UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TECNOLÓGICA DE TRÊS CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS E AVALIAÇÃO DE SUA EFICIÊNCIA NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* E *Bacillus cereus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO

Médica Veterinária
Mestre em Ciências de Alimentos

Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Co-orientadora: Dra. Izildinha Moreno

Campinas

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Nascimento, Maristela da Silva do
N17c Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal / Maristela da Silva do Nascimento. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Co-orientador: Izildinha Moreno
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Bacteriocinas. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico. 3. *Listeria monocytogenes*. 4. Bactérias gram-positivas. 5. Queijo. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru. II. Moreno, Izildinha. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Characterization of the antimicrobian and technological activity of three
bacterion producing cultures and evaluation of its efficiency in the *Listeria monocytogenes*,
Sthaphylococcus aureus and *Bacillus cereus* control in Minas Frescal cheese
Palavras-chave em inglês (Keywords): Bacteriocins, Lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, Gram-positive bacteria, Cheese
Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos
Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Ariene Gimenes Fernandes Van Dender
Elaine Cristina Pereira de Martinis
José Luiz Pereira
Salvador Massaguer Roig
Valéria Christina Amstalden Junqueira
Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

_____
Dra. Ariene Gimenes F. Van Dender

_____
Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye

_____
Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

_____
Prof. Dr. José Luis Pereira

_____
Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

_____
Dra. Valéria Chritina Amstalden Junqueira

Dedico aos meus pais,

por tudo o que representam para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida

Ao Prof. Arnaldo pelo apoio e orientação

À Izildinha pela amizade e co-orientação

A todos os membros da banca examinadora pelas contribuições dadas ao trabalho

À Dirce e à Dona Denir pela amizade, convívio e colaboração

À Profa. Marise e à Judite por permitirem a realização das análises físico-químicas no laboratório de carnes e processos do DTA, FEA-UNICAMP

Ao Prof. Assis pelo empréstimo das instalações da sala limpa do DTA, FEA-UNICAMP

À Profa. Walkiria e à Elisabete pelo empréstimo de utensílios e equipamentos

A todos os funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-UNICAMP que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho

Aos amigos Eduardo, Luciana e Vanessa que além da amizade, colaboraram durante a execução do trabalho

Aos estagiários Danilo, Maria Fernanda e Patrícia pela colaboração

Às amigas Andréa, Carolina, Cristina, Daniela, Elisângela, Rafaela, Renata Peres, Renata Torrezan, Rosa e Sueli por todos os momentos compartilhados

A todos os amigos do laboratório de higiene e do departamento pela amizade e convívio

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro

Ao meu irmão e a toda minha família pelo apoio e carinho sempre

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **XV**
LISTA DE TABELAS ..... **XIX**
RESUMO GERAL ..... **XXI**
SUMMARY ..... **XXIII**
INTRODUÇÃO GERAL **1**
OBJETIVOS 3
CAPÍTULO I **5**
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **5**
1. BACTÉRIAS LÁCTICAS 5
1.1. Lactococos **5**
1.2. Lactobacilos **6**
1.3. Enterococos **6**
2. BACTERIOCINAS 7
2.1. Histórico **7**
2.2. Classificação **8**
2.2.1. Classe I (Lantibióticos) 9
2.2.2. Classe II 11
2.2.3. Classe III 14
2.3. Biologia molecular **15**
2.4. Espectro de ação antimicrobiana **17**
2.5. Requisitos necessários para utilização de bacteriocinas como bioconservantes **21**
2.6. Aplicação na indústria de laticínios **21**
2.7. Fatores que afetam a eficiência das bacteriocinas **25**
2.7.1. Composição do meio 25
2.7.2. Concentração do microrganismo alvo 27
2.7.3. pH do meio 28
2.7.4. Temperatura 29
2.7.5. Cloreto de sódio 30
2.8. Resistência microbiana **31**

3. CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS 32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36
CAPÍTULO II 55
CARACTERÍSTICAS DE DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faeciuM* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactiS* ATCC 11454 E O EFEITO DESTES COMPOSTOS SOBRE *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus* 55
RESUMO 55
1. INTRODUÇÃO 56
2. MATERIAL E MÉTODOS 58
2.1. Origem e manutenção dos microrganismos 58
2.2. Determinação do potencial de patogenicidade de *E. faecium* FAIR-E 198 60
2.3. Determinação do espectro de atividade antimicrobiana 60
2.4. Características de desenvolvimento e produção de bacteriocinas por *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 E *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em caldo MRS e em LDR 10% 61
3. RESULTADOS 63
3.1. Potencial de patogenicidade de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 63
3.2. Espectro de atividade antimicrobiana 63
3.3. Características de desenvolvimento e produção de bacteriocinas por *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em caldo MRS e em LDR 10% 66
4. DISCUSSÃO 74
5. CONCLUSÃO 77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 78

CAPÍTULO III 83
DETERMINAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DAS CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS COM FERMENTO LÁCTICO E AVALIAÇÃO DE SUAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS 83
RESUMO 83
1. INTRODUÇÃO 84
2. MATERIAL E MÉTODOS 85
2.1. Origem e manutenção dos microrganismos 85
2.2. Determinação da sensibilidade do fermento láctico às culturas bacteriocinogênicas 86
2.3. Determinação da capacidade acidificante e de produção de bacteriocinas durante desenvolvimento associativo das culturas bacteriocinogênicas com os fermentos lácticos 87
2.3.1. Determinação da concentração do fermento láctico 87
2.3.2. Inoculação dos fermentos lácticos e das culturas bacteriocinogênicas 87
2.3.3. Determinação da atividade acidificante 87
2.3.4. Determinação do título das bacteriocinas 87
2.4. Determinação da atividade de aminopeptidase 88
3. RESULTADOS 89
3.1 Sensibilidade dos fermentos lácticos as culturas bacteriocinogênicas 89
3.2. Determinação da capacidade acidificante e produção de bacteriocinas durante desenvolvimento associativo de culturas bacteriocinogênicas e fermentos lácticos 89
3.2.1. Capacidade acidificante 89
3.2.2. Determinação da produção de bacteriocinas 91
3.3. Determinação da atividade de aminopeptidase 92
4. DISCUSSÃO 93
5. CONCLUSÃO 96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 97

CAPÍTULO IV 101

ESTUDO COMPARATIVO DO DESENVOLVIMENTO DE *Bacillus cereus* K1-B041, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 E *Listeria monocytogenes* SCOTT A DURANTE CO-CULTIVO EM LEITE COM *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 .. 101

RESUMO 101

1. INTRODUÇÃO 102

2. MATERIAL E MÉTODOS 104

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos 104

2.2. Preparo e inoculação das amostras de leite 105

2.3. Método de enumeração 105

2.4. Determinação do pH 105

2.5. Determinação do título de bacteriocina 105

2.6. Análise estatística 106

3. RESULTADOS 106

3.1. *Bacillus cereus* K1-B041 106

3.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 117

3.3. *Listeria monocytogenes* Scott A 127

4. DISCUSSÃO 137

5. CONCLUSÃO 140

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 140

CAPÍTULO V 145

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DAS CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 COMO ADJUNTAS EM QUEIJO MINAS FRESCAL PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS GRAM-POSITIVOS 145

RESUMO 145

1. INTRODUÇÃO 146

2. MATERIAL E MÉTODOS 148

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos 148

2.2. Processamento do queijo 149

2.3. Inoculação dos microrganismos patogênicos 152
2.6. Análises físico-químicas dos queijos 154
2.7. Determinação da produção de bacteriocinas nos queijos 155
2.8. Análise estatística 155
3. RESULTADOS 156
3.1. Monitoramento microbiológico 156
3.2. Características físico-químicas dos queijos 163
4. DISCUSSÃO 170
5. CONCLUSÃO 174
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 175
CONCLUSÕES GERAIS 183

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática da molécula de nisina..... 10

Figura 2. Representação esquemática do modo de ação da nisina..... 11

Figura 3. Representação esquemática da estrutura das bacteriocinas da classe IIa..... 12

Figura 4. Representação esquemática do modo de ação das bacteriocinas da classe IIa..... 13

Figura 5. Representação esquemática da biosíntese e regulação de bacteriocinas da classe IIa..... 17

CAPÍTULO II

Figura 1. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em caldo MRS a 30ºC..... 67

Figura 2. Desenvolvimento *Lactobacillus plantarum* ALC 01, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em caldo MRS a 37ºC..... 68

Figura 3. Desenvolvimento de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em caldo MRS a 37ºC..... 69

Figura 4. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em leite desnatado a 30ºC..... 71

Figura 5. Desenvolvimento de *Lactobacillus plantarum* ALC 01, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em leite desnatado a 37ºC..... 72

Figura 6. Desenvolvimento de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, evolução de pH e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A em leite desnatado a 37ºC..... 73

CAPITULO IV

Figura 1. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 109

Figura 2. Variação do pH durante o desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 113

Figura 3. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *B. cereus* K1-B041 e variação do pH de LDR 10% durante 48h a 35ºC..... 115

Figura 4. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 119

Figura 5. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 123

Figura 6. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *S. aureus* ATCC 27154 e variação do pH de LDR 10% por 48h a 35ºC. 125

Figura 7. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 129

Figura 8. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 133

Figura 9. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* Scott A e variação do pH de LDR 10% durante 48h a 35ºC..... 135

CAPÍTULO V

Figura 1. Fluxograma de processamento de queijo Minas Frescal..... 151

Figura 2. Contagem de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC..... 160
Figura 3. Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC..... 161
Figura 4. Contagem de *Bacillus cereus* K1-B041 em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC..... 162
Figura 5. Variação do pH de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC..... 164
Figura 6. Evolução da acidez titulável de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC..... 165
Figura 7. Evolução dos teores de nitrogênio não caseico expressos em % de nitrogênio total (índice de extensão da proteólise), durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC, de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas..... 168
Figura 8. Evolução dos teores de nitrogênio não proteico expressos em % de nitrogênio total (índice de profundidade da proteólise), durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC, de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas.... 169

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação das bacteriocinas segundo Drider e outros (2006)..... 9

CAPÍTULO II

Tabela 1. Descrição e condições de desenvolvimento dos microrganismos patogênicos..... 59

Tabela 2. Espectro antimicrobiano de bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198..... 65

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores de pH de leite inoculado com 0,1% e 0,5% de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 e 1% de fermento láctico após 8 e 24h de incubação a 35ºC em LDR 10%..... 90

Tabela 2. Atividade das bacteriocinas determinada pelo método de diluição crítica, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador..... 92

Tabela 3. Atividade de aminopeptidases intracelulares das culturas bacteriocinogênicas e fermentos lácticos comerciais, determinada após lise celular.... 93

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 108

Tabela 2. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 111

Tabela 3. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 118

Tabela 4. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC

27154 com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 121
Tabela 5. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 128
Tabela 6. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC..... 131

CAPÍTULO V

Tabela 1. Características microbiológicas das amostras de leite pasteurizado tipo B utilizado no processamento do queijo Minas Frescal..... 156
Tabela 2. Características microbiológicas das amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, determinadas logo após o término do processamento..... 157
Tabela 3. Evolução da contagem microbiana dos patógenos inoculados artificialmente e das bactérias lácticas em queijo Minas Frescal fabricado com adição de diferentes culturas adjuntas e estocados a 8 ± 1ºC por 21 dias..... 159
Tabela 4. Características físico-químicas de amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas determinadas um dia após o processamento..... 163
Tabela 5. Evolução dos índices de extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas e estocado a 8 ± 1ºC por 21 dias..... 167

RESUMO GERAL

A biopreservação é uma técnica utilizada para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos por meio do emprego de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de culturas produtoras de bacteriocinas sobre alguns patógenos Gram-positivos de ocorrência comum em produtos lácteos. As culturas bacteriocinogênicas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 e *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 apresentaram comportamento distinto em relação à produção de bacteriocinas quando inoculadas em caldo MRS e em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10%. Na avaliação do espectro de ação antimicrobiano pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços, as bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 apresentaram atividade inibitória apenas sobre as linhagens de *Listeria monocytogenes*, já a nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 demonstrou espectro de ação mais amplo, porém com menor atividade que as demais culturas bacteriocinogênicas. Na avaliação da compatibilidade de desenvolvimento associativo com fermentos lácticos comerciais, somente *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 apresentou atividade (halo de 6mm) sobre as linhagens constituintes de ambos os fermentos lácticos avaliados. A determinação da atividade acidificante foi realizada em LDR 10% após 8 e 24h de incubação a 35ºC; a adição de 0,1% e de 0,5% das culturas bacteriocinogênicas não afetou significativamente a capacidade de acidificação dos fermentos lácticos. Além disso, observou-se que o desenvolvimento associativo dos fermentos lácticos com *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, em ambas as concentrações, proporcionou significativo aumento da atividade das bacteriocinas destas culturas, enquanto que a atividade da nisina de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi suprimida. A atividade de aminopeptidases foi determinada após desenvolvimento das culturas lácticas em caldo MRS, *Lb. plantarum* ALC 01 apresentou as maiores atividades. Também foi analisado o comportamento de patógenos Gram-positivos durante desenvolvimento associativo com as culturas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% a 35ºC por 48h. *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não influenciaram significativamente o desenvolvimento de *Bacillus cereus* K1-B041 e de *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 durante as primeiras 24h de incubação a 35ºC, contudo apresentaram forte ação inibitória sobre *L.*

monocytogenes Scott A. Já *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 afetou o desenvolvimento de todos os patógenos apenas durante as primeiras 12h de incubação. O fermento láctico demonstrou significativa ação inibitória sobre *B. cereus* K1-B041 (>7,37 log UFC/ml) e *L. monocytogenes* Scott A (>6,26 log UFC/ml). Em queijo Minas Frescal, não foi observada diferença significativa entre a ação das culturas bacteriocinogênicas e o fermento láctico sobre *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* ATCC 27154. *B. cereus* K1-B041 demonstrou susceptibilidade a *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 após 7 dias. Pelo método de diluição crítica não foi detectada atividade de bacteriocina nos queijos durante os 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC. A adição das culturas produtoras de bacteriocinas como adjuntas ao queijo Minas Frescal não promoveu alteração no pH e na acidez, contudo *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 promoveram aumento da proteólise primária e secundária. Embora os resultados obtidos demonstrem que as culturas bacteriocinogênicas avaliadas não possam ser empregadas como único método de conservação, estas podem atuar em sinergia com outros fatores para aumentar a eficiência no controle de patógenos Gram-positivos, especialmente *L. monocytogenes*, em produtos lácteos fermentados.

SUMMARY

Characterization of the antimicrobian and technological activity of three bacteriocinogenic cultures and evaluation of its efficiency in the *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* control in Minas Frescal cheese.

The biopreservation system, such as bacteriocinogenic lactic bacteria cultures and/or their bacteriocins, have received increasing attention and new approaches to control pathogenic and spoilage microorganisms have been developed. The purpose of this study was to evaluate the action of bacteriocin-producing cultures (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 and *Enterococcus faecium* FAIR-E 198) on some Gram-positive pathogens in different culture media and dairy products. The bacteriocin production was influenced by the media. The antimicrobial activity of these cultures was evaluated by agar-well diffusion assay. The bacteriocins produced by *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198 presented inhibitory activity on *Listeria monocytogenes* alone, on the other hand, the nisin produced by *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 demonstrated wide action spectrum, albeit with lower activity. In compatibility of associative development evaluation with the commercial starter culture, only *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 presented activity on the starter culture. The acidifier activity determination was carried out in skimmed milk after 8h and 24h of incubation at 35ºC. The addition of 0.1% and 0.5% of the bacteriocinogenic cultures did not affect the production of lactic acid by the starter culture. The associative development of the starter culture with *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198 provided significant increase in bacteriocin activity of these cultures, while the activity of *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 nisin was suppressed. The aminopeptidase activity was determined after cellular lise of the lactic cultures previously grown in MRS broth. *Lb. plantarum* ALC 01 presented the largest activity. Moreover, the behavior of Gram-positive pathogens was analyzed during co-culture with the bacteriocin-producing bacteria and with the starter culture in skimmed milk. *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198 did not influence the development of *Bacillus cereus* K1-B041 and of *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 during the first 24h of incubation at 35ºC. They presented strong inhibition

on *L. monocytogenes* Scott A. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 affected the development of the pathogens studied during the first 12h of incubation. The starter culture demonstrated good inhibition of *B. cereus* K1-B041 (>7.37 log UFC/ml) and *L. monocytogenes* Scott A (>6.26 log UFC/ml). In Minas Frescal cheese, significant difference was not observed between the action of the bacteriocinogenic cultures and the starter culture on *L. monocytogenes* Scott A and *S. aureus* ATCC 27154. *B. cereus* K1-B041 demonstrated susceptibility to *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198 after 7 days. Bacteriocin activity was not detected in the cheeses during 21 days at 8 ± 1ºC. The addition of the bacteriocin-producing bacteria as an adjunct culture to the Minas Frescal cheese did not promote alteration in the pH and in the acidity, however *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198 promoted an increase of the cheese proteolysis. Although the obtained results demonstrated that bacteriocinogenic cultures cannot be used as only method of conservation, these can be used as an additional barrier to optimize the control of Gram-positive pathogens, especially *L. monocytogenes*, in dairy products.

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de microbiota protetora ou seus peptídeos antimicrobianos, técnica esta denominada bioconservação ou biopreservação consiste em uma nova alternativa tecnológica para estender a vida útil e aumentar a segurança de alimentos, tornando-os mais competitivos. Um exemplo desta técnica é a fermentação láctica que apesar de ser antiga é, até hoje, amplamente empregada na indústria de alimentos. A redução do pH devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico, a partir da fermentação de carboidratos disponíveis nos alimentos é responsável pelo principal efeito antagonista contra diferentes microrganismos. Contudo, a competição por nutrientes e a produção de outras substâncias com efeito inibitório (peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas) são importantes mecanismos antimicrobianos exercidos pelas bactérias lácticas (MAGRO et al., 2000). Fato este constatado em estudos realizados por Naldini (2002) e Carvalho, Viotto e Kuaye (2007), onde todas as amostras de queijo Minas Frescal fabricado por acidificação direta apresentaram níveis de contaminação microbiana maiores que aquelas provenientes dos queijos processados com adição de fermento láctico.

