic acid plus silicon dioxide, Lab. Exato Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brazil) and 150 ppm sodium nitrite. The pork meat was minced in a sterile mincer and mixed with the ingredients. The mixture was divided into portions of 800 g, transferred to plastic bags and treated with gamma irradiation (10kGy) for elimination of indigenous microorganisms. Irradiation was done at Empresa Brasileira de Irradiação (EMBRARAD, Cotia, SP, Brazil). Remaining contaminants were enumerated by plating on Plate Count Agar (PCA), MRS agar, PALCAM and TSAYE with 5 μ g/mL of chloramphenicol and 0.5 μ g/mL erythromycin. MRS agar plates were incubated at 30°C for 48 h under anaerobic conditions using Anaerogen paper sachets (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). PCA, PALCAM and TSAYE plates were incubated at 37°C for 48 h. Microbial cultures were serially diluted in 0.85% saline. Inocula of microorganisms were added to each bag containing the irradiated mixture of meat and ingredients, using the appropriate dilution to obtain 10^5 CFU of *L. sake* 2a and 10^4 CFU of *L. monocytogenes* per gram of product. Non-inoculated negative controls were also prepared. Inoculated samples were homogenized by external hand massaging of bags. The inoculated and non-inoculated mixtures were aseptically introduced into pork gut casings, previously sterilized by irradiation (10 kGy). The filled casings were tightly tied at every 10-12 cm with sterile string, forming segments of approximately 50g. The segments were separated using sterile scissors, transferred to disposable plastic trays and wrapped with plastic film. For those submitted to packaging under modified atmosphere, Cryovac barrier bags (O₂

transmission rate $30\text{cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$ at 23°C , 1 atm and 0%RH, Cryovac Brasil Ltda., São Paulo) were used. For the remaining samples, an oxygen-permeable polyethylene film was used.

Packaging in modified atmosphere. After removal of air, the desired combination of gases (50%CO₂/50%N₂ or 100%CO₂, White Martins Praxair Inc., São Paulo, Brazil) was introduced in the wrapped trays containing the lingüiça segments using a sealer with gas injection system (Engevac, São Paulo, Brazil). All lingüiça segments were maintained under refrigeration (6°C). The chemical composition of the atmosphere during storage was monitored by gas chromatography, using a Varian Star 3400 CX (Walnut Creek, USA) chromatograph, equipped with a thermal conductivity detector and a CG-300 electronic integrator (Souza et al., 2001).

Microbiological counts in the stored lingüiça segments. Counts of *L. monocytogenes* and *L. sake* 2a in lingüiça segments were determined weekly over a period of 28 days, in duplicates. For sampling, 25 g of lingüiça segments were homogenized with 225 ml of 0.1% peptone water, using a stomacher. Further decimal dilutions were prepared, using 0.1% peptone water as diluent. Counts of *L. monocytogenes* were done by spread plating on PALCAM and TSAYE containing 5 µg/mL of chloramphenicol (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) and 0.5 µg/mL erythromycin (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) and incubation at 37°C for 48h. Counts of *L. sake* were done by spread plating on MRS agar and incubation at 30°C for 48h under anaerobic conditions using Anaerogen paper sachets (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

pH measurement. At each sampling the pH of the lingüiça samples was monitored using pH indicator strips (Merck, Darmstadt, Germany) in the homogenates.

Sensory evaluation. Triangle tests, performed according to Meilgaard et al. (1999), were done to detect taste differences between lingüiça prepared with and without *L. sake*, packaged in air and in MA. The comparisons done were: a) lingüiça with and without *L. sake*, packaged in air; b) lingüiça with and without *L.*

sake, packaged in 50%CO₂/50%N₂; c) lingüiça with and without *L. sake*, packaged in 100%CO₂; d) lingüiça without *L. sake* packaged in air and in 50%CO₂/50%N₂; e) lingüiça without *L. sake* packaged in air and in 100%CO₂; f) lingüiça without *L. sake* packaged in air and with *L. sake* in 50%CO₂/50%N₂; g) lingüiça without *L. sake* packaged in air and with *L. sake* in 100%CO₂. Before testing, the samples were boiled in water during 10 min, deep-fried in hot oil for 6-8 min, let drain on absorbing paper and cut into 2-3 mm wide slices.