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas, com ação antimicrobiana, sintetizadas no ribossomo das bactérias lácticas e efetivas em baixa concentração, por exemplo, 10mg/kg. Além disso, estas substâncias antimicrobianas não promovem alteração na qualidade sensorial do produto (RODGERS, 2001). Apresentam efeito antimicrobiano significativo sobre bactérias Gram-positivas como os gêneros *Listeria, Bacillus, Clostridium* e *Staphylococcus* (HUGAS, 1998).

Listeria monocytogenes é o agente etiológico responsável por aproximadamente 25% das mortes relacionadas a doenças transmitidas por alimentos nos EUA anualmente, além disso, foi responsável por 71% de todos os "recalls" de alimentos realizados neste mesmo país entre 1993 e 1998 (WONG et al., 2000). Nos EUA um surto ocorrido entre 2000 e 2001 devido ao consumo de queijo Mexicano, contaminado com *L. monocytogenes,* foi responsável por 121 casos, 5 abortos e 11 óbitos (USA, 2001). Na Europa entre 1991 e 2001 foram notificados 2.065 casos de listeriose, pórem os órgãos competentes estimam que o número real seja ainda maior (LUNDÉN et al., 2004).

Surtos relacionados a *Bacillus cereus* já foram relatados nos EUA, Reino Unido, Canadá, Holanda, Escandinávia e outros países, envolvendo diversos alimentos como fonte de veiculação, dentre eles produtos cárneos, laticínios, condimentos e arroz oriental. O "British Columbia Center for Disease Control" (2002) relatou a ocorrência de dois surtos de doença transmitida por alimentos no Canadá, envolvendo mais de 100 pessoas devido à contaminação de leite por *B. cereus*. No Estado de São Paulo, *B. cereus* foi identificado como agente etiológico de 45 (4,8%) dos 932 casos de doenças transmitidas por alimentos notificados à vigilância epidemiológica em 2002 (SÃO PAULO, 2002).

A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* é um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar. De acordo com os dados da Fundação Ezequiel Dias, no estado de Minas Gerais entre 1995 e 2001 ocorreram 23 surtos, 660 casos e 1 óbito, devido ao consumo de queijos contaminados por toxinas estafilocócicas (CARMO, 2004). Entre 2001 e 2003, no município de São José de Rio Preto foram notificados 4 surtos e 52 casos de intoxicação alimentar causada por *S. aureus* (PERESI et al., 2004).

As bacteriocinas são de grande interesse na indústria de alimentos como conservadores naturais e possíveis substitutos de conservantes químicos. Porém, a utilização comercial destes compostos purificados requer a autorização como aditivo alimentar em órgãos governamentais regulamentadores da área de saúde pública e/ou agricultura. Por esse motivo são necessários extensos trabalhos de pesquisa para que uma bacteriocina possa ser reconhecida como segura para o consumo e liberada para comercialização. Uma alternativa para aumentar a segurança de produtos fermentados seria a utilização de culturas lácticas produtoras destes compostos, contudo o emprego destes microrganismos não poderia promover a descaracterização do produto. Particularmente no caso de queijos frescos, o aumento da autólise das linhagens do fermento láctico acarretado por algumas bacteriocinas, promoveria a liberação de aminopeptidases intracelulares e conseqüentemente, aumento da proteólise e descaracterização do produto. Portanto, estudos que abordem tanto as características antimicrobianas como as tecnológicas de culturas bacteriocinogênicas para o emprego no processamento de queijos são necessários.

Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho foram:

a) Determinar o espectro de atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 contra linhagens de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus.* Além de caracterizar o desenvolvimento e produção destas bacteriocinas em meio de cultivo e leite desnatado;

b) Determinar a capacidade de inibição de culturas produtoras de bacteriocinas *in vitro* sobre duas marcas comerciais de fermento láctico. Também, avaliar a capacidade de acidificação e produção de bacteriocina durante desenvolvimento em leite desnatado em culturas puras e em associação com fermento láctico. Além disso, determinar a atividade de aminopeptidases destas culturas após lise celular;

c) Avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* Scott A, *S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041 em desenvolvimento associativo com as culturas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em leite desnatado;

d) Avaliar o desempenho das culturas bacteriocinogênicas como adjuntas ao fermento láctico no controle de *L. monocytogenes* Scott A, *S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041 em queijo Minas Frescal. Além de verificar possíveis alterações provocadas por estas culturas nas características físico-químicas e proteólise do queijo.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas constituem um grupo filogeneticamente diverso, são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, cocos ou bacilos que apresentam em seu DNA 55% de G+C e fermentam hidratos de carbono produzindo ácido láctico. Estas bactérias ocupam muitos nichos ecológicos como certos alimentos, boca, trato gastrointestinal e urogenital de homens e animais (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993).

O grupo de bactérias lácticas inclui os gêneros *Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Carnobacterium, Aerococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* e *Weisella* (ADAMS, 1999).

Existe uma ampla variedade de linhagens destas bactérias que são empregadas rotineiramente como culturas iniciadoras na fabricação de derivados lácteos, cárneos e vegetais fermentados. A contribuição mais importante destes microrganismos nos alimentos é o aumento da vida-de-prateleira e inibição de patógenos, isto se deve a competição por nutrientes e a presença de substâncias inibidoras produzidas pelas culturas lácticas, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (RAY, 1992).

1.1. Lactococos

Os lactococos são cocos que se apresentam em pares ou em cadeias curtas ou longas. São imóveis, não esporulados, catalase negativa, microaerófilos e desprovidos de citocromos, sendo incapazes de respirar, efetuando somente metabolismo fermentativo. Dentre todas as espécies deste gênero, *Lactococcus lactis* é a mais importante comercialmente, composta das subespécies homofermentativas *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e da heterofermentativa *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Estas bactérias são comumente utilizadas como fermento simples, misto ou múltiplo para fabricação de diferentes tipos de derivados lácteos (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

1.2. Lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* é o maior do grupo das bactérias lácticas, descrito inicialmente por Beijirinck em 1901 é composto por mais de 60 espécies, as quais apresentam grande variedade de características fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas. São bacilos retos ou curvos, podem ocorrer isoladamente ou em cadeia, catalase negativa, imóveis, anaeróbios facultativos, mesófilos ou termófilos (De VUYST e VANDAMME, 1994).

Kandler e Weiss (1986) propuseram a divisão deste gênero em 3 grandes grupos baseado nas características metabólicas. Grupo I Homofermentativos, representado por *Lb. delbrueckii* entre outros, são capazes de degradar hexoses em ácido láctico. Grupo II Heterofermentativos facultativos, por exemplo *Lb. plantarum,* fermentam hexoses quase que exclusivamente em ácido láctico, mas também podem produzir ácido acético, etanol e ácido fórmico em determinadas condições. Grupo III Heterofermentativos obrigatórios, como *Lb. brevis*, são capazes de degradar hexoses e pentoses em ácido láctico e acético, etanol e dióxido de carbono, no caso das hexoses.

1.3. Enterococos

Inicialmente pertencente ao Grupo D dos estreptococos, o gênero *Enterococcus* foi proposto por Schleifer e Kilpper-Balz em 1984, composto a princípio por duas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, atualmente possui mais de 20 catalogadas. Apresentam-se na forma de cocos ou cocobacilos, são catalase negativos e anaeróbios facultativos. Seu principal habitat é o trato gastrointestinal de homens e animais (DE VUYST e VANDAMME, 1994).

Este gênero apresenta características relevantes para ser empregado em tecnologia de alimentos e como probióticos (CINTAS et al., 1997). Contudo, existe dificuldade em regulamentar seu emprego na indústria de alimentos, apesar de não haver consenso quanto a possível patogenicidade deste gênero. Salminen e Von Wright (1993) relataram que *E. faecalis* poderia eventualmente comportar-se como patógeno oportunista, porém não mencionaram a espécie *E. faecium*.

Giraffa e outros (1997) afirmam que os enterococos tão bem quanto outras bactérias lácticas poderiam ocasionalmente estar envolvidos em infecções clínicas, porém muitas linhagens podem ser consideradas seguras para o emprego em alimentos. Em 1996, o "Advisory Committee on Novel Foods and Processes" do Reino Unido aprovou o uso de *E. faecium* K770 como cultura láctica em produtos lácteos fermentados (GIRAFFA, 2003).

2. Bacteriocinas

As bacteriocinas são produtos de síntese ribossômica, secretados extracelularmente e que apresentam atividade antimicrobiana, podem ser produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.1. Histórico

Os primeiros registros sobre bacteriocinas datam de 1925 quando André Gratia publicou um estudo referente ao antagonismo promovido por uma linhagem de *Escherichia coli* sobre outras linhagens da mesma espécie. As substâncias responsáveis por esse efeito inibitório foram denominadas de 'colicinas' em referência ao microrganismo produtor original. Com a descoberta de que a produção desses compostos não se limitava ao grupo dos coliformes, Jacob e outros em 1953 (apud REEVES, 1972), propuseram o termo 'bacteriocina' para as proteínas antimicrobianas com atividade sobre outras linhagens da mesma espécie e produzidas por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos.

Em 1928, Rogers (apud COTTER, HILL e ROSS, 2005) evidenciou a capacidade de certas linhagens de lactococos de promover a inibição de outras bactérias lácticas. Em 1933, uma substância inibidora foi caracterizada como proteína de baixo peso molecular, estável ao aquecimento em pH 4 e com espectro de ação restrita às espécies homólogas. Estas substâncias foram denominadas de 'diplococcinas' em virtude dos microrganismos produtores apresentarem morfologia em forma de diplococos (WHITEHEAD, 1933 apud COTTER, HILL e ROSS, 2005). Somente em 1947, Mattick e Hirsch (apud COTTER, HILL e ROSS, 2005) concentraram uma substância inibidora produzida por uma linhagem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* que apresentava características bioquímicas distintas da diplococcina, ou seja, um amplo espectro de atividade, denominando-a de nisina, cuja

palavra foi derivada do termo ‘substância inibidora do grupo N’, referindo-se a antiga classificação de Lancefield atribuída ao gênero *Streptococcus.*

A nisina foi inicialmente purificada e comercializada na Inglaterra em 1953, sendo considerada segura para uso em alimentos pelo JECFA/OMS em 1969. Na Europa, em 1983, foi adicionada à lista de aditivos alimentares e em 1988 nos EUA, o FDA autorizou seu uso em queijos processados. No Brasil, em 1996, foi autorizado seu emprego em queijos na concentração de até 12,5mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

2.2. Classificação

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas estão distribuídas em 4 classes. Em geral, a classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (<5kDa), diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados; a classe II é composta por pequenos peptídeos (<10kDa) termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III é representada por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (>30kDa) como helveticina J; na classe IV encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura, contudo Cleveland e outros (2001) acreditam que estes compostos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas. Kemperman e outros (2003) sugeriram a inclusão de uma quinta classe para abrigar as bacteriocinas circulares.

Em 2005, Cotter, Hill e Ross propuseram uma nova classificação, a qual subdivide as bacteriocinas em duas categorias distintas: os lantibióticos (classe I) contendo lantionina e os não lantibióticos (classe II), enquanto os peptídeos de alto peso molecular termolábeis, formalmente componentes da classe III, seriam separadamente designados de ‘bacteriolisinas’. Os autores sugerem ainda que a classe V (KEMPERMAN et al., 2003) seja incorporada à classe II dos não lantibióticos como uma subclasse, já a classe IV seria extinta.

Para Drider e outros (2006) as bacteriocinas estariam distribuídas em três grandes classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Classificação das bacteriocinas segundo Drider e outros (2006).

Classificação	**Descrição**	**Subcategorias**	**Exemplos**
Classe I ou Lantibióticos	peptídeos que contém lantionina ou β-lantionina	tipo A (moléculas lineares, < 4kDa)	nisina, subtilina, epidermina
		tipo B (molécula globular)	mersacidina, mutacina, actagardina
Classe II	classe heterogênea de pequenos peptídeos termoestáveis	subclasse IIa (bacteriocinas tipo pediocina–antilisterial)	pediocina, enterocina, sakacina
		subclasse IIb (compostas por dois peptídeos)	plantaricina, lactacina F
		subclasse IIc (outras bacteriocinas)	lactococcina
Classe III	grandes peptídeos (> 30kDa) termolábeis		helveticina J, millericina B

2.2.1. Classe I (Lantibióticos)

Os lantibióticos são pequenos peptídeos (19-38 resíduos de aminoácidos) termoestáveis que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina, resultante da associação de duas alaninas ligadas por uma ponte dissulfeto, ou β-metilantionina, resultante de um ácido aminobutírico ligado a uma alanina por uma ponte dissulfeto (JARVIS et al., 1968).

2.2.1.1. Nisina

A nisina é um lantibiótico produzido por algumas linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis,* composta por 34 resíduos de aminoácidos (3.500Da), podendo ocorrer na forma de dímero ou oligômero. Sua baixa toxicidade é reflexo da completa digestibilidade de seus compostos, podendo ser ingerida em altas concentrações pela maioria dos animais, incluindo os humanos, sem o aparecimento de efeitos colaterais (FRAZER et al., 1962).

Duas ocorrências naturalmente variantes da nisina são a nisina A e a nisina Z que diferem estruturalmente em apenas um resíduo de aminoácido, porém com atividade semelhante. A nisina A apresenta na posição 27 um resíduo de histidina (**Figura 1**) e a nisina Z uma asparagina (MULDERS et al., 1991).

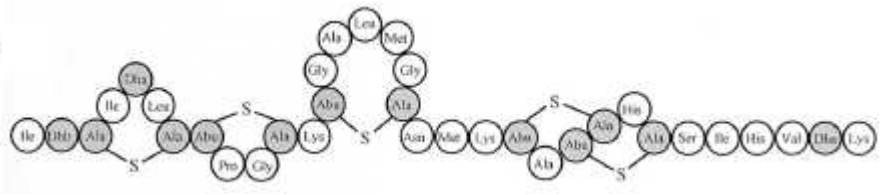

Figura 1. Representação esquemática da molécula de nisina A. Fonte: Héchard e Sahl (2002).

Devido à natureza ácida de sua molécula a nisina apresenta estabilidade máxima em condições ácidas. Ela é completamente estável em soluções a pH 2,0, podendo ser estocada durante um período prolongado a temperaturas de 2 e 7ºC, sem perda de atividade. Acima de pH 7,0 a inativação ocorre mesmo em temperatura ambiente (DELVES-BROUGHTON, 1990; HURST, 1983).

O interesse inicial pela utilização da nisina como um agente antimicrobiano foi em decorrência de sua capacidade de inibir o desenvolvimento pós-germinativo de esporos de espécies dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

A nisina possui um duplo mecanismo de ação, ao ultrapassar a parede celular liga-se ao lipídio II, principal transportador de subunidades de peptidoglicanos do citoplasma para a parede celular, interferindo, portanto, na síntese desta estrutura. Além disso, a nisina pode usar o lipídeo II como uma molécula carreadora para iniciar o processo de inserção e formação de poros na membrana celular, promovendo alteração na permeabilidade da mesma (BREUKINK et al., 1999), conforme **Figura 2**. O efluxo de moléculas essenciais (íon K^+, aminoácidos e ATP) através dos poros ocasiona a alteração do potencial de membrana e do gradiente iônico, acarretando a morte celular (ABEE et al., 1994).

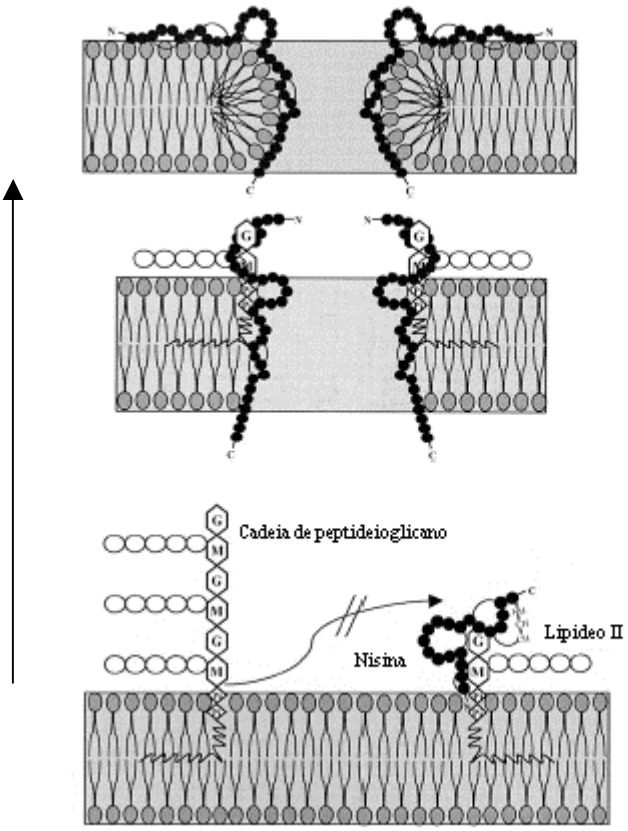

Figura 2. Representação esquemática do modo de ação da nisina. Fonte: Héchard e Sahl (2002).

2.2.2. Classe II

Esta classe é composta por pequenos peptídeos (<10kDa) termoestáveis. Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na

membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e morte celular. São propostas três subdivisões para esta classe (DRIDER et al., 2006).

2.2.2.1. Classe IIa

A classe IIa é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *Listeria monocytogenes.* Seus representantes possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos, com uma porção N-terminal com configuração de folha pregueada, estabilizada por pontes dissulfeto e uma porção C-terminal contendo uma ou duas α-hélices (FIMLAND et al., 2005) (**Figura 3**). A maioria das bacteriocinas da classe IIa possui seus genes de codificação em um plasmídio, exceto enterocina A, divercina V41, sakacina P e carnobacteriocinas B2 e BM1, cujos genes de codificação localizam-se no cromossomo (AYMERICH et al., 1996; HUHNE et al., 1996; QUADRI et al., 1997).

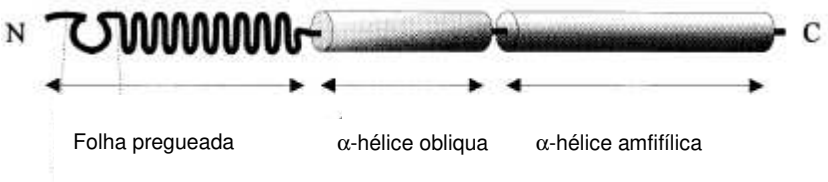

Figura 3. Representação esquemática da estrutura das bacteriocinas da classe IIa. Fonte: Ennahar e outros (2000b).

As bacteriocinas desta classe inserem-se na membrana celular do microrganismo alvo pela porção C-terminal hidrofóbica e/ou anfifílica promovendo a formação de poros e conseqüente dissipação da força próton motriz, a qual envolve dissipação total do gradiente iônico e parcial do potencial de membrana (KAISER et al., 1996), conforme **Figura 4**. Na tentativa de manter ou restaurar a força próton motriz, ocorre uma aceleração no consumo do ATP intracelular, esta depleção do ATP também pode estar relacionada à inabilidade da célula em produzir o composto devido ao efluxo de fosfato. Chen e Montville (1995) afirmam que 98,9% do ATP são consumidos durante este processo. A formação dos poros

na membrana celular promove o extravasamento para o meio extracelular de íon potássio, aminoácido e outras moléculas de baixo peso molecular (BHUNIA et al., 1991).

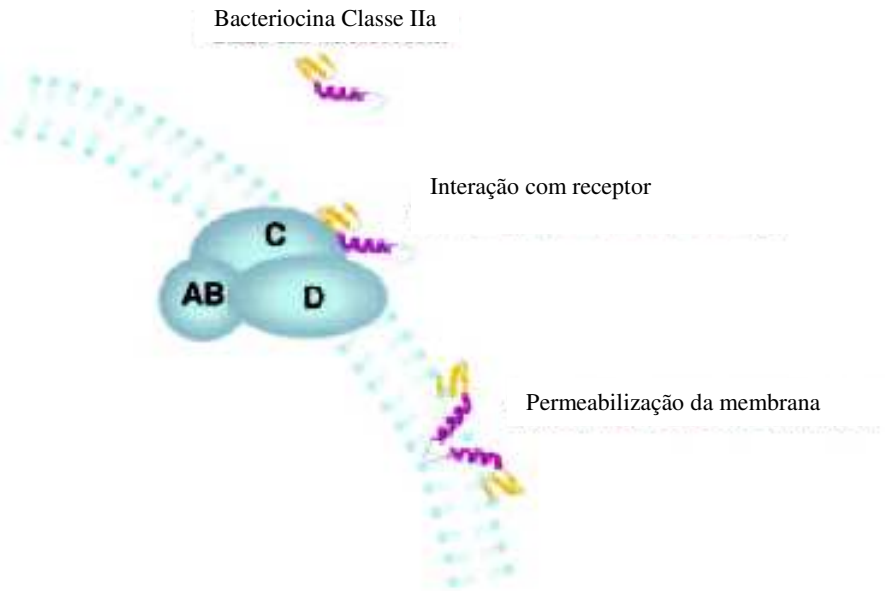

Figura 4. Representação esquemática do modo de ação das bacteriocinas da classe IIa. Fonte: Drider e outros (2006).

a. Pediocina AcH

Pediocina AcH composta por 44 resíduos de aminoácidos é a única bacteriocina da classe IIa sintetizada não só por diferentes espécies como também por diferentes gêneros de bactérias lácticas. Inicialmente foi detectada em *Pediococcus acidilactici* PA 1.0 (GONZALEZ e KUNKA, 1987) e H (BHUNIA et al., 1987). Desde então outras linhagens e espécies de pediococos foram descritas como produtoras de pediocina AcH (BENNIK et al., 1997; RAY et al., 1989) e em 1996 Ennahar e outros isolaram em queijo Munster uma linhagem de *Lb. plantarum* também produtora desta bacteriocina.

b. Enterocinas

A primeira enterocina foi identificada por Kjems em 1955 (apud DE VUYST e VADAMME, 1994). Desde então várias enterocinas têm sido descritas e possuem representantes em mais de uma classe de bacteriocina. Geralmente são termoestáveis (121ºC/15min), resistentes à liofilização e à estocagem a –20ºC por longos períodos. Segundo Cintas e outros (1997), estes compostos possuem ação antimicrobiana seletiva, não apresentam antagonismo contra *Leuconostoc* e *Lactococcus*, porém age sobre *Clostridium perfringens, C. botulinum, S. aureus* e especialmente sobre o gênero *Listeria.*

2.2.2.2. Classe IIb

Esta classe é composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos. Seu mecanismo de ação também envolve a dissipação do potencial de membrana, perda iônica e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade muito baixa se forem empregados individualmente (GARNEAU et al., 2002).

2.2.2.3. Classe IIc

As bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica (KAWAI et al., 2004). Embora tenham sido identificados poucos representantes desta classe, estes autores propõem duas subdivisões, baseado na porcentagem de similaridade na seqüência de aminoácidos, a subclasse c (i) que compreende a enterocina AS-48 e a circularina A e a subclasse c(ii) composta pela gasericina A, reutericina 6 e butirivibriocina AR10.

2.2.3. Classe III

Esta classe é composta por grandes proteínas (>30kDa) termolábeis, são bacteriocinas complexas quanto à atividade e à estrutura protéica. Seu mecanismo de ação se diferencia das demais bacteriocinas, promovendo a lise celular através da lise da parede celular do microrganismo alvo. Apresentam uma porção N-terminal homóloga a uma endopeptidase, responsável pela catálise da parede celular e uma porção C-terminal responsável pelo reconhecimento da célula alvo (LAI et al., 2002).

2.3. Biologia molecular

Para síntese das bacteriocinas são necessários pelo menos quatro genes: gene codificador da pré-bacteriocina, do sistema de transporte, da proteína acessória e da proteína de imunidade.

As bacteriocinas geralmente são sintetizadas como pré-peptídeos inativos que possuem uma seqüência guia N-terminal. Esta seqüência guia mantém a bacteriocina na forma inativa dentro da célula produtora, facilitando a interação com o transportador e, provavelmente, no caso dos lantibióticos tem um papel no reconhecimento do mecanismo de modificação estrutural (XIE et al., 2004). Este precursor é transportado à superfície celular durante a fase de crescimento exponencial e catalisado na forma ativa.

O transporte para o meio extracelular é executado por um transportador que pode também conter uma porção proteolítica N-terminal pertencente à família das cisteína-proteases responsável pela clivagem do peptídeo guia, além de uma porção C-terminal responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia para o transporte da bacteriocina (AUCHER et al., 2005) (**Figura 5**). No caso dos lantibióticos a clivagem pode ser realizada por uma serina-protease específica (Van der MEER et al., 1993). Para a classe II as proteínas acessórias são utilizadas para facilitar a translocação na membrana e/ou clivar o peptídeo guia.

O sistema responsável pela regulação da produção de bacteriocinas é composto por três componentes: peptídeo indutor (ferormônio), histidina quinase transmembrana (receptor do ferormônio) e regulador de resposta (NES e EIJSINK, 1999) (**Figura 5**).

O peptídeo indutor é sintetizado no ribossomo em baixos níveis como pré-peptídeo, o qual é clivado e secretado no meio externo pelo transportador. Quando este composto atinge certa concentração ativa a histidina quinase transmembrana que conduz a uma autofosforilação do resíduo de histidina, transferindo para proteína reguladora de resposta um fosfato, este regulador fosforilado ativa a transcrição da bacteriocina, além dos elementos que compõem o sistema regulador, iniciando um “feedback” positivo (NES e EIJSINK, 1999) (**Figura 5**).

A regulação da produção dos lantibióticos como nisina e subtilina é feita pela própria bacteriocina que funciona como ferormônio para induzir sua produção a níveis elevados (KLEEREBEZEM e QUADRI, 2001). Embora haja um exemplo de bacteriocina da classe II que age como ferormônio (RYAN, ROSS e HILL, 2001), a presença de um outro peptídeo indutor é mais frequente nesta classe (NILSEN, NES e HOLO, 1998).

O mecanismo de imunidade das bactérias produtoras de bacteriocinas é capaz de distinguir entre a bacteriocina produzida pela própria cultura e por outras. Dois sistemas distintos estão envolvidos na imunidade das classes I e II. A proteção pode ser promovida por uma proteína específica e/ou pelo sistema transportador (**Figura 5**). O mecanismo através do qual eles funcionam é semelhante, pelo seqüestro da proteína estrutural ou por competição antagônica pelo receptor de bacteriocina (HOFFMANN et al., 2004). Para a classe I a imunidade é promovida por um ou ambos os sistemas (STEIN et al., 2005), para as classes IIa e IIb a imunidade esta relacionada a uma única proteína e na classe IIc o responsável pela imunidade é o sistema de transporte (DIAZ et al., 2003).

O sistema de imunidade apresenta alta especificidade e na maioria das vezes confere proteção contra apenas um tipo de bacteriocina, porém foram observados casos de proteção cruzada entre algumas bacteriocinas. A sakacina e as pediocinas PA-1/AcH são muito similares estruturalmente e suas respectivas proteínas de imunidade protegem contra uma ou outra (FIMLAND et al., 2002). Segundo Franz e outros (2000) a proteína de imunidade da carnobacteriocina A também confere proteção contra a enterocina B.

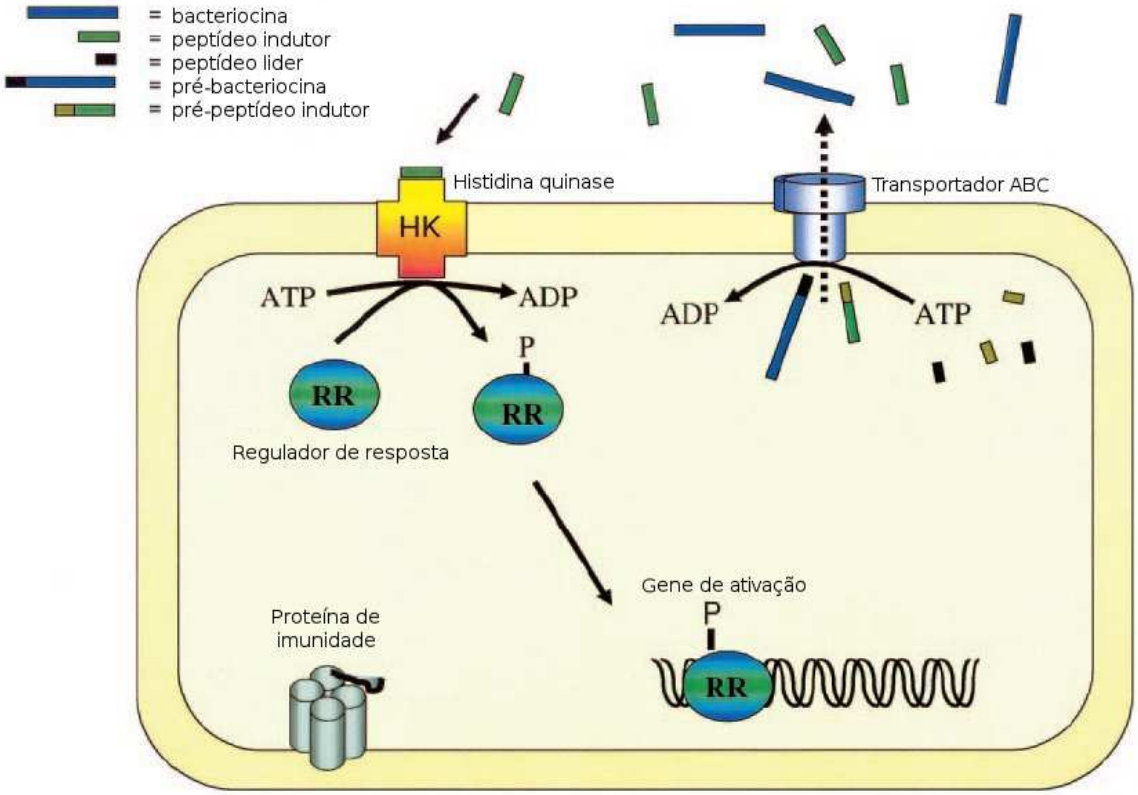

Figura 5. Representação esquemática da biosíntese e regulação de bacteriocinas da classe IIa. Fonte: Drider e outros (2006).

2.4. Espectro de ação antimicrobiana

O espectro de inibição das bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas é relativamente mais estreito que o apresentado por peptídeos produzidos por células eucarióticas, como a pleurocidina que apresenta atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (COLE, WEISS e DIAMOND, 1997). Por outro lado, as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são ativas em concentrações muito menores, provavelmente devido à interação destes compostos com receptores específicos presentes na membrana celular do microrganismo alvo (NISSEN-MEYER et al., 1997).

Conventry e outros (1997) avaliaram o espectro de ação antimicrobiana de duas linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtoras de bacteriocinas (AW73 e KMSO) sobre

três linhagens de *L. monocytogenes*, três de *S. aureus,* uma de *B. cereus,* uma de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e duas de *Lc. lactis* subsp. *lactis.* Utilizando a linhagem AW73, através do método de difusão em ágar, foi observado halo de inibição de desenvolvimento sobre quase todos os microrganismos indicadores, excetuando-se uma linhagem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e uma de *B. cereus*. A linhagem KMSO apresentou resultados semelhantes aos da linhagem AW73, diferenciando-se apenas quanto à inibição de *S. aureus*, onde apenas duas linhagens demonstraram sensibilidade.

Benkerroum e outros (2002) utilizaram o método de "spot" para analisar o espectro de ação antimicrobiana de uma linhagem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtora de bacteriocina sobre sete linhagens de *L. monocytogenes,* uma de *S. aureus,* uma de *Bacillus sp.,* duas de *Lc. lactis* spp. não produtoras de bacteriocina. Todas as linhagens de *L. monocytogenes* e uma de *Lc. lactis* spp. apresentaram forte sensibilidade à bacteriocina avaliada (diâmetro de inibição duas vezes maior que o diâmetro do "spot"). *S. aureus* demonstrou sensibilidade intermediária (de 1,5 a duas vezes o diâmetro do "spot"). Não foi observada inibição de uma linhagem de *Lc. lactis* spp. e de *Bacillus* sp.

Millette e outros (2004) estudaram a atividade antimicrobiana de *Lc lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 sobre *S. aureus* e *E. faecium* e obtiveram halos de inibição de *S. aureus* e *E. faecium* com raio entre 6 e 10mm.

Rilla e outros (2004) reportaram atividade antimicrobiana de 200 UA/ml de nisina Z, produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 sobre *S. aureus.*

As bacteriocinas da classe IIa apresentam um espectro de ação bastante restrito quando comparado às outras bacteriocinas; todos os compostos pertencentes a esta subclasse são descritos como ativos contra o gênero *Listeria*. Ennahar e outros (1998a) reportaram um forte poder inibitório de *Lb. plantarum* WHE 92, produtor de pediocina AcH sobre *L. monocytogenes.* Após 4 dias de incubação em caldo MRS a 15ºC, a população do patógeno foi maior que 10^8 UFC/ml no controle e de 10^2 UFC/ml na amostra com *Lb. plantarum*.

Loessner e outros (2003) avaliaram a sensibilidade de 12 linhagens de *L. monocytogenes* à pediocina AcH produzida por *Lb. plantarum* ALC01 e observaram zona de inibição entre 10 e 13mm de diâmetro para todas as linhagens avaliadas.

McKay (1990) avaliou a inibição do desenvolvimento de cinco linhagens de *L. monocytogenes* por *E. faecium* e encontrou zona de inibição entre 22 e 24mm de diâmetro.

Franz e outros (1996) avaliaram o espectro de ação antimicrobiana de *E. faecium* BFE 900. Todas as linhagens de *L. monocytogenes* demonstraram sensibilidade à bacteriocina, contudo *B. cereus, S. aureus e Lc. lactis* não foram inibidos.

Em 1998, Ennahar e outros analisaram o espectro de ação de *E. faecium* WHE 81, produtor de enterocina 81, sobre os mesmos microrganismos avaliados anteriormente com *Lb. plantarum*. Para *L. monocytogenes* observaram halo de inibição entre 2 e 4 mm de diâmetro, enquanto *S. aureus, B. cereus e Lc. lactis* não demonstraram sensibilidade à enterocina 81.

Ennahar e Deschamps (2000) utilizaram o método de diluição crítica para determinar a atividade antimicrobiana de enterocina A, produzida por *E. faecium* EFM 01. De 14 linhagens de *L. monocytogenes*, 13 demonstraram sensibilidade à bacteriocina, porém nenhuma das sete linhagens de *S. aureus* foi inibida.

Leroy e outros (2003) relataram forte ação inibitória de *E. faecium* sobre *Listeria* sp. e limitado antagonismo sobre culturas iniciadoras.

Contudo, alguns autores constataram atividade destas bacteriocinas também sobre outros gêneros de bactérias. Ennahar e outros (1996) observaram a inibição de 7 linhagens de *L. monocytogenes* (halo de inibição entre 8 e 14mm de diâmetro), 2 de *L. innocua* (halo entre 8 e 10mm), 1 de *B. cereus* (11mm) por *Lb. plantarum* WHE92 produtor de pediocina AcH. Duas linhagens de *Lc. lactis* spp, 1 linhagem de *S. aureus* e outra de *B. cereus* não sofreram inibição.

Elotmani e outros (2002) compararam o espectro de ação antimicrobiana de 4 linhagens de *Lc. lactis* e 4 de *E. faecium* sobre microrganismos gram-positivos. Para *L.*

monocytogenes observaram halo de inibição entre 2 e 13mm e entre 5 e 13mm para *Lc. lactis e E. faecium,* respectivamente. Apenas *Lc. lactis* inibiu o crescimento de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (19 a 20mm). *S. aureus* não demonstrou sensibilidade a nenhuma das bactérias lácticas avaliadas. Três linhagens de *Lc. lactis* e uma de *E. faecium* promoveram inibições entre 3 e 5mm do crescimento de *B. cereus.*

Álvarado e outros (2005) estudaram o espectro antimicrobiano de *E. faecium* VQ 31 e observaram que a bacteriocina produzida por esta espécie foi capaz de inibir *L. monocytogenes* (halo entre 9 e 10mm) e *S. aureus* (8mm), enquanto *B. cereus, Lc. lactis* spp. e *Lb. plantarum* não sofreram inibição.

Ammor e outros (2006) analisaram a atividade antimicrobiana de 21 linhagens de *E. faecium* isoladas de salsicha. Três linhagens apresentaram atividade sobre *S. aureus* e todas as 21 linhagens promoveram inibição de *L. innocua.*

2.5. Requisitos necessários para utilização de bacteriocinas como bioconservantes

Em geral para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: a linhagem produtora deve ter status GRAS; a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar da qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL et al., 1995).