Each comparison was performed with three coded samples (two identical and one odd). Sixteen panelists, selected among the laboratory staff, were asked to taste the samples and select the odd. The number of correct answers was counted and compared to the reference Table T8 (Critical Number of Correct Responses in a Triangle Test) in Meilgaard et al. (1999), which contains the minimum number of correct responses required for significance at a stated α level for the corresponding number of panelists. In this study, the level of significance (α) was 0.05. The assumption of “no difference” was rejected when the number of correct responses was greater than or equal to 9 (tabled value).

Statistical tests. Four replications of each experiment were performed. The best combination of gas composition and bacteriocin activity for each time interval was determined by multiple comparisons using Tukey’s test. The SAS 6.12 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA Copyright @ 1989-1996, Release 6.12 TS level 0020) was used for these determinations.

Results and discussion

Variations in concentration of gases in the packages along the storage period (29 days) of the lingüiça samples were insignificant (data not shown), indicating that the mechanical barriers for gas exchange were effective during the study.

The initial pH of lingüiça was 6.1. The pH of samples containing the *L. sake* 2a strain dropped to 5.7 after 14 days under refrigeration and to 5.4 by the end of the sampling time. This drop in pH was considered insufficient to explain the inhibitory effect on the growth of *L. monocytogenes* detected in the products

containing the *L. sake* strain. According to Jay (1999b) *L. monocytogenes* is able to grow well at pH as low as 4.1. Previous papers have shown that the inhibition of *Listeria* spp. in meat products containing bacteriocin-producing lactic acid bacteria was greater than in products containing non bacteriocinogenic strains, for the same range of pH, indicating that the inhibition is more likely to be due to the bacteriocin than to the presence of lactic acid (Campos et al., 1997; Hugas et al., 1998).

No microbial growth was observed in the negative controls.

As shown in Figure 1, the MA packaging did not influence the growth of *L. sake* 2a in refrigerated lingüiça. From a 10^5 CFU/g initial level of contamination, the number of viable cells increased to 10^8 CFU/g after 15 days and did not change significantly afterwards, regardless the type of MA packaging.

In contrast, the type of MA packaging affected the growth of *L. monocytogenes* in lingüiça (Figure 2). As indicated in Table 1, in samples containing only *L. monocytogenes* and packaged in air, the counts increased 1.9 log in seven days, 3.5 log in 14 days, 4.7 log in 21 days and 5.8 log in 28 days. In similar samples but packaged in a mixture of 50%CO₂/50%N₂, the increases were lower: 0.5 log in 7 days, 0.9 log in 14 days, 1.5 log in 21 days and 2.0 log in 28 days. The effect of 100%CO₂ was even more intense. The growth of *L. monocytogenes* was completely inhibited by this atmosphere: the number of viable cells remained practically constant up to the end of the sampling time.

The effect of *L. sake* 2a in the inhibition of growth of *L. monocytogenes* in refrigerated lingüiça according to the type of packaging is shown in Table 1 and Figure 3. In samples containing *L. sake* 2a, without MA packaging, the counts of *L. monocytogenes* increased 1.4 log after 7 days, 2.1 log after 14 days, and then remained constant up to 28 days. In these samples, the counts of *L. monocytogenes* after 7 days were 0.4 log lower than in samples without *L. sake* 2a. The differences were 1.3 log for 14 days, 2.6 log for 21 days and 3.7 log for 28 days. In samples packaged with the 50%CO₂/50%N₂ mixture, these differences were 0.1 log, 0.9 log, 1.9 log and 2.6 log for 7, 14, 21 and 28 days, respectively. In samples packaged with the 100%CO₂, the differences up to 14

days remained constant, but after 21 and 28 days, the viable counts were lower than the initial counts (reduction of 0.7 log), suggesting a bactericidal effect.

The statistical evaluation of these results indicated that counts of viable *L. monocytogenes* in samples containing bacteriocinogenic *L. sake* 2a and packaged under 50%CO₂/50%N₂ and 100%CO₂ differed significantly from those in samples containing *L. sake* 2a but packaged with oxygen-permeable film (Table 1).

Results are similar to those reported previously by De Martinis and Franco (1998), for the same product packaged with oxygen-permeable film and for the same microorganisms. Hugas et al. (1998), working with bacteriocins and MA packaging, demonstrated that inhibition of *Listeria* spp. in fresh and cooked meat products could not be achieved by the sole application of vacuum or a mixture of 20%CO₂/80%O₂. However, the addition of sakacin resulted in immediate destruction of *Listeria* spp. in the products packaged in MA. Similar data were generated by Schöbitz et al. (1999) who concluded that the inhibitory substance produced by *Carnobacterium piscicola* and vacuum packaging were able to completely inhibit the growth of *L. monocytogenes* in meat.