Yang e Ray (1994) estabeleceram que para uma bacteriocina ser aceita como aditivo alimentar devem ser realizados inúmeros estudos prévios para estabelecer seu espectro de ação, suas características bioquímicas e genéticas e também da linhagem produtora, estabelecer a sensibilidade destes compostos a alteração de pH e temperatura, os fatores que afetam sua produção, o processo de purificação e o custo de sua aplicação.

2.6. Aplicação na indústria de laticínios

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de

culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas.

Maisnier-Patin e outros (1992) obtiveram redução de 1,57 log UFC/g na população de *L. monocytogenes,* durante as primeiras 24h, em queijo Camembert fabricado com *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina, enquanto que a amostra controle apresentou redução de 0,80 log UFC/g.

Zottola e outros (1994) observaram redução de 3 log UFC/g na população de *S. aureus* após 5 dias a 23ºC, em queijo Cheddar produzido com *Lc. lactis lactis* produtor de nisina.

Maisnier-Patin e outros (1995) investigaram a ação antimicrobiana adicional da nisina sobre *L. monocytogenes* em leite desnatado durante aquecimento. A utilização de 25 ou 50UI/ml de nisina resultou numa redução significativa do tempo necessário para promover a eliminação do patógeno.

Davies e outros (1997) avaliaram a eficiência de nisina no controle de *L. monocytogenes* em ricota estocada entre 6 e 8 ± 1ºC por 70 dias. Na amostra com 1,25 mg/l de nisina o patógeno permaneceu abaixo do limite de detecção por 11 dias, na amostra controle a população do patógeno atingiu contagens superiores a 7 log UFC/g após 15 dias.

Quando enterocina AS 48 produzida por *E. faecalis* foi adicionada a queijo Manchego promoveu redução de 1,2 log UFC/g na contagem de *L. monocytogenes* em relação à amostra controle após 60 dias de maturação (NUÑEZ et al., 1997).

Ennahar e outros (1998a) investigaram a atividade anti-*Listeria monocytogenes* de *Lb. plantarum*, produtor de pediocina AcH, em queijo Munster. Não foi detectada *L. monocytogenes* em nenhuma amostra adicionada de *Lb. plantarum* WHE 92 até o final do período de maturação (21 dias), enquanto as amostras controle apresentaram contagem do patógeno acima de 10^5UFC/g.

Lauková e outros (1999) estudaram o efeito inibitório de enterocina CCM 4231 sobre o desenvolvimento de *S. aureus* em leite. Após 24h, observaram decréscimo do

número de células viáveis do patógeno de 10^{10} UFC/ml no controle para 10^{2} UFc/ml na amostra com enterocina.

Rodrigues e outros (2000) obtiveram redução na contagem de *S. aureus* em queijo produzido com *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina entre 0,41 e 0,48 log UFC/g após 1 dia e entre 0,62 e 0,82 log UFC/g após 30 dias de maturação.

Lauková e outros (2001) obtiveram redução de 3,6 log UFC/g na contagem de *L. monocytogenes* em queijo Saint-Paulin contendo enterocina em relação ao queijo controle após uma semana a 14ºC.

Rodríguez e outros (2001) monitoraram o crescimento de *L. monocytogenes* artificialmente inoculada em queijo semiduro preparado com cultura comercial e com *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 50 produtor de nisina. Após 60 dias de estocagem, foi detectada redução de 2,64log UFC/g de *L. monocytogenes* no queijo fabricado com a cultura produtora de nisina e de apenas 0,23 log UFC/g naquele com a cultura comercial.

Benkerroum e outros (2002) não detectaram *L. monocytogenes*, após 1 dia de estocagem a 7ºC, em leite fermentado contendo *Lc. lactis* produtor de bacteriocina, porém a amostra controle apresentou contagem ao redor de 6 log UFC/ml entre o 2º e 6º dia.

Elotmani e outros (2002) obtiveram redução de 2 log UFC/ml na contagem de *L. monocytogenes* após 24h de crescimento associativo com *Lc. lactis* subsp. *lactis* R9/2 e *E. faecium* R18 em leite a 30ºC.

Hamama e outros (2002) avaliaram o efeito inibitório de *Lc. lactis* subsp. *lactis* UL 730 produtor de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* enterotoxigênico durante o processamento e estocagem de queijo fresco marroquino. Após 4 dias de estocagem, o inóculo inicial (3 log UFC/g) de *S. aureus* foi reduzido a níveis não detectáveis (<1 log UFC/g) nas amostras produzidas com cultura nisina positiva.

Moreno e outros (2002) estudaram a viabilidade do emprego de *Enterococcus faecium* como co-cultura em queijo Cheddar. Os autores não observaram alteração no pH do queijo, nem na contagem da cultura láctica comercial (*L. lactis* subsp. *cremoris*) quando

E. faecium foi utilizado. Porém, o tratamento com a co-cultura apresentou poder inibitório sobre *L. innocua* durante os 12 meses de maturação, indicando produção de enterocina em todo o período.

Rossland e outros (2003) avaliaram a ação de *Lb. plantarum* 2741 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ML8 sobre *B. cereus* em crescimento associativo em leite por 72h a 30ºC. Após 24h, *B. cereus* não foi detectado na amostra com *Lc. lactis* subsp. *lactis*, o mesmo foi observado após 48h, quando utilizaram *Lb. plantarum*, enquanto a amostra controle apresentou contagem de 8,12 log UFC/ml.

García e outros (2004) avaliaram o antagonismo de *E. faecalis* sobre *L. monocytogenes* em co-cultivo em leite. O número de células viáveis de *L. monocytogenes* aumentou durante as primeiras quatro horas de incubação a 37ºC, após este período, a população do patógeno declinou até atingir 24 UFC/ml.

Muñoz e outros (2004) obtiveram redução na população de *B. cereus* de 1, 2, 4,3 e 5,6 log UFC/g em queijo contendo *E. faecalis* em relação à amostra controle após 5, 10, 15 e 30 dias.

Rilla e outros (2004) investigaram o poder inibitório de nisina Z produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 sobre *S. aureus* em queijo Afuega'l Pitu. Após 2 semanas, o patógeno não foi mais detectado no queijo contendo nisina Z.

Rodrigues e outros (2005) obtiveram redução na população de *L. monocytogenes* de 0,55 e 1,64 log UFC/g em queijo utilizando *Lc. lactis* sp. produtor de nisina e pediocina, respectivamente.

Achemchem e outros (2006) analisaram a ação de *E. faecium* produtor de bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes* em queijo Jben durante 14 dias a 22ºC. Inicialmente, observaram redução a níveis abaixo do limite de detecção, após 3 dias, houve crescimento até 3 log UFC/g e, após 7 dias, o patógeno novamente não foi detectado. A amostra controle apresentou contagens superiores a 4 log UFc/g durante todo o período.

Areal e outros (2006) observaram redução de 1 log UFC/g na contagem de *S. aureus* presente em queijo Minas Frescal produzido com *E. faecium* E86 em relação ao queijo controle após 18 dias de incubação.

Enan (2006) analisaram a atuação de nisina sobre *L. monocytogenes* em leite e queijo. O patógeno inicialmente inoculado em 5 log UFC/g foi reduzido a níveis abaixo do limite de detecção após 70h e 100h de incubação a 8ºC em leite e queijo, respectivamente.

Esper e outros (2006) avaliaram a atividade de uma cultura comercial de *Lb. plantarum* produtor de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* em ricota. Após 21 dias de estocagem a 7ºC observaram redução na população do patógeno entre 2,49 e 2,79 log UFC/g em relação à amostra controle.

2.7. Fatores que afetam a eficiência das bacteriocinas

A eficiência da atividade das bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de bactérias lácticas não é uniforme e constante, a composição química e as condições físicas do alimento podem influenciar a atividade destes compostos. Esta atividade é reduzida devido à ligação das bacteriocinas aos componentes dos alimentos, à adsorção à célula ou a proteínas, à ação do pH e à atividade das proteases e outras enzimas, (SCHILLINGER et al., 1996).

2.7.1. Composição do meio

Segundo Kandler (1983), o tipo de fonte de carbono afeta o desenvolvimento celular e a produção de bacteriocinas por bactérias lácticas, uma vez que a utilização da glicose pela célula não necessita de hidrólise prévia, enquanto a lactose precisa ser hidrolisada em glicose e galactose antes de ser utilizada pela mesma.

Uma correlação entre a degradação da nisina e a extensão da proteólise em creme de leite pasteurizado foi verificada por Phillips e outros (1983). A atividade da nisina diminuiu com o aumento da atividade proteolítica em amostras contaminadas com microrganismos Gram-negativos.

Sulzer e Busse (1991) relataram que a redução da atividade de enterocina durante a maturação de queijo Camembert se deve a ação de proteases produzidas pelo *Penicilium camembert*.

Maisnier-Patin e outros (1992) observaram redução na atividade de nisina de 35% no interior e de 75% na superfície de queijo Camembert, durante a primeira semana de maturação.

Garde e outros (1997) reportaram redução da atividade de enterocina em queijo Hispânico após 15 dias de maturação a 14ºC.

Buyong e outros (1998) atribuíram a redução da atividade de pediocina de 64.000UA/g para 2.000UA/g, após seis meses de maturação de queijo Cheddar, à ação de proteinases e peptidases.

Farias e outros (1999) não detectaram atividade de enterocina CRL 35 em queijo de leite de cabra, embora tenham notado redução da população de *Listeria* sp. durante o período de maturação.

Rodriguez e outros (2005) não detectaram atividade de pediocina produzida por *P. acidilactici* 347 durante o período de maturação do queijo, contudo a nisina exibiu atividade durante o mesmo período.

Parente e Hill (1992) reportaram a redução drástica na produção de bacteriocinas por *E. faecium* em leite quando comparado a atividade obtida em meios de cultura sintéticos. Moreno (1995) verificou menor produção de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em leite quando comparado ao caldo APT.

Sarantinopoulos e outros (2002b) não detectaram atividade de bacteriocina produzida por *E. faecium* FAIR-E 198 utilizando leite desnatado como meio de desenvolvimento. Quando a cultura bacteriocinogênica foi inoculada em leite adicionado de coalho, $CaCl_2$ e fermento comercial também não observaram atividade de bacteriocina. Segundo os autores, este fenômeno poderia ter ocorrido devido à incorporação das moléculas de bacteriocina à micela de caseína ou à sua inativação pela ação do coalho.

Alguns autores constatando uma redução da atividade inibitória da nisina em leite, atribuíram esse efeito adverso à associação dessa molécula a algum componente, em particular, a gordura. Daeschel (1990) avaliando o efeito da gordura na atividade da nisina em alimentos infantis homogeneizados e estéreis, verificou que os que continham alto teor de gordura como peru reduziram significativamente a atividade da nisina, comparativamente ao baixo teor de gordura do feijão verde.

Achenchem e outros, em dois estudos realizados em 2005 e 2006, detectaram atividade de bacteriocina produzida por *E. faecium* após 16h em caldo MRS e apenas após 40h em leite UHT, os autores relacionam este fato a possível interação da bacteriocina a gordura presente no leite.

2.7.2. Concentração do microrganismo alvo

A eficiência inibitória das bacteriocinas depende do nível de contaminação do alimento pelo microrganismo alvo. Se a contaminação inicial for muito elevada, a atividade da bacteriocina é restrita, não impedindo o desenvolvimento do microrganismo.

Segundo Maisner-Patin (1990), em queijo Camembert, *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de nisina foi mais efetivo na inibição de *L. monocytogenes* com nível de contaminação inicial de 10^1 UFC/ml que a níveis mais elevados (10^5 UFC/ml).

Benkerroum e outros (2000) quando utilizaram inóculo inicial de 10^4 UFC/g não detectaram *L. monocytogenes* durante 20 dias de estocagem a 7 ou 22ºC em queijo produzido com uma cultura bacteriocinogênica. Ao utilizarem concentração de 10^7 UFC/g do patógeno, observaram redução de 2 log UFC/g após 10 dias de estocagem a 7ºC.

Hamama e outros (2002) avaliaram o efeito inibitório de *Lc lactis* subsp. *lactis* UL730 produtor de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* enterotoxigênico durante o processamento e estocagem de queijo fresco marroquino. Após 4 dias de estocagem, o inóculo inicial (3 log UFC/g) de *S. aureus* foi reduzido a níveis não detectáveis (<1 log UFC/g) nas amostras processadas com cultura nisina positiva. Porém utilizando inóculo maior (5 log UFc/g), obtiveram redução na população do patógeno de apenas 0,86 log UFC/g, no mesmo período.

Loessner e outros (2003) avaliaram o efeito inibitório de *Lb. plantarum* produtor de pediocina AcH sobre diferentes concentrações de *L. monocytogenes* em queijo. A ação da bacteriocina foi dependente do nível de contaminação inicial do patógeno. Quando o queijo foi inoculado com 4 x 10^3 UFC/g, obtiveram redução de 1 a 2 log UFC/g durante o período de maturação, enquanto pronunciada inibição foi verificada quando utilizaram baixo nível inicial de contaminação (2 x 10^2 UFC/g), o patógeno não foi detectado até o 14º dia.

Rilla e outros (2004) analisaram a ação de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 sobre duas diferentes concentrações de *S. aureus* 1,8 x 10^4 (A) e 7,2 x 10^6 UFC/ml (B). Após 24h de incubação, não detectaram *S. aureus* na amostra A, enquanto a amostra B apresentou contagem de 5,0 x 10^4 UFC/ml.

2.7.3. pH do meio

Devido à sua estabilidade máxima em condições ácidas, a atividade da nisina é maior quando utilizada em alimentos ácidos, portanto, a efetiva aplicação da nisina requer que o pH do alimento seja menor que 7,0 para assegurar sua solubilidade e estabilidade durante o processamento e o período de estocagem (HERNANDEZ et al., 1993).

Benkerroum e outros (2002) obtiveram atividade de bacteriocina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* 35 vezes maior em pH controlado a 6,5 do que quando houve variação no valor do pH do meio ao longo do tempo de incubação.

Segundo Yang, Johnson e Ray (1992) a maior percentagem de adsorção de bacteriocinas à célula produtora ocorre entre pH 6 e 6,5 para pediocina AcH, pH 6,5 para nisina, pH 5,5 ou maior para sakacina A e pH 5,5 para leuconocina Lcm1. Por outro lado, nenhuma adsorção foi observada em pH 1,5 para pediocina AcH, pH abaixo de 3 para nisina e leuconocina e abaixo de 2 para sakacina A.

Ennahar e outros (1998) relataram que a atividade de pediocina AcH manteve-se estável após 21 dias de estocagem em meio de cultura com pH 4,0, 5,0 ou 6,0, porém em pH 7,0 observaram redução de 50% da atividade da bacteriocina.

Ennahar e Deschamps (2000) avaliaram o efeito da variação do pH do meio TSB-YE a 30ºC por 18h sobre enterocina A. Não observaram influência significativa do pH (valores avaliados variaram entre 3 e 9) sobre a atividade desta bacteriocina.

A pediocina AcH produzida por *Lb. plantarum* apresenta atividade ótima entre pH 4,0 e 6,0, porém esta decresce em pH 6,5 (ENNAHAR et al., 1996).

Bernbom e outros (2006) detectaram maior atividade de pediocina AcH em pH 5,0 do que em pH 7,0, utilizando um sistema modelo de trato gastrintestinal.

Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2006) relataram que a adsorção da bacteriocina produzida por *Lb. plantarum* N014 foi fortemente influenciada pelo pH do meio, a bacteriocina foi completamente adsorvida em pH 7 e em pH 3 não foi detectado adsorção da mesma à célula.

Leroy e outros (2003) relataram que a atividade de enterocina permaneceu constante em pH superior a 6,5 em caldo MRS a 35ºC.

Segundo Drosinos e outros (2005) o valor de pH ótimo para produção de bacteriocina (5,5) não coincide com o valor ótimo para o desenvolvimento microbiano (6,5).

2.7.4. Temperatura

Em queijos processados adicionados de nisina (250UI/g), Delves-Broughton (1990) verificou perda de 10, 40 e 60% de atividade com temperaturas de estocagem de 20, 25 e 30ºC, respectivamente.

Rogers e Montville (1994) verificaram uma redução da atividade da nisina contra *Clostridium botulinum* proporcional à elevação de temperatura. O nível residual limite diminuiu de 154UI/ml a 35ºC para 32UI/ml a 25ºC e para 12UI/ml a 15ºC.

Leroy e De Vuyst (1999) afirmaram que a degradação da atividade de bacteriocina aumenta com a elevação da temperatura devido a maior atividade das proteases e maior interação existentes entre a célula e a bacteriocina e das moléculas de bacteriocinas entre si.

Segundo Fimland e outros (2000) as pediocinas PA-1 e AcH apresentam a mesma taxa de produção tanto a 20ºC quanto a 37ºC.

Drosinos e outros (2005) obtiveram maior taxa de crescimento e produção de bacteriocina por *Leuconostoc mesenteroides* a 25ºC em caldo MRS.

2.7.5. Cloreto de sódio

Roberts e outros (1992) avaliando a produção de nisina por *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *cremoris* durante a fabricação de queijo Cheddar, verificaram que após a adição de 2,5% de NaCl ocorreu uma redução da atividade da nisina nas amostras de coágulo e de soro. Os autores concluíram que o sal poderia ter interferido no desenvolvimento de *M. luteus* ATCC 10240, microrganismo sensível utilizado no método de avaliação da atividade da nisina.

Nilsen e outros (1998) sugerem que a redução da produção de bacteriocina na presença de sal seja por causa da interferência das moléculas de NaCl na ligação do fator de indução de produção ao receptor .

O NaCl em determinadas concentrações pode reduzir o crescimento de culturas lácticas e conseqüentemente a produção de bacteriocinas, como a sakacina K (LEROY e DE VUYST, 1999), além disso pode proteger os microrganismos alvos como *L. monocytogenes* da ação de bacteriocinas (HUGAS et al., 2002).

Sarantinopoulos e outros (2002b) observaram redução na atividade de bacteriocina e na taxa de crescimento de *E. faecium* FAIR-E 198 após adição de 2% de NaCl no caldo MRS. O mesmo fenômeno foi constatado por Nilsen e outros (1998) utilizando *E. faecium* CTC 492.

Drosinos e outros (2005) observaram maior produção de bacteriocina por *Leuconostoc mesenteroides* na presença de 2,5% de NaCl, porém a produção diminuiu quando aumentaram a concentração do NaCl para 3%. Segundo estes autores o crescimento de algumas bactérias lácticas é favorecido pela presença de baixa concentração de NaCl (1

a 2%) e atribuem a redução da produção de bacteriocina à redução da atividade de água promovida pelo NaCl.

O efeito da adição de NaCl na atividade inibidora de nisina contra *L. monocytogenes* foi estudado por Harris e outros (1991). A adição de 2,5% de NaCl ao ágar BHI promoveu um aumento da efetividade da nisina em concentrações de 1 a 10μg/ml.

Entretanto, Vignolo e outros (1995) concluíram que a atividade de lactocina 705 não foi afetada pela adição de 3% de NaCl no caldo MRS. Gänzle e outros (1999) relataram que o NaCl poderia aumentar a atividade de sakacina P e curvacina A.

2.8. Resistência microbiana

A resistência de mutantes espontâneos às bacteriocinas pode estar relacionada a mudanças ocorridas na parede celular, tais como: alteração do potencial elétrico da membrana ou da fluidez da mesma (LI et al., 2002), alteração da composição lipídica ou do conteúdo de alanina da membrana (VADYVALOO et al., 2004), alteração da carga ou espessura da parede celular (MANTOVANI e RUSSELL, 2001) ou pela combinação de todos os fatores. Segundo van Schaik, Gahan e Hill (1999) estas mudanças podem surgir após exposição da célula a baixas concentrações de lantibióticos ou como parte de uma resposta adaptativa a algum outro estresse. O nível de resistência pode variar de acordo com o mecanismo presente.

O mecanismo de resistência das células à nisina ainda não esta muito bem esclarecido, segundo Ming e Daeschel (1993) e Abee (1995), a resistência de *L. monocytogenes* a nisina está relacionada à variação na composição dos ácidos graxos da membrana celular, com significativa redução da concentração de fosfolipídeos, o que dificulta a formação de poros na membrana pela nisina.

Harris e outros (1991) observaram resistência de *L. monocytogenes* à nisina na freqüência de 10^{-6} a 10^{-8}. Davis e Adams (1994) obtiveram freqüência de resistência deste patógeno à nisina entre 10^{-5} e 10^{-8}. Já Gravesen e outros (2002) relataram que a freqüência de resistência pode variar entre 10^{-2} e 10^{-7} dependendo da linhagem de *L. monocytogenes*.

Enan (2006) observou resistência de *L. monocytogenes* à nisina ou à plantaricina UG1 na freqüência de 10^{-5} a 10^{-6}.

O mecanismo de resistência à classe IIa mais estudado é o da *L. monocytogenes*, o qual parece estar ligado a redução da expressão da manose permease do sistema fosfotransferase. Porém, outros fatores como alteração do potencial elétrico e fluidez da membrana celular podem também estar envolvidos (VADYVALOO et al., 2002).

A resistência bacteriana às bacteriocinas também pode estar relacionada à atividade proteolítica de algumas enzimas como a nisinase produzida por determinados microrganismos (HURST, 1983).

Muitos estudos indicam redução da contagem do microrganismo alvo entre 1 e 3 ciclos logaritmos imediatamente após a adição de uma bacteriocina, não sendo observado mais nenhum efeito após este período. Este fenômeno pode estar relacionado a uma quantidade insuficiente de bacteriocina para inibir todas as células do microrganismo alvo, dando aparência de resistência. As células sobreviventes podem, portanto, continuar seu desenvolvimento, com taxa de crescimento próxima a da amostra controle, porém com menor contagem microbiana (MURIANA, 1996).

A mistura de duas bacteriocinas, principalmente de classes diferentes, aumentaria a eficiência, uma vez que determinadas células resistentes a uma bacteriocina seriam afetadas pela outra (VIGNOLO et al., 2000).

As bactérias Gram-negativas não são sensíveis à maioria das bacteriocinas devido à composição de sua membrana celular. Para possibilitar a permeabilização da bacteriocina pela membrana celular, alguns autores submeteram estes microrganismos a tratamentos com quelantes, choque osmótico ou alta pressão (HERNANDEZ et al., 1993; STEVENS, et al., 1991).

3. Características tecnológicas de culturas bacteriocinogênicas

O emprego de bacteriocinas purificadas na bioconservação de alimentos é muito dispendioso, sendo sua aplicação viável apenas em produtos de alto valor agregado. Uma

alternativa eficaz e mais econômica que vêm sendo amplamente estudada é a adição de culturas bacteriocinogênicas, as quais irão produzir bacteriocina no alimento. Porém, estas linhagens nem sempre são apropriadas para serem utilizadas como fermentos lácticos, visto que a maioria possui baixa atividade acidificante e proteolítica, além de alta sensibilidade a fagos (ROBERTS et al., 1992).

Villani e Coppola (1994) estudaram a habilidade de acidificação de leite de 24 linhagens de *E. faecium* e *E. faecalis*. Após 6h de incubação a 37ºC, a maioria das linhagens apresentaram ΔpH entre 0,4 e 0,8 unidades, as linhagens mais acidificantes foram da espécie *E. faecalis*.

Dako e outros (1995) avaliaram a atividade de aminopeptidases em nove culturas lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus, Lactococcus* e *Pediococcus.* Todas as linhagens testadas exibiram atividade de aminopeptidase ou dipeptilaminopeptidase sobre os substratos utilizados. O gênero *Lactobacilllus* mostrou atividade 5 a 100 vezes maior quando comparado a *Lactococcus* e *Pediococcus.*

Garde e outros (1997) avaliaram a atividade de aminopeptidases em queijo fabricado com e sem adição de *E. faecalis.* Após 3 dias, a atividade sobre Lys-p-Na e Leu-p-NA foi 3,9 e 1,7 vezes maior no queijo com cultura adjunta.

Oumer e outros (2001a) avaliaram o desenvolvimento associativo de culturas lácticas bacteriocinogênicas (0,5%) com nove diferentes fermentos mesofílicos comerciais em leite quanto à capacidade de acidificação e atividade de aminopeptidase. Após 8h a 30ºC, seis e quatro das nove amostras de fermento apresentaram valores de pH significativamente diferentes ($P<0,05$) do controle quando em associação com *E. faecium* e *Lb. plantarum,* respectivamente. As duas linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* avaliadas promoveram alteração significativa nos valores de pH em quatro e cinco amostras de fermento láctico. As nove amostras de fermento demonstraram baixa atividade de aminopeptidases entre 0,01 e 0,22. Das 36 combinações de culturas mistas de fermento láctico com culturas bacteriocinogênicas, dezoito apresentaram aumento da atividade de aminopeptidase e em quinze houve redução comparado ao controle.

Oumer e outros (2001b) avaliaram a produção de ácido láctico e atividade de aminopeptidases em queijo Hispânico produzido com *E. faecalis* produtor de bacteriocina e a diferença do pH entre o queijo controle e o queijo com adição de *E. faecalis* não excedeu 0,11 unidades, durante o período de maturação. Após 24h, os queijos fabricados com *E. faecalis* apresentaram atividade sobre Lys-p-NA e Leu-p-NA 2,5 e 1,9 vezes maior que o queijo controle.

Sarantinopoulos e outros (2001) avaliaram o poder acidificante e atividade de aminopeptidases de 129 linhagens de *Enterococcus* sp. em leite após 6h e 16h de incubação a 37ºC. Após 16h, apenas 21 linhagens promoveram a redução de pH abaixo de 5,0. *E. faecium* FAIR-E 198 demonstrou baixa capacidade acidificante, com pH de 6,3 e 6,1 após 6 e 16h, respectivamente. As linhagens de *Enterococcus* sp. exibiram baixa atividade de aminopeptidases sobre 10 diferentes substratos analisados. *E. faecium* FAIR-E 198 em uma escala de 0 a 4 de atividade de aminopeptidases, apresentou zero para Lys-p-NA e 2 para Leu-p-NA.

Garde e outros (2002) não encontraram diferença significativa entre os valores de pH do queijo Hispânico fabricado com e sem adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de bacteriocina. Os queijos fabricados apenas com fermento láctico mostraram baixa atividade de aminopeptidase (<0,51). Após 7 dias de maturação, a atividade sobre Lys-p-NA em queijos produzidos com *Lc. lactis* subsp. *lactis* foi 10 vezes maior que no queijo controle.

Ayad e outros (2004) pesquisaram a habilidade de produção de ácido e atividade de aminopeptidase em 755 linhagens de bactérias lácticas isoladas de leite e derivados. Sessenta por cento (60%) dos *Lc. lactis* subsp. *lactis* mostraram média atividade acidificante (redução de 0,4 unidade após 3h a 5h). A maioria das linhagens de *Lb. plantarum* demonstrou baixa capacidade acidificante (redução de 0,4 unidades após período maior que 5h) e as linhagens *E. faecium* apresentaram atividade acidificante variando entre baixa e média. Quanto à atividade de aminopeptidases, cinqüenta por cento (50%) das linhagens de *Lactococcus*, setenta por cento (70%) de *Lactobacillus* e 68% de *Enterococcus* exibiram baixa atividade.

Ávila e outros (2005a) utilizaram *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de bacteriocina como cultura adjunta na fabricação de queijo Hispânico. O pH do queijo com cultura adjunta foi menor que o pH do queijo controle durante os primeiros 15 dias e maior após 25 dias de armazenamento. A adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* aumentou significativamente a atividade de aminopeptidase no queijo até o 25º dia.

Em leite, Ávila e outros (2005b) avaliaram o poder acidificante e a atividade de aminopeptidases em 8 linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (*E. faecalis, E. faecium, Lb. plantarum* e cinco linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*). As linhagens de *E. faecalis, E. faecium* e *Lb. plantarum* demonstraram baixa capacidade de produção de ácido após 23h de incubação, enquanto as linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* apresentaram média e alta capacidade de acidificação. Com relação a aminopeptidase, a atividade de cultura mista de *Lb. helveticus* e *E. faecium* não diferiu significativamente do controle. As demais culturas adjuntas promoveram aumento estatisticamente significativo na atividade das aminopeptidases, comparado ao controle. Contudo, todas as culturas bacteriocinogênicas quando cultivadas isoladamente apresentaram baixa atividade, inferior a 0,81 após 23h de incubação.

Quanto à influência de culturas produtoras de bacteriocinas na proteólise de queijos, Casalta e Zennaro (1997) concluíram que em queijo Venaco, a inclusão de enterococos resultou em um aumento do índice de extensão da proteólise comparado ao queijo controle. Martinez-Cuesta e outros (2001) relataram aumento de 35% de nitrogênio não protéico após 42 dias de maturação em queijo contendo cultura produtora de bacteriocina. Oumer e outros (2001b) observaram aumento de 41% na proteólise de queijo Hispânico adicionado de *E. faecalis* produtor de bacteriocina após 25 dias de maturação.

Garde e outros (2002) obtiveram aumento de 19, 34 e 48% na proteólise de queijo Hispânico, após 7, 15 e 25 dias de maturação, utilizando *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de bacteriocina como adjunta. Ávila e outros (2005a) utilizando o teste OPA, verificaram proteólise 49% maior em queijos contendo *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de bacteriocina.

Sarantinopoulos e outros (2002a) verificaram aumento na proteólise (nitrogênio solúvel em água / nitrogênio total) em queijo feta produzido com *E. faecium* FAIR-E 198.

Os valores encontrados foram 6,3 e 10,3% maiores no queijo com cultura adjunta em relação ao queijo controle após 15 e 30 dias respectivamente.

4. Referências bibliográficas

ABEE, T. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organism. **FEMS Microbiology Letters**, v.129, p.1-10, 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. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.60, p.1962-1968, 1994.

ACHEMCHEM F.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; ABRINI J.; VALDIVIA E.; MAQUEDA, M. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat´s cheese made in Morocco. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.141-150, 2005.

ACHEMCHEM, F., ABRINI, J., MARTINEZ-BUENO, M., VALDIVIA, E., MAQUEDA, M. Control of *L. monocytogenes* in Goat's milk e Goat's Jben by the bacteriocinogenic *E. faecium* F58 strain. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2370-2376, 2006.

ADAMS, M. R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **Journal of Biotechnology**, v.68, p.171-178, 1999.

ALVARADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; MARTIN, S. E.; REGALADO, C. Anti-*Listeria monocytotgenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. **Current Microbiology**, v.51, p.110-115, 2005.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v.17, p.454-461, 2006.

AREAL, M. F. T., MONTEIRO, E. B., BERES, C., LEITE, S. G. F., MIGUEL, M. A. L. Emprego de BAL bacteriocinogênicas na produção e na inibição de *S. aureus* em queijo minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. Anais... CD-ROM, 2006.

AUCHER, W.; LACOMBE, C.; HÉQUET, A.; FRÈRE, J.; BERJEAUD, J. M. Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.2218-2223, 2005.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Effect of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bactéria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, p.1026-1033, 2005.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p.145-153, 2005.

AYAD, E. H. E.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from tradicional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v.21, p.715-725, 2004.

AYMERICH, T.; HOLO, H.; HAVARSTEIN, L. S.; HUGAS, M.; GARRIGA, M.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.62, p.1676-1682, 1996.

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

BENKERROUM, N.; OUBEL, H.; ZAHAR, M.; DLIA, S.; FILALI-MALTOUF, A. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subps. *Lactis* and application to

control *Listeria monocytogenes* in Moroccan Jben. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.960-969, 2000.

BENNIK, M. H. J.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.63, p.2074-2076, 1997.

BERNBOM, N., LICHT, T. R., SAADBYE, P., VOGENSEN, F. K., NORRUNG, B. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.10-14, 2006.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Industrial Microbiology**, v.2, p.319-322, 1987.

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.25-33, 1991.

BREUKINK, E.; Wiedemann, I.; van Kraaij, C.; Kuipers, O.P.; Sahl, H.G.; de Kruijff, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, v.286, p.2361-2364, 1999.

BRITISH COLUMBIA CENTER FOR DISEASE CONTROL- BCCDC. **Milk safety notes**, 2002. Disponível em: <http//www.bccdc.org/content.php?item=145>. Acesso em: 26 jul. 2004.

BUYONG, N.; KOK, J.; LUCHANSKY, J. B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM 217 to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.64, p.4842-4845, 1998.

CARMO, L S. Casos de intoxicação alimentar por toxinas estafilocócicas. In: **Seminário de Segurança dos Alimentos**. Vassouras, 2004. CD-ROM. Produzido por SENAI-RJ

CARVALHO, J. D. G; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, p.262-267, 2007.

CASSALTA, E.; ZENNARO, R. Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. **Science Aliments**, v.17, p.79-94, 1997.

CHEN, Y.; MONTVILLE, T. J. Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.684-690, 1995.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel séc-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, 4321-4330, 1997.

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

COLE, A. M.; WEISS, P.; DIAMOND G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. **Journal Biology Chemistry**, v.272, p.12008-12013, 1997.

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

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

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

DAKO, E.; EL-SODA, M.; VUILLEMARD J. C.; SIMARD, R. E. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. **Food Research International**, v.28, n.5, p.503-509, 1995.

DAVIES, E. A.; ADAMS, M. R. Resistance of *Listeria Monocytogenes* to the bacteriocina nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, n.4, p.341-347, 1994.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters Applied Microbiology**, v.24, p.343-346, 1997.

DE VUYST, L.; VANDAMME E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. 539p.

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

DIAZ, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; FERNÁNDEZ, M.; SOLER-GONZÁLEZ, A. S.; RAMÍREZ-RODRIGO, H.; MAQUEDA, M. Characterization of a new operon as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.69, p.1229-1236, 2003.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.70, n.2, p.564-582, 2006.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; NASIS, P.; GALIOTOU, M.; METAXOPOULOS, J. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.1314-1323, 2006.

ELOTMANI, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; ASSOBHEI, O.; MILLIÉRE, J. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan tradicional fermented milk. **Current Microbiology**, v.44, p.10-17, 2002.

ENAN, G. Control of the regrowing bateriocin resistant variants of *Listeria monocytogenes* LMG 10470 in vitro and in food by nisin-plantaricin UG1 mixture. **Biotechnology**¸v.5, n.2, p.143-147, 2006.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; ASSOBHEI, O.; HASSELMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.521-526, 1998b.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O.; DORSSELAER, A. V.; BRINGEL, F.; HUBERT, J. C.; HASSELMANN, C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4381-4387, 1996.

ENNAHAR, S.; ASSOBHEI, O.; HASSELMANN, C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE92 a pediocin AcH producer. **Journal of Food Protection**, v.61, n.2, p.186-191, 1998a.

ENNAHAR, S.; DESCHAMPS, N. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enteroccoccus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.449-457, 2000a.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins; biosynthesis, struture and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.85-106, 2000b.

ESPER, L. M. R., ROSA, V. P., ROSSI, P., SANT'ANA, A. S., KUAYE, A. Y., VIOTTO, W. H. Efeito da adição de culturas protetoras (Holdbac) sobre *Listeria monocytogenes* inoculadas na superfície de ricota. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. Anais... CD-ROM, 2006.

FARIAS, M. E., NUNEZ DE KAIRUZ, M., SESMA, F., PALACIOS, J., DE RUIZ-HOLGADO, A., P., OLIVER, G. Inhibition of *L. monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. **Milchwissenschaft**, v.54, p.30-32, 1999.

FIMLAND, G.; EIJSINK, V. G. H.; NISSEN-MEYER, J. Comparative studies of imunity proteins of pediocin-like bacteriocins. **Microbiology**, v.148, p.3661-3670, 2002.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; AXELSSON. L.; BRURBERG, M. B.; NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H.; NISSEN-MEYER, J. A C-terminal dissulfide bridge in pediocin-like bactreiocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.2643-2648, 2000.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; DALHUS, B.; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class Iia bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, struture and mode of action. **Journal of Peptides Science**, v.11, p.688-696, 2005

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocina produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.255-270, 1996.

FRANZ, C. M. A. P.; van BELKUM, M. J.; WOROBO, R. W.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterizaton of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. **Microbiology**, v.146, p.621-631, 2000.

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

GANZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, p.207-217, 1999.

GARCÍA, M. T.; CAÑAMERO, M. M.; LUCAS, R.; NABIL BEN OMAR, PULIDO, R. P.; GÁLVEZ A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.161-170, 2004.

GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. **Biotechnology Letters**, v.19, p.1011-1014, 1997.

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

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.84, p.577-592, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dary products. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.215-222, 2003.

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

GONZALES, C. F.; KUNKA, B. S. Plasmid associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.53, p.2534-2538, 1987.

GRAVESEN, A.; AXELSEN, A. M. J.; SILVA, J. M.; HANSEN, T. B.; KNOCHEL, S. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.68, p.756-764, 2002.