Szabo and Cahill (1998) studied the combined effect of modified atmosphere (100%N₂, 40%CO₂:60%N₂ and 100%CO₂), temperature and nisin on the growth of *L. monocytogenes* in buffered tryptone soya broth at 4°C and 12°C. Of the treatments evaluated, 100% CO₂ exerted the greatest inhibition. Nilsson et al. (2000) reported a 4 log reduction of *L. monocytogenes* counts in broth with nisin maintained in 100%CO₂ atmosphere. These authors concluded that CO₂ modifies the fatty acid composition of the cellular membrane of *L. monocytogenes*, improving the fluidity and playing an important role in the efficiency of nisin action. In both studies, the efficiency of the method in food products was not investigated, but the synergistic effect was clearly demonstrated.

The results of sensory evaluation of lingüiças prepared with *L. sake* 2a and packaged under air, 50%CO₂+50%N₂ and 100%CO₂ are shown in Table 2. After 11 days under refrigeration, the panelists did not detect the presence of *L. sake* in the product, regardless of the packaging atmosphere. However, the taste of samples packaged in 50%CO₂/50%N₂ differed significantly from those packaged in air ($P \leq 0.05$). The same occurred with samples packaged under

100% CO₂. These differences in taste could be detected as early as 5 days under refrigeration.

The results of our study indicate that modified atmosphere and the bacteriocin produced by *L. sake* 2a have a synergistic effect on the inhibition of growth of *L. monocytogenes* in lingüiça. This synergism, attributable to the increased sensitivity of the pathogen to the bacteriocin in the presence of CO₂, may also be caused by a possible enhanced bacteriocin production by *L. sake* 2a under modified atmosphere. However, further studies are needed to elucidate this hypothesis. In addition, the practical applications of the conclusions drawn from the study, such as the adequacy and cost of use of 100%CO₂ for packaging and interference of the indigenous flora on the shelf life of the product, still need to be evaluated.

Acknowledgements

The authors acknowledge Maricê Nogueira for help in the monitoring of chemical composition of the atmosphere used in the packaging of lingüiça and Dr. Rui Sergio Santos Ferreira da Silva and Dr. Edio Vizon for help in the statistical evaluation of results. The authors thank FAPESP for the financial support (Process 00/8485-4) and for the scholarship to author AML (Process 99/5660-0).

Figure 1. Growth of *Lactobacillus sake* 2a in linguiça packaged with air, 50%CO₂/50%N₂ or 100% CO₂.

Figure 2. Growth of *Listeria monocytogenes* F5069 in linguiça packaged with air, 50%CO₂/50%N₂ or 100% CO₂.

Figure 3. Combined effect of *Lactobacillus sake* 2a and packaging in air, 50%CO₂/50%N₂ or 100% CO₂ on the growth of *Listeria monocytogenes* F5069 in lingüiça.

Table 1

Counts of *Listeria monocytogenes* (log CFU/g) in linguiça with or without *Lactobacillus sake* 2a packaged in air, 50%CO₂/50%N₂ or 100% CO₂, during storage at 6°C.

Type of packaging	Microorganism	Days ^a				
		0	7	14	21	28
Air	<i>L. monocytogenes</i> only	3.5 a A	5.4 a B	7.0 a C	8.2 a D	9.3 a E
	<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. sake</i> 2a	3.6 a A	5.0 a B	5.7 b B	5.6 b B	5.6 b B
50%CO ₂ + 50%N ₂	<i>L. monocytogenes</i> only	3.5 a A	4.0 b AB	4.4 c BC	5.0 b CD	5.5 b D
	<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. sake</i> 2a	3.6 a AB	3.9 b A	3.5 d AB	3.1 c B	2.9 c B
100%CO ₂	<i>L. monocytogenes</i> only	3.7 a A	3.9 b A	3.7 d A	3.7 d A	3.6 d A
	<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. sake</i> 2a	3.7 a A	3.8 b A	3.5 d AB	3.0 c B	2.9 c B

^a For each column, means followed by the same minuscule letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). For each line, means followed by the same capital letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 2

Sensory evaluation of lingüicas with or without *Lactobacillus sake* 2a, packaged in air, 50%CO₂/50%N₂ or 100%CO₂.