HAMAMA, A.; EL-HANKOURI, N.; EL-AYADI, M. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dary Journal**, v.12, n.11, p.933-938, 2002.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P., KLAENHAMMER, T. R. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A and UAL 500 to nisin. **Journal of Food Protection**, v.54, p.836-840, 1991.

HECHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**, v.84, p.545-557, 2002.

HERNANDEZ, P. E.; RODRIGUEZ, J. M.; CINTAS, L. M.; MOREIRA, W. L.; SOBRINO, O. J.; FERNANDEZ, M. F.; SANZ, B. Utilizacion de bactérias lácticas em el control de microorganismos patógenos de los alimentos. **Microbiologia SEM**, v.9, p.37-48, 1993.

HOFFMANN, A.; SCHNEIDER, T.; PAG, U.; SAHL, H. G. localization and functional analysis of Pep I, the immunity peptide of Pep 5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.70, p.3263-3271, 2004.

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

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.1537-1542, 1998.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; AYMERICH, M. T.; MONFORT, J. M. Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. **Food Microbiology**, v.19, p.519-528, 2002.

HUHNE, K.; AXELSSON, L.; HOLCK, A.; KROCKEL, L. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sake* strains. **Microbiology**, v.142, p.1437-1448, 1996.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A. L.; DAVDSON, P. M. Ed. **Antimicrobial in Foods**. Marcel Deckker Inc., New York, EUA, 1983. p.327-351

JARVIS, B.; JEFFCOAT, J.; CHEESEMAN, G. C. Molecular weight distribuition of nisin. **Biochemical Biophysiologie Acta**, v.168, p.153-155, 1968.

KAISER, A. L.; MONTVILLE, T. J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characteriozation of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. **Applied and and Enviromental Microbiology**, v.62, p.4529-4535, 1996.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leuwenhoek**, v.49, p.209-224, 1983.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.2. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1986. p.1209-1234.

KAWAI, Y.; ISHII, Y.; ARAKAWA, K.; UEMURA, K.; SAITOH, B.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; TATENO,Y.; ITOH, T.; SAITO, T. structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. **Applied and and Enviromental Microbiology**, v.70, p.2906-2911, 2004.

KEMPERMAN, R.; KUIPERS, A.; KARSENS, H.; NAUTA, A.; KUIPERS, O.; KOK, J. Identification and characteriozation of two novel clostricidal bacteriocins, circularin A and clostricin 574. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.69, p.1589-1597, 2003.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, v.12, p.39-85, 1993.

KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L. E. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. **Peptides**, v.22, p.1579-1596, 2001.

LAI, A.C. TRAN, S.; SIMMONDS, R. S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.215, p.133-138, 2002.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, v.16, p.93-99, 1999.

LAUKOVA, A.; VLAEMYNCK, G.; CZIKKOVA, S. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. **Folia Microbiologica**, v.46, n.2, p.157-160, 2001.

LEROY, F.; DE VUYST L. The presence of salt and a curingagent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potencial starter culture for sausage fermentation. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 65, p.5350-5356, 1999.

LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.235-240, 2003.

LI, J.; CHIKINDAS, M. L.; LUDESCHER, R. D.; MONTVILLE, T. J. Temperature and surfactant-induced membrane modifications that alter *Listeria monocytogenes* nisin sensitivity by different mechanisms. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 68, p.5904-5910, 2002.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1854-1857, 2003.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science Supplement**, v.87, p.E6-E11, 2004.

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

MAISNIER-PATIN, S., DESCHAMPS, S. N., TATINI, S. R., RICHARD, J. Inhibition of *L. monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. **Lait**, v.72, p.249-263, 1992.

MAISNIER-PATIN, S.; TATINI, S. R.; RICHARD, J. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in milk. **Lait**, v.75, p.81-91, 1995.

MANTOVANI, H. C.; RUSSEL, J. B. Nisin resistance of *Sreptococcus bovis*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.67, p.808-813, 2001.

MARTINEZ-CUESTA, M. C.; REQUENA, T.; PELAEZ, C. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripenig. **International of Journal Food Microbiology**, v.70, p.79-88, 2001.

MCKAY, A. M. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* against *Listeria* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.15-17, 1990.

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

MING, X.; DAESCHEL, M. A. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistence responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, v.56, p.944-948, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5mg/kg. **Diário Oficial**, Brasília, 23 jan. 1996. Seção 1.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilizacao no processamento de queijo minas frescal**. 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAM, T. M.; VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.1, p.73-84, 2002.

MULDERS, J. W.; BOERRIGTER, I. J.; ROLLEMA, H. S.; SIEZEN, R. J.; DE VOS, W. M. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. **European Journal of Biochemistry**, v.201, p.581-584, 1991.

MUÑOZ, A., MAQUEDA, M., GÁLVEZ, A., MARTINÉZ-BUENO, M., RODRIGUEZ, A., VALDIVIA, E. Biocontrol of psychrotrophic enteroxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard cheeseby na enterococcal strain-producing enterocin AS-48. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1517-1521, 2004.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection,** Suppl., v.56, p.54-63, 1996.

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

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. (Ed.) **Cell-cell signalling in bacteria**. Washinton: American Society for Microbiology , 1999. p.175-192.

NILSEN, T.; NES, I. F.; HOLO, H. Na exported inclucer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1848-1854, 1998.

NISSEN-MEYER, J.; HAUGE, H. H.; FIMLAND, G.; EIJSINK, V. G. H.; NES, T. F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides by lactic acid bacteria: their function, struture, biogenesis and their mechanism of action. **Recent Research Developments in Microbiology**, v.1, p.141-154, 1997.

NUNEZ, M., RODRIGUEZ, J. L., GARCIA, E., GAYA, P., MEDINA, M. Inhibition of *L. Monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.671-677, 1997.

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

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

PARENTE, E.; HILL,C. Characteriozation of enterocin 1146, a bacteriocina from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.55, p.497-502, 1992.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; TEIXEIRA, I. S. C.; LIMA, S. I.; CARNICEL, F. A.; HOFFMAN, F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocoridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003 na região de São José do Rio Preto. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.232-237, 2004.

PHILLIPS, J. D.; GRIFFTHS, M. W.; MUIR, D. D. Effect of nisin on the shelf-life of pasteurized doble cream. **The Journal of the Society of the Dairy Technology**, v.36, n.1, p.17-21, 1983.

QUADRI, L. E. N.; KLEEREBEZEM, M.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W. M.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.6163-6171, 1997.

RATTANACHAIKUNSOPON, P. PHUMKHACHORN, P. Isolation and preliminary characterization of a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from Nham, a tradicional thai fermented pork. **Journal of Food Protection**, v.69, n.8, p.1937-1943, 2006.

RAY, B. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative: an overview. In: RAY, B.; DAESCHEL, M. (Ed.). **Food Biopreservatives of Microbial Origin**. Boca Raton: CRC Press, 1992.

REEVES, P. The bacteriocins. In: KLEINZELLER, A.; SPRINGER, G. F.; WITTMANN, H. G. (Ed.). **Molecular Biology Biochemistry and Biophisics**. New York: Springer-Verlag, 1972, p.115.

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

ROBERTS, R. F, ZOTTOLA, E. A., MCKAY, L. L. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2353-2363, 1992.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Food Science Technology**,v.12, p.276-284, 2001.

RODRIGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Behaviour of *S.* aureus in semi-hard cheese made with raw milk with nisin´producing starter cultures. **International Dairy Journal**, v.15, p.51-57, 2000.

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

RODRIGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUES, J. L.; RODRIGUEZ, J. M.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, v.15, p.51-57, 2005.

ROGERS, A. M.; MONTVILLE, T. J. Quantification of factors which influence nisin's inhibition of *Clostridium botulinum* 56A in a model food system. **Journal of Food Science**, v.59, n.2, p.1-7, 1994.

ROSSLAND, E.; BORGE, G. I. A.; LANGSRUD, T.; SORHAUG, T. Inhibition of *Bacillus cereus* by srtains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, p.205-212, 2003.

RYAN, M. P.; ROSS, R. P.; HILL, C. Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lacticin 3147 producing and resistant cultures. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.67, p.2699-2704, 2001.

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

SÃO PAULO. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Dados de surtos de DTA notificados por DIR e municípios em 2002**. Disponível em :<http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/Surtos_DTA02.ppt>. Acesso em: 26 jul. 2004.

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

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.93-105, 2002a.

SARANTINOPOULOS, P.;LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.125-136, 2002b.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Science and technology**, v.7, p.158-164, 1996.

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *S. faecalis* and *S. faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *E. faecalis* comb. nov. and *E. faecium* comb. nov. **International Journal Systematic Bacteriologycal**, v.34, p.31-34, 1984.

STEIN, T.; HEINZMANN, S.; DUSTERHUS, S.; BORCHERT, S.; ENTIAN, K.D. expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spall-FEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO 1099. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.822-828, 2005.

STEVENS, K. A.; SCHELDON, B. W.; KLAPES, N. A.; KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.57, p.3613-3615, 1991.

SULZER, G., BUSSE, M. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitiory substances. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.287-296, 1991.

UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. Center for Disease Control. Outbreak of listeriosis associated with homemade mexican-style cheese – North Carolina, October 2000 – January 2001. **MMWR**, v.50, n.26, p560-562, 2001. Disponível em : <http//www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5026a3.htm>. Acesso em 28 jul. 2004

VADYVALOO, V.; AROUS, S.; GRAVESEN, A.; HECHARD, Y.; CHAUHAN-HAUBROCK, R.; HASTINGS, J.W.; RAUTENBACH, M. Cell-surface alterations in class Iia bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. **Microbiology**, v.150, p.3025-3033, 2004.

VADYVALOO, V.; HASTINGS, J.W.; van der MERWE, M. J.; RAUTENBACH, M. Membranes of class Iia bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and snort-acyl-chain phosphatidylglycerols. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.68, p.5223-5230, 2002.

van der MEER, J. R.; POLMAN, J.; BEERTHUYZEN, M. M.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. P.; de VOS, W. M. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes

nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.2578-2588, 1993.

van SCHAIK, W.; GAHAN, C. G.; HILL, C. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance agaisnt the lantiobiotics nisin and lacticin 3147. **Journal of Food Protection**, v.62, p.536-539, 1999.

VIGNOLO, G. M.; DE KAIRUZ, M. N.; DE RUIZ HOLGADO, A. A. P.; OLIVER, G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.5-10, 1995.

VIGNOLO, G.; PALACIOS, J.; FARÍAS, M. E.; SESMA, F.; SCHILLINGER U.; HOLZAPFEL, W.; OLIVER, G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. **Current Microbiology**, v.41, p.410-416, 2000.

VILLANI, F.; COPPOLA, S. Slection of enterococcal strains for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. **Annual Microbiology Enzimology**, v.44, p.97-105, 1994.

XIE, L.; van der DONK, W. A. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. **Current. Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.498-507, 2004.

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

YANG, R.; RAY, B. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic leuconostocs associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. **Journal of Food Protection**, v.57, p.209-217, 1994.

ZOTTOLA, E. A.; YEZZI, T. L.; AJAO, D. B.; ROBERTS, R. F. Utilization of Cheddar cheese containing nisin as na antimicrobial agent in other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.227-238, 1994.

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS DE DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS POR *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 E O EFEITO DESTES COMPOSTOS SOBRE *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* E *Staphylococcus aureus*

Resumo

Até o momento, somente a nisina, produzida por determinadas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis,* vem sendo utilizada comercialmente como conservante natural em produtos lácteos. Entretanto, tem-se verificado que outras bacteriocinas, como pediocinas e enterocinas, também apresentam potencial de aplicação como aditivo alimentar para o controle de microrganismos indesejáveis, principalmente *Listeria* sp. Neste trabalho, foi determinado o espectro de atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* ALC 01*, Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 contra 25 linhagens de *Bacillus cereus*, 10 de *Listeria monocytogenes* e 5 de *Staphylococcus aureus*. Além de caracterizar o desenvolvimento e produção destas bacteriocinas em caldo MRS e leite desnatado. Inicialmente, *E. faecium* FAIR-E 198 foi caracterizado como uma cultura não patogênica. As bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 promoveram forte inibição (halos de 5 a 13mm de diâmetro) de todas as linhagens de *L. monocytogenes* avaliadas, enquanto a nisina foi capaz de inibir 80% destas culturas (halos de 2 a 4mm) e 2 das 5 linhagens de *S. aureus* (halos de 4mm). Todas as 25 linhagens de *B. cereus* apresentaram resistência a estas bacteriocinas pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços. *Lb. plantarum* ALC 01 foi a cultura que apresentou maior atividade de bacteriocina em ambos os meios de cultivo avaliados, seguida por *E. faecium* FAIR-E 198 e por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. A pediocina AcH e a enterocina FAIR-E 198 apresentaram espectro de ação restrito a *L. monocytogenes*, enquanto a nisina apresentou uma ação mais ampla, porém com menor atividade. Além disso, as três culturas

bacteriocinogênicas apresentaram comportamento distinto em relação ao desenvolvimento e produção de bacteriocinas em caldo MRS e em leite.

1. INTRODUÇÃO

As bacteriocinas são compostos protéicos sintetizados no ribossomo e liberados no meio de desenvolvimento bacteriano que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre outras espécies ou linhagens (TAGG et al., 1976). Estes compostos são produzidos tanto por microrganismos Gram-positivos quanto por Gram-negativos, incluindo vários gêneros de bactérias lácticas, dentre eles, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Carnobacterium*. Muitas bacteriocinas são ativas contra importantes microrganismos patogênicos de veiculação alimentar, tais como *Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (CONVENTRY et al., 1997; FRANZ et al., 1996; HERNÁNDEZ, CARDELL E ZARATE, 2005). Por este motivo, observa-se crescente interesse da indústria de alimentos sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos.

Atualmente, as bacteriocinas são classificadas em três ou quatro classes de acordo com suas características bioquímicas (CLEVELAND et al., 2001; KLAENHAMMER, 1993). A classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, é constituída por pequenos peptídeos (<5kDa) termoestáveis que contém em sua estrutura lantionina e derivados. A classe II também é composta por pequenos peptídeos (<10kDa) termoestáveis, os quais estão subdivididos nas subclasses: IIa conhecida pela expressiva ação contra *Listeria* sp. e composta por pediocinas, algumas enterocinas, sakacina G e lactococcina MMFII (FERCHICHI et al., 2001); IIb que inclui as bacteriocinas que necessitam da associação de dois diferentes peptídeos para obter maior atividade, como lactocina G e lacticina F e IIc (lactacina B). A Classe III é representada por peptídeos de alto peso molecular (>30kDa), termolábeis, como helveticina J e enterolisina A. Na Classe IV encontram-se os grandes complexos peptídicos que contém carboidrato ou lipídio em sua estrutura, contudo Cleveland e outros (2001) ressaltaram que estes compostos possam ser artefatos derivados das etapas de purificação parcial das bacteriocinas.

Dentre todas as bacteriocinas, a mais conhecida e estudada há mais de 50 anos é a nisina, produzida por inúmeras linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis.* Considerada uma substância segura e não tóxica, sua DL_{50} é similar a do cloreto de sódio, 3.330.000UI/kg (FRAZER et al., 1962). Possui a condição de GRAS (substância geralmente considerada segura) atribuída pela "Food and Drug Administration" (FDA, 1988). Esta bacteriocina tem sido empregada, em larga escala na indústria de alimentos de vários países, como agente antibotulínico em queijos e ovo líquido, além de molhos e alimentos enlatados (DELVES-BROUGHTON, 1990). Ademais, apresenta amplo espectro antimicrobiano com ação sobre microrganismos patogênicos, dentre os quais, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, além de diferentes espécies de bactérias lácticas (BENKERROUM et al., 2002; CONVENTRY et al.,1997; MILLETTE et al., 2004; RILLA et al., 2004).

As pediocinas apresentam efeito antagônico sobre microrganismos deteriorantes e patogênicos, incluindo *L. monocytogenes, S. aureus* e *Clostridium perfringens* (BHUNIA et al., 1988). Dentre os diferentes tipos de pediocinas, tem-se reportado a produção de pediocina AcH por *Pediococcus acidilactici* ou *Lactobacillus. plantarum*, microrganismos comumente utilizados na fermentação de carnes e vegetais. Entretanto, *Lb. plantarum* também constitui parte da microbiota natural do leite, participando da maturação de vários tipos de queijos como microbiota secundária. A sensibilidade de 12 linhagens de *L. monocytogenes* à pediocina AcH produzida por *Lb. plantarum* ALC01 foi observada por Loessner e outros (2003).

As enterocinas produzidas por *Enterococcus faecium* apresentam um interessante potencial tecnológico (GIRAFFA, 1995). Estudos *in vitro* sobre a produção e o espectro de ação destas bacteriocinas têm sido relatados na literatura. Leroy e outros (2003) observaram uma forte ação inibitória de bacteriocina de *E. faecium* sobre *Listeria* sp. e limitado antagonismo sobre bactérias lácticas, enquanto Alvarado e outros (2005), além de *L. monocytogenes*, observaram ação antimicrobiana deste composto sobre *S. aureus*.

A afirmação da nisina como GRAS, o aumento do interesse sobre microrganismos patogênicos, bem como o isolamento de bactérias lácticas com capacidade listericida de alimentos são fatores que contribuem para aumentar os esforços na pesquisa de novas

bacteriocinas com potencial antimicrobiano sobre *L. monocytogenes* e outros patógenos. O objetivo deste estudo foi determinar o espectro de atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01*, E. faecium* FAIR-E 198 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 contra linhagens de *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Além disso, caracterizar o desenvolvimento e produção destas bacteriocinas em meio de cultivo e em leite desnatado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos

As culturas bacteriocinogênicas *Lactobacillus plantarum* ALC 01, produtora de pediocina AcH e isolada de queijo Munster (ENNAHAR et al., 1996), *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, produtora de enterocina e isolada de queijo Feta (ACA-DC 1618, Universidade de Agricultura de Atenas, Atenas, Grécia) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, produtora de nisina (BCCM-LMG Bacteria Collection, Gent, Bélgica) foram mantidas a 4ºC em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA).

Os microrganismos patogênicos foram fornecidos pelo Banco de Culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ). Foram avaliadas 10 linhagens de *Listeria monocytogenes,* 5 de *Staphylococcus aureus* e 25 de *Bacillus cereus*, conforme descrito na **Tabela 1**. Estas culturas foram mantidas a 4ºC em ágares inclinados: *L. monocytogenes* em ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Difco, Sparks, EUA), *S. aureus* em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) e *B. cereus* em ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA). Todas as linhagens de *S. aureus* e *B. cereus* são reconhecidamente produtoras de toxinas, conforme informação dos fornecedores.

Para a realização dos testes, todas as culturas foram propagadas duas vezes em meio de cultivo adequado para cada espécie e incubadas de acordo com as condições de desenvolvimento apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Descrição e condições de desenvolvimento dos microrganismos patogênicos.

Microrganismos	Linhagem	Origem	Condições de desenvolvimento
Listeria monocytogenes	IOC[1] 1324	Embutido frescal	TSB-YE[4] 16h/35°C
	IOC 1359	Queijo artesanal	
	IOC 1551	Bacon	
	IOC 1527; IOC 1630	Carne cozida congelada	
	IOC 1898	Espinafre	
	ATCC[2] 19111	Ave	
	ATCC 19115	Amostra clínica	
	ATCC 7644	Amostra clínica	
	SCOTT A	Amostra clínica	
Staphylococcus aureus	ATCC 8095	Torta de creme	TSB[5] 16h/35°C
	ATCC 13565	Presunto	
	ATCC 19095	Amostra clínica	
	ATCC 27154	Carne de Peru	
	ATCC 27664	Carne de Frango	
Bacillus cereus	ATCC 14579	Não mencionada	TSB 16h/30°C
	K1[3]-B010; K1-B016; K1-B020	Queijo Minas Frescal	
	K1-B021; K1-B025; K1-B037	Queijo Minas Frescal	
	K1-B040; K1-B041; K1-B043	Queijo Minas Frescal	
	K1-B048; K1-B050; K1-B069	Queijo Minas Frescal	
	K1-B070; K1-B071; K1-B072	Queijo Minas Frescal	
	K1-B074; K1-B097; K1-B098	Queijo Minas Frescal	
	K1-B128; K1-B129; K1-B130	Queijo Minas Frescal	
	K1-B131; K1-B132; K1-B146	Queijo Minas Frescal	

[1] IOC: Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro-RJ;
[2] ATCC: American Type Culture Collection, MD, EUA;
[3] K1: Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP;
[4] TSB-YE: Caldo tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura;
[5] TSB: Caldo tripticase de soja.

2.2. Determinação do potencial de patogenicidade de *E. faecium* FAIR-E 198

2.2.1. Atividade de hemolisinas

A cultura *E. faecium* FAIR-E 198 foi inoculada, em forma de estrias, na superfície de ágar BHI (Difco, Sparks, EUA) suplementado com 5% de hemácias de carneiro desfibrinadas e incubada a 37ºC/48h. A formação de halos de hemólise ao redor das colônias era indicativo de reação positiva. Como controle positivo e controle negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 27154 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, respectivamente (BROLAZO, 2003).

2.2.2. Produção de gelatinase

A cultura *E. faecium* FAIR-E 198 foi inoculada em ágar gelatina nutriente (Difco, Sparks, EUA) e incubada a 21ºC/7dias. A liquefação do meio era indicativa de reação positiva para gelatinase. Foi utilizado *B. cereus* K1-B010 como controle positivo (BROLAZO, 2003).

2.2.3. Atividade de termonucleases

Em placas de petri contendo ágar Bacto-DNAse Test (Difco, Sparks, EUA) suplementado com 0,83% de azul de toluidina 1% (Sigma, St. Louis, EUA) foram feitos três orifícios de 5mm, onde foram inoculados 50µl da cultura *E. faecium* FAIR-E 198 ativa em caldo MRS (Difco, Sparks, EUA), previamente submetida a 100ºC/15min em banho-maria. A presença de zonas de coloração rosa ao redor dos poços, após incubação a 37ºC/24h, era indicativa de resultado positivo (BROLAZO, 2003).

2.3. Determinação do espectro de atividade antimicrobiana

A sensibilidade dos microrganismos patogênicos às bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 foi avaliada pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços adaptado de Tagg e Mcgiven (1971). Foi utilizado ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA) semi-

sólido (0,9% ágar) previamente inoculado com 1%(0,2ml) dos cultivos de *B. cereus* e *S. aureus* (10^6- 10^7 UFC/ml) e ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar) inoculado com 1% (0,2ml) dos cultivos das linhagens de *L. monocytogenes* (10^6- 10^7 UFC/ml), aos meios foi adicionado 2% de β-glicerofosfato de sódio (Sigma, St Louis, EUA) (KOJIC et al., 1991).

Em cada placa, contendo os ágares previamente inoculados com os patógenos, foram feitos três orifícios de 5mm de diâmetro, onde foram depositadas alíquotas de 50µl dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas. Após incubação a 35ºC por 24h, os meios foram analisados quanto à presença de halos de inibição ao redor dos orifícios.

Os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação (7500g/15min a 4ºC) (Centrífuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA) dos cultivos das culturas bacteriocinogênicas. Em seguida, o pH destes foi corrigido para 6,5 com NaOH 1N (Merck, Darmstadt, Alemanha) e então os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) (MORENO, 1995). Os testes foram realizados em triplicata.

2.4. Características de desenvolvimento e produção de bacteriocinas por *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 E *Lc. lactis* subsp. lactis ATCC 11454 em caldo MRS e em LDR 10%.

Os cultivos ativos das culturas bacteriocinogênicas foram centrifugados a 7.500g por 15min a 4ºC (Centrifuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA). Os sobrenadantes foram descartados e as biomassas obtidas foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,0 e ressuspensas em 1ml de solução aquosa peptonada 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas nesta mesma solução, com o objetivo de obterem-se suspensões de células contendo aproximadamente 10^5 – 10^6 UFC/ml. Estas concentrações microbianas foram previamente determinadas por contagem em placa, utilizando ágar MRS (Difco, Sparks, EUA).

As suspensões celulares das culturas bacteriocinogênicas (1ml) foram inoculadas em porções de 300ml de caldo MRS (Difco, Sparks, EUA) e de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, SP). As amostras inoculadas com *Lc. lactis* subsp. *lactis* foram incubadas a 30ºC e as demais a 37ºC/48h. Foram coletadas amostras dos cultivos em caldo MRS e em LDR 10%, em intervalos regulares de 3h, durante as primeiras 12h e após 24 e 48h de incubação, para determinação da curva de desenvolvimento, variação do pH e produção de bacteriocinas.

A determinação da contagem microbiana foi realizada por plaqueamento em superfície em ágar M17 (Difco, Sparks, EUA) para *Lc. lactis* subsp. *lactis*, com incubação a 30ºC/48h, em ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) para *Lb. plantarum* e em ágar KF *Streptococcus* (Difco, Sparks, EUA) para *E. faecium*, ambos incubados a 37ºC/48h.

A variação do pH foi determinada com o auxílio de pHmetro (Hanna Instruments HI 9110, Singapura).

A produção de bacteriocina foi determinada através do método de diluição crítica, adaptado de Mayr-Harting e outros (1972). Os sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas, preparados conforme descrito no item 2.3, foram diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,0, utilizando placas de microtitulação. Em seguida, 10µl de cada diluição foi depositado sobre placas de TSA-YE (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (10^6- 10^7 UFC/ml) de *L. monocytogenes* Scott A, utilizada como cultura indicadora. As placas foram incubadas a 35ºC/24h. O título de bacteriocina é definido como a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição da cultura indicadora multiplicada por 100 para expressar os resultados como unidades de atividade por mililitro (UA/ml).

3. RESULTADOS

3.1. Potencial de patogenicidade de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198

E. faecium FAIR-E 198 não apresentou atividade de gelatinase, termonuclease e hemolisinas, sendo, portanto, considerado como uma cultura sem potencial de patogenicidade, podendo ser empregada em tecnologia de alimentos, conforme constatado anteriormente por Sarantinopoulos e outros (2002a).

3.2. Espectro de atividade antimicrobiana

Na **Tabela 2** consta os resultados referentes ao espectro de atividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, determinado pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços. Comparando a atividade dos três tipos de bacteriocinas, verifica-se que a enterocina e a pediocina AcH foram as mais efetivas sobre *L. monocytogenes*, promovendo a inibição de 100% das linhagens avaliadas. Destas, a linhagem IOC 1527 foi a mais sensível, com halos de inibição de 13mm de diâmetro para ambas as bacteriocinas, enquanto *L. monocytogenes* Scott A foi a que apresentou maior resistência, com halo de inibição de 5 e 6mm para *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lb. plantarum* ALC 01, respectivamente. As linhagens de *L. monocytogenes* Scott A e ATCC 19115 foram resistentes a nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, enquanto as demais linhagens avaliadas apresentaram menor sensibilidade (halos de inibição entre 2 e 4mm). Com relação às linhagens de *B. cereus,* verifica-se que 100% delas foram resistentes às três bacteriocinas avaliadas pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços. Finalmente, verifica-se que 2 das 5 linhagens de *S. aureus* avaliadas foram sensíveis (halo de inibição de 4mm) à nisina de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e que todas foram resistentes as bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 .

Mediante esses resultados e com o intuito de selecionar linhagens de *B. cereus* com sensibilidade à pelo menos uma das bacteriocinas avaliadas, optou-se por utilizar o método de diluição crítica de Mayr-Harting e outros (1972). Por meio deste método foi possível

identificar três linhagens de *B. cereus* (K1-B010, K1-B040 e K1-B041) sensíveis à nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, com título de 200 UA/ml.

Tabela 2. Espectro antimicrobiano de bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198.

Microrganismos patogênicos	**Atividade[1] das culturas bacteriocinogênicas (mm)**		
	***Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454**	***Lb. plantarum* ALC 01**	***E. faecium* FAIR-E 198**
L. monocytogenes			
IOC 1324	2	12	10
IOC 1359	2	10	10
IOC 1527	2	13	13
IOC 1551	4	10	10
IOC 1630	4	10	10
IOC 1898	4	12	13
ATCC 7644	2	11	10
ATCC 19111	3	12	11
ATCC 19115	0	11	11
Scott A	0	6	5
B. cereus			
K1-B010	0	0	0
K1-B016	0	0	0
K1-B020	0	0	0
K1-B021	0	0	0
K1-B025	0	0	0
K1-B037	0	0	0
K1-B040	0	0	0
K1-B041	0	0	0
K1-B043	0	0	0
K1-B048	0	0	0
K1-B050	0	0	0
K1-B069	0	0	0
K1-B070	0	0	0
K1-B071	0	0	0
K1-B072	0	0	0
K1-B074	0	0	0
K1-B097	0	0	0
K1-B098	0	0	0
K1-B128	0	0	0
K1-B129	0	0	0
K1-B130	0	0	0
K1-B131	0	0	0
K1-B132	0	0	0
K1-B146	0	0	0
ATCC 14579	0	0	0
S. aureus			
ATCC 8095	0	0	0
ATCC 13565	0	0	0
ATCC 19095	0	0	0
ATCC 27154	4	0	0
ATCC 27664	4	0	0

[1] Halo de inibição em milímetro de diâmetro (mm)

3.3. Características de desenvolvimento e produção de bacteriocinas por *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lc. lactis* subsp. lactis *ATCC* 11454 em caldo MRS e em LDR 10%

As **Figuras 1**, **2** e **3** apresentam as curvas de desenvolvimento, de variação do pH e de produção de bacteriocinas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 em caldo MRS durante 48h.

Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454 atingiu população máxima de 8,98 log UFC/ml após 12h, mantendo-se em fase estacionária até 48h. O ΔpH, variação entre o pH inicial (0h) e final (48h) do meio de cultivo, foi de 1,8. A maior atividade de bacteriocina (200UA/ml), determinada sobre *L. monocytogenes* Scott A, foi detectada quando a cultura atingiu população máxima, com redução de 50% (100UA/ml) após 24 h, não sendo mais detectada após 48h (**Figura 1**).

Lb. plantarum ALC 01 apresentou população máxima de 9,43 log UFC/ml após 24h. Em seguida, teve início a fase de declínio e esta população foi reduzida a 6,90 log UFC/ml após 48h. Quanto à variação do pH, foi observada forte acidificação do meio de cultivo a partir de 9h, com pH de 3,85 após 48h. A atividade de pediocina foi detectada após 9h, com título de 100UA/ml, atingindo máximo de 6.400UA/ml no final da fase exponencial. Após 48h, foi observada queda de 80% na atividade desta bacteriocina (**Figura 2**).

Já *E. faecium* FAIR-E 198, apresentou população máxima de 7,90 log UFC/ml após 12h de desenvolvimento, mantendo-se praticamente estável até 24h, porém com redução de 1 log UFC/ml após 48h. A acidificação do meio de cultivo iniciou após 6h de incubação, resultando em pH de 3,72 após 48h. A atividade de bacteriocina foi detectada a partir de 9h (100UA/ml), alcançando atividade máxima (800UA/ml) após 24h e uma queda de 87,5% foi verificada após 48h de incubação (**Figura 3**).

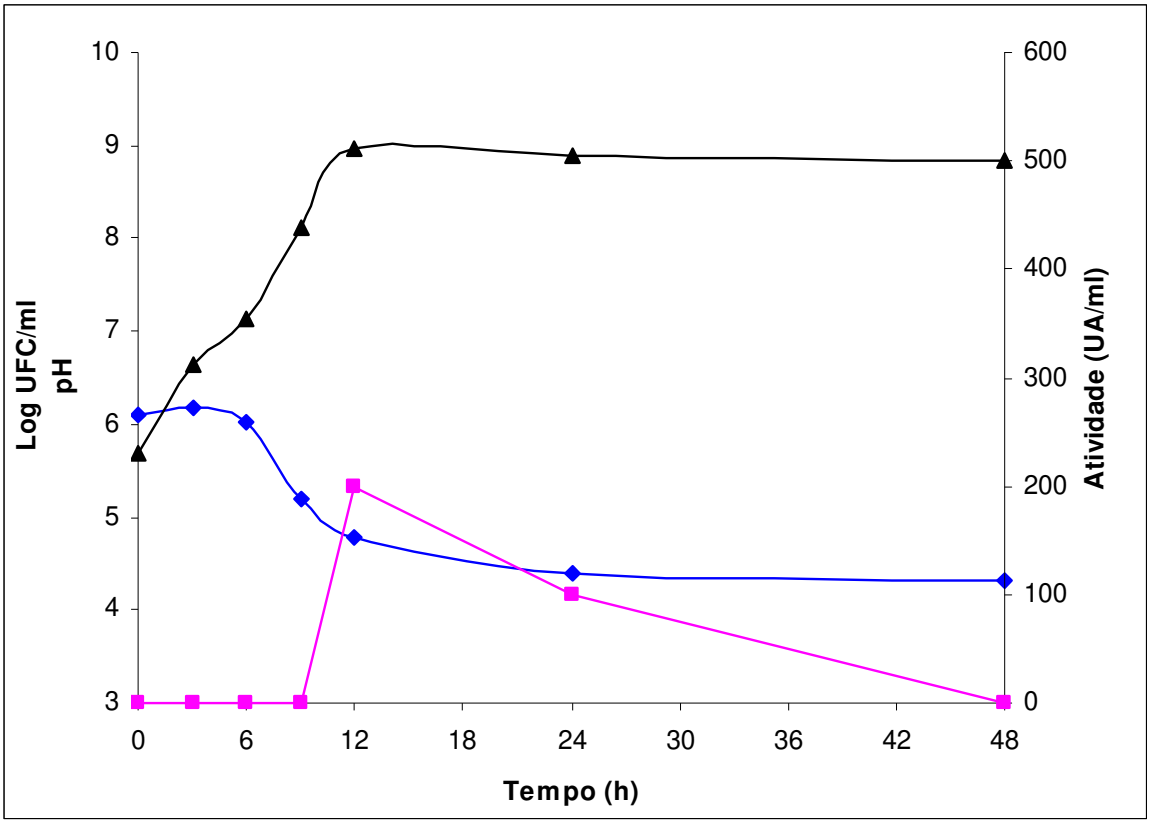

Figura 1. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■) em caldo MRS a 30ºC.

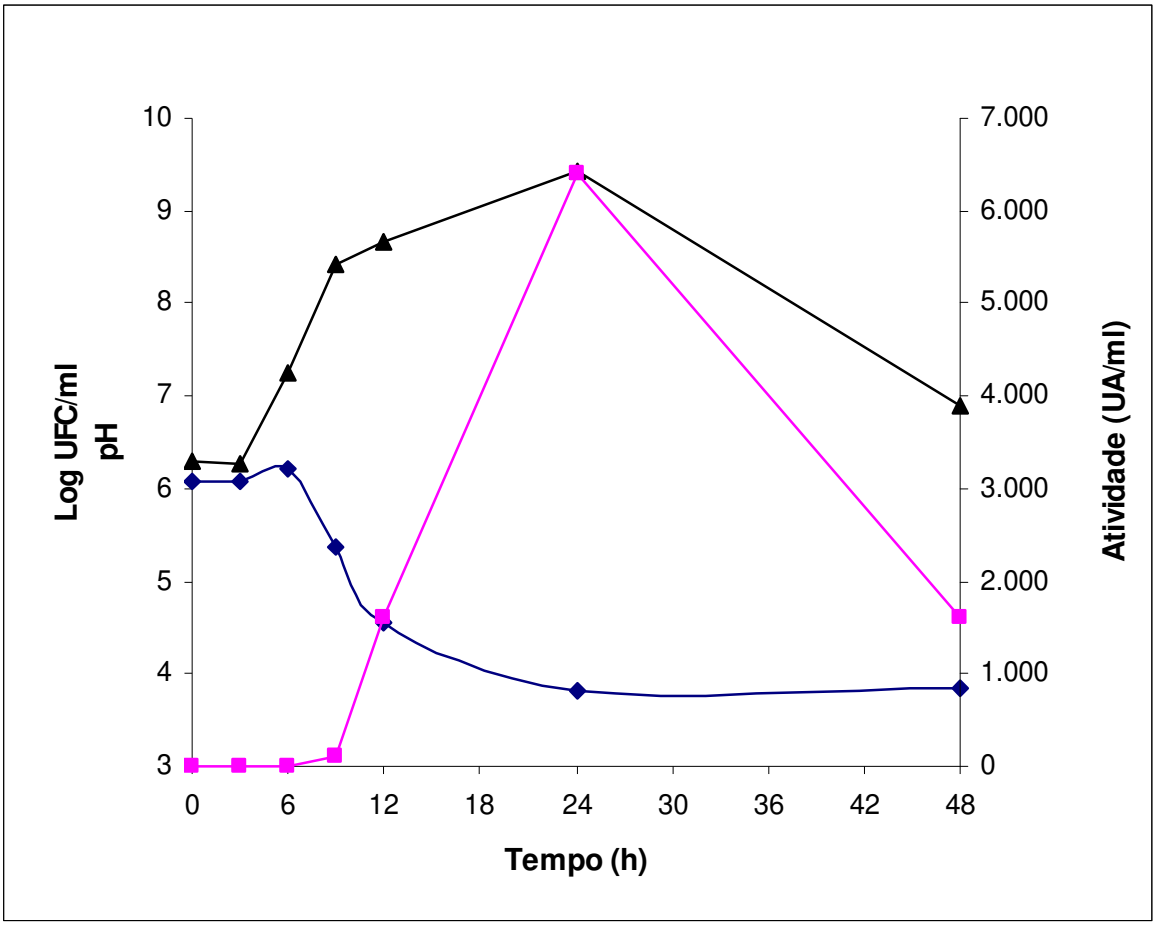

Figura 2. Desenvolvimento *Lactobacillus plantarum* ALC 01 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■) em caldo MRS a 37ºC.