Treatments		Number of panelists that correctly identified the odd sample ^a	Conclusion ^b ($\alpha \leq 0.05$)
Sample in air	X Sample in air with <i>L. sake</i> 2a	6	Non different
Sample in 50%CO ₂ +50%N ₂	X Sample with <i>L. sake</i> 2a in 50%CO ₂ +50%N ₂	6	Non different
Sample in 100%CO ₂	X Sample with <i>L. sake</i> 2a in 100%CO ₂	5	Non different
Sample in air	X Sample in 50%CO ₂ +50%N ₂	9	Different
Sample in air	X Sample in 100%CO ₂	11	Different
Sample in air	X Sample with <i>L. sake</i> 2a in 50%CO ₂ +50%N ₂	9	Different
Sample in air	X Sample with <i>L. sake</i> 2a in 100%CO ₂	9	Different

^a Total of panelists: 16^b According to table T8 in Meilgaard, Civille and Carr, 1999.

References

- AHN, C., & STILES, M. E. (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2503-2510.
- CAMPOS, C. A., MAZZOTA, A. S. & MONTVILLE, T. J. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* in vacuum-packaged cooked chicken at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety*, 17, 151-160.
- DE MARTINIS, E. C. P., & FRANCO, B. D. G. M. (1997). Inhibition of foodborne pathogens by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sake* isolated from "lingüiça frescal". *Revista de Microbiologia*, 28, 284-287.
- DE MARTINIS, E. C. P.; & FRANCO, B. D. G. M. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 119-126.
- FARBER, J. M., CAI, Y.; & ROSS, W. H. (1996). Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Food Microbiology*, 32, 133-144.
- GARCÍA DE FERNANDO, G. D., NYCHAS, G. J. E., PECK, M. W.; & ORDÓÑEZ, J. A. (1995). Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 221-231.
- HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E., & KLAENHAMMER, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6), 384-387.
- HART, C. D., MEAD, G. C., & NORRIS, A. P. (1991). Effects of gaseous environment and temperature on the storage behavior of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 40-46.
- HUDSON, J. A., MOTT, S. J., & PENNEY, N. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*, 57(3), 204-208.
- HUGAS, M., PAGÉS, F., GARRIGA, M., & MONFORT, J. M. (1998). Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packaged with different atmospheres. *Food Microbiology*, 15, 639-650.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. (1996). *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens* (pp. 146). London: Blackie Academic & Professional.

JAY, J. M. (1996). Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control*, 7(4/5), 209-214.

JAY, J. M. (1999). Foodborne Listeriosis. In *Modern Food Microbiology* (pp. 485-510). New York: Aspen Publishers, Inc.

LEWUS, C. B., KAISER, A., & MONTVILLE, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1683-1688.

MANO, S. B., GARCIA DE FERNANDO, G. D., LOPEZ-GALVEZ, D., SELGAS, M. D., GARCIA, M. L., CAMBERO, M. I., & ORDOÑEZ, J. A. (1995). Growth/survival of natural flora and *Listeria monocytogenes* on refrigerated uncooked pork and turkey package under modified atmospheres. *Journal of Food Safety*, 15, 305-319.

MEILGAARD, M., CIVILLE, G. V., & CARR, B. T. (1999). Overall Difference Tests: Does a Sensory Difference exist between Samples?. In *Sensory Evaluation Techniques* (pp. 59-98, 369). Boca Raton, FL: CRC Press.

NILSSON, L., CHEN, Y., CHIKINDAS, M., HUSS, H. H., GRAM, L. & MONTVILLE, T. J. (2000). Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 769-774.

SCHILLINGER, U. & LÜCKE, F. (1989). Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1901-1906.

SHERIDAN, J. J., DOHERTY, P. A., MCDOWELL, D. A., BLAIR, I. S. & HARRINGTON, D. (1995). Investigation on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 12, 259-266.

SCHOBITZ, R., ZAROR, T., LEON, O., & COSTA, M. (1999). A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food Microbiology*, 16, 249-255.

SOUZA, C. R. A., SAAD, S. M. I., & OLIVEIRA, M. N. (2001). Use of antioxidants as previous treatment of fresh meat under modified atmosphere packaging. *Italian Food & Beverage Technology*, XXIII (3), 1-8.

SZABO, E.A., & CAHILL, M.E (1998). The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA™ 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 21-31.