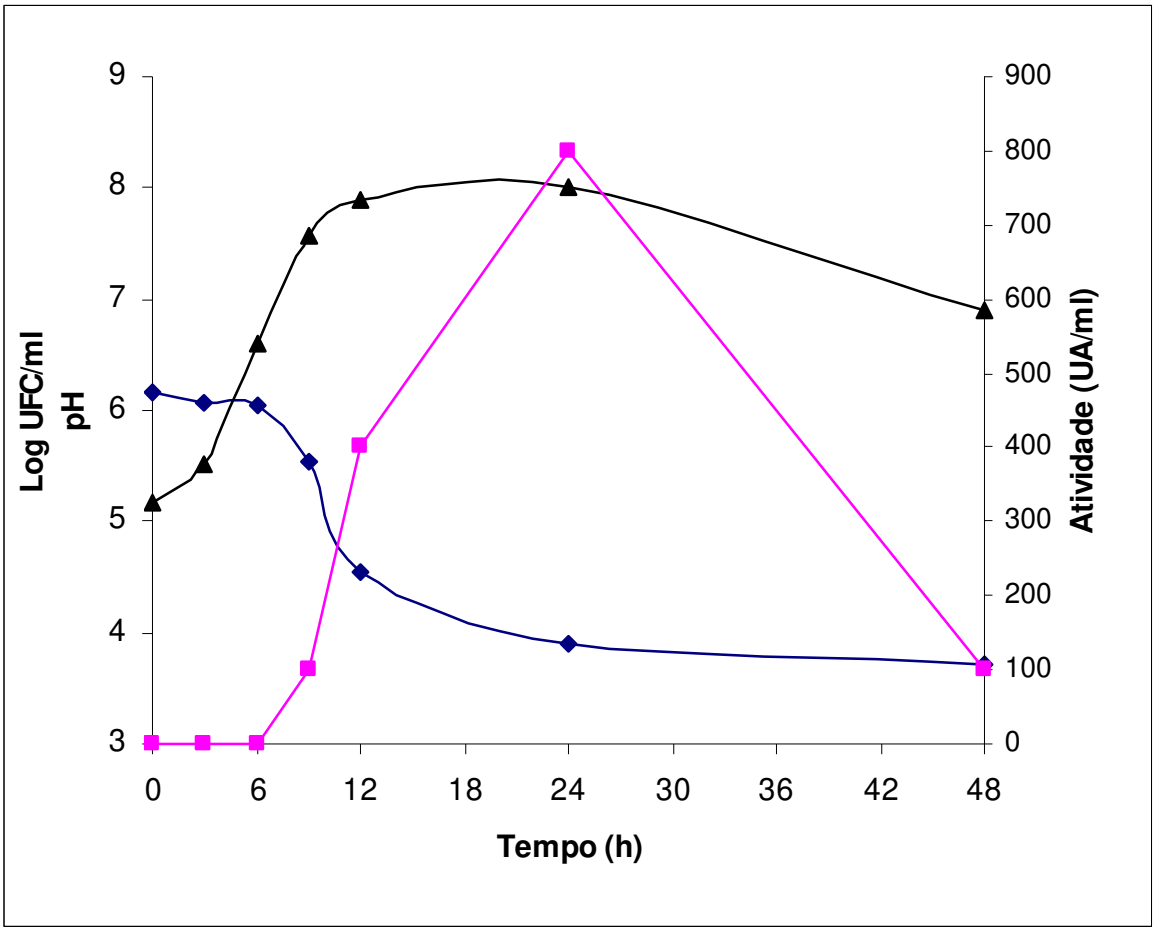

Figura 3. Desenvolvimento de *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■) em caldo MRS a 37ºC.

Nas **Figuras 4**, **5** e **6** são apresentadas as curvas de desenvolvimento, variação do pH e produção de bacteriocina em LDR 10% durante 48h a 30ºC para *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e a 37ºC para *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198.

Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454 apresentou população máxima após 9h (8,54 log UFC/ml), mantendo-se praticamente constante até 48h de incubação. O pH apresentou um pequeno decréscimo, de aproximadamente 0,62, durante todo o período de incubação. A produção de bacteriocina foi observada somente na coleta realizada após 6h de incubação (100UA/ml) (**Figura 4**).

Lb. plantarum ALC 01 apresentou desenvolvimento máximo de 8,26 log UFC/ml, após 12h, permanecendo praticamente constante até 48h. A variação entre o pH inicial e final do leite foi de 1,11. Foi detectada atividade de bacteriocina a partir de 3h de incubação, com título de 100UA/ml e a máxima atividade (400UA/ml) foi obtida após 12h, permanecendo constante até 24h, porém foi verificado queda de 75% na atividade desta bacteriocina após 48h de incubação (**Figura 5**).

E. faecium FAIR-E 198 apresentou máxima população de 8,10 log UFC/ml após 24h, seguido de declínio de aproximadamente 1 log UFC/ml até 48h. Foi observado ΔpH de 1,37 após 48h de incubação em leite. A atividade de bacteriocina foi verificada apenas após 6h (100UA/ml), não sendo detectada até o final do período de incubação (**Figura 6**).

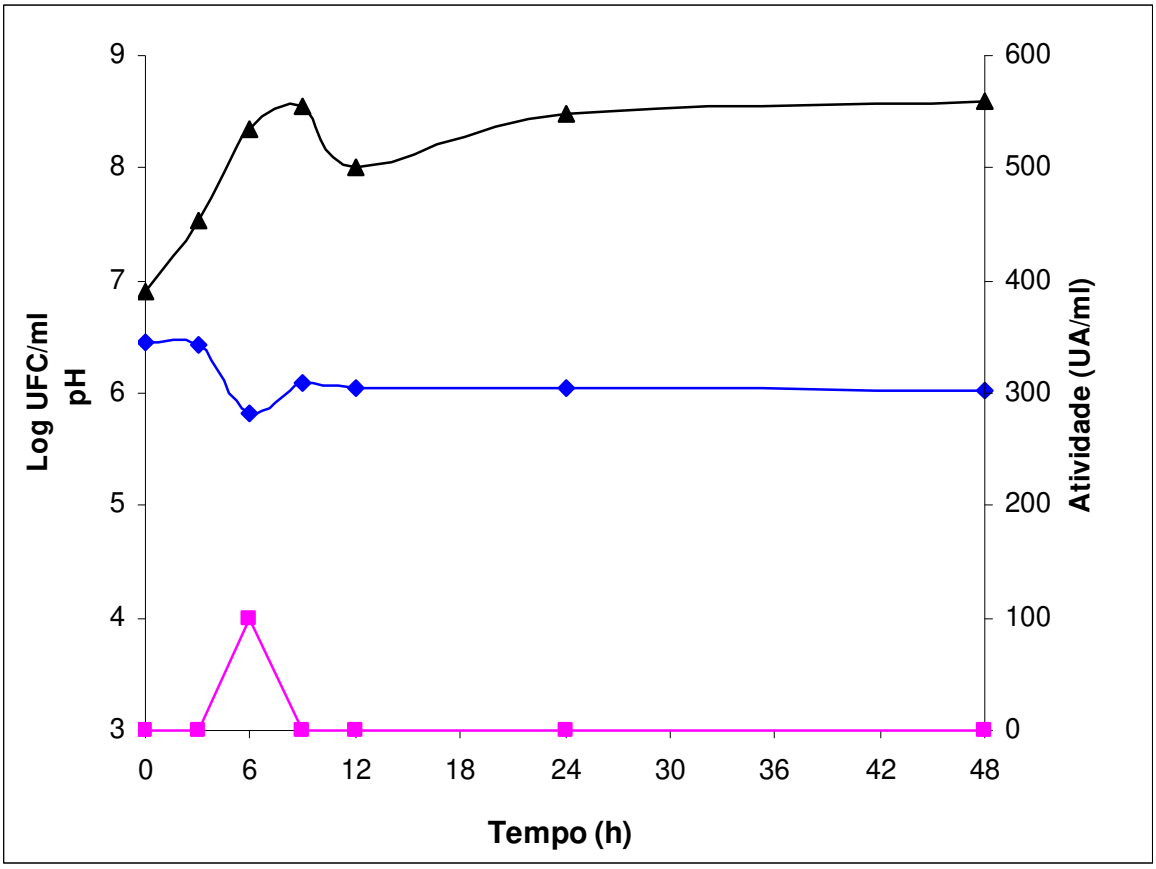

Figura 4. Desenvolvimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■), em leite desnatado a 30ºC.

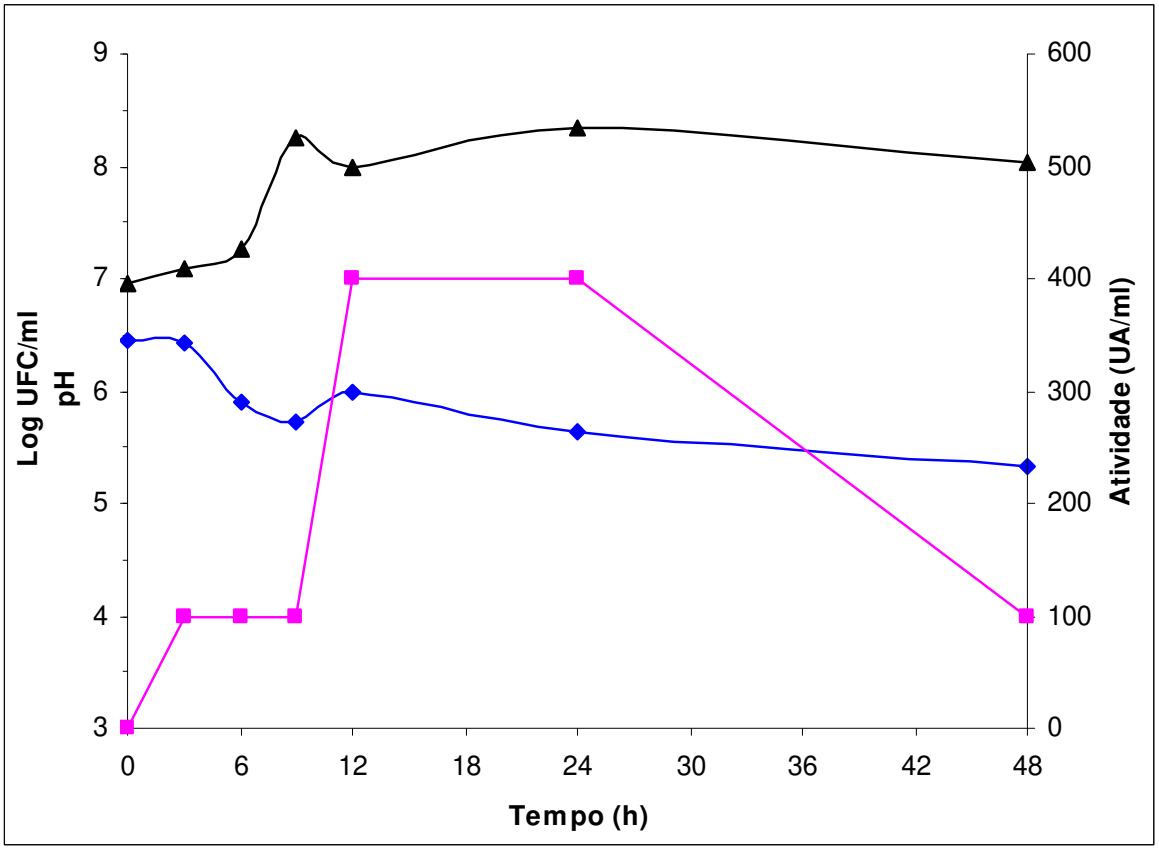

Figura 5. Desenvolvimento de *Lactobacillus plantarum* ALC 01 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■), em leite desnatado a 37ºC.

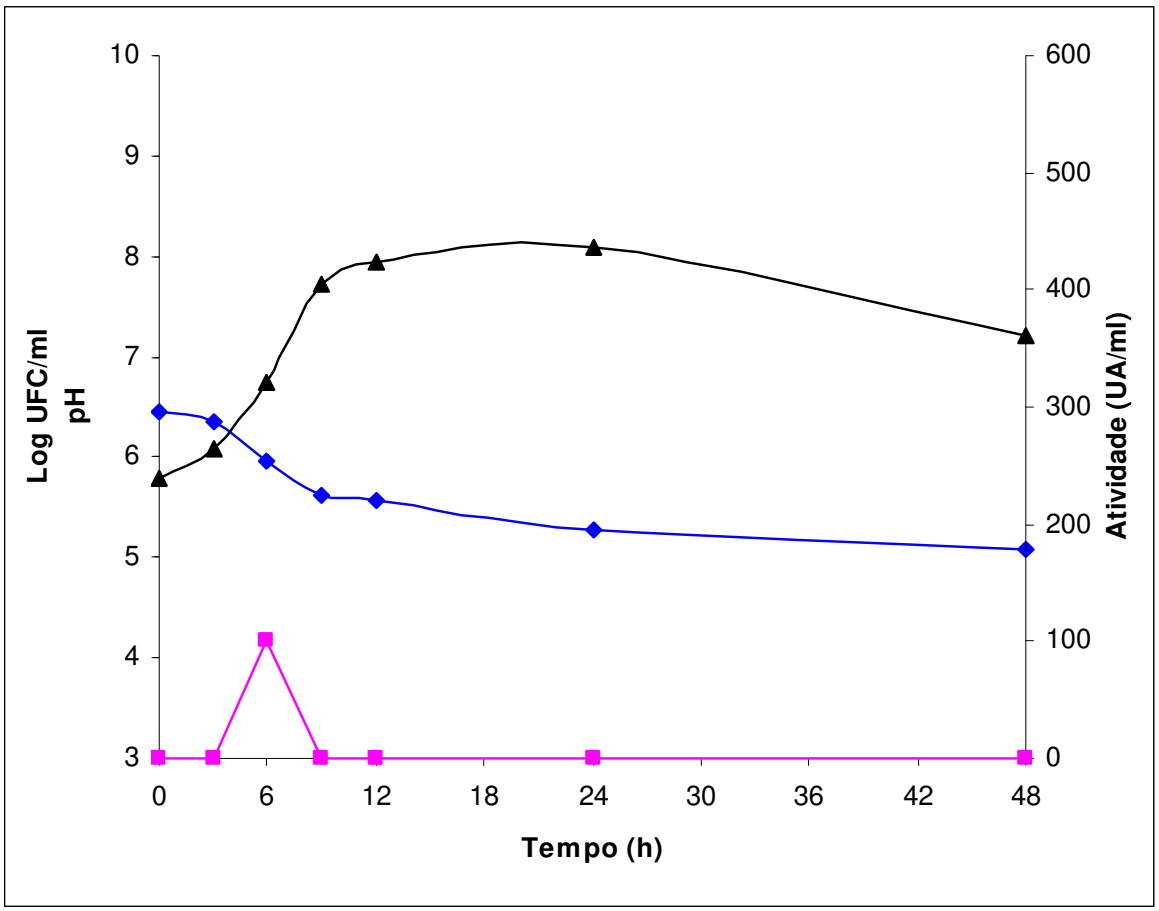

Figura 6. Desenvolvimento de *E. faecium* FAIR-E 198 (▲), evolução de pH (♦) e atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A (■), em leite desnatado a 37ºC.

4. DISCUSSÃO

Dentre todas as linhagens de *L. monocytogenes* avaliadas, Scott A foi a que apresentou maior resistência às bacteriocinas produzidas pelas três culturas bacteriocinogênicas. A resistência desta linhagem a diferentes bacteriocinas já havia sido relatada por Alvarado e outros (2005) e Vignolo e outros (2000).

Lb. plantarum ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 apresentaram atividade similar e restrita ao gênero *Listeria* sp., não sendo ativas contra as diferentes linhagens dos demais gêneros avaliados. Com relação ao espectro antimicrobiano de *E. faecium*, estes resultados condizem com outros autores. Franz e outros (1996) verificaram que as linhagens de *L. monocytogenes* foram sensíveis à bacteriocina produzida por *E. faecium* BFE 900 e que *B. cereus, S. aureus e Lc. lactis* spp. apresentaram resistência. Em 1998, Ennahar e outros observaram halos de inibição sobre *L. monocytogenes* entre 2 e 4 mm de diâmetro, enquanto *S. aureus* e *B. cereus* não demonstraram sensibilidade a enterocina 81. Ennahar e Deschamps (2000), verificaram, pelo método de diluição crítica que a enterocina A, produzida por *E. faecium* EFM01, promoveu a inibição de 13 das 14 linhagens *de L. monocytogenes* e que nenhuma das 7 linhagens de *S. aureus* foram inibidas por esta bacteriocina. Por outro lado, Achemchem e outros (2005), Alvarado e outros (2005) e Ammor e outros (2006) verificaram ação antimicrobiana de enterocinas produzidas por *E. faecium* sobre linhagens de *S. aureus*.

Quanto à pediocina AcH produzida por *Lb. plantarum*, Ennahar e outros (1996) observaram a inibição de 7 linhagens de *L. monocytogenes* (halo de inibição entre 8 e 14mm de diâmetro), 2 de *L. innocua* (halo entre 8 e 10mm) e 1 de *B. cereus* (11mm). Duas linhagens de *Lc. lactis* spp, uma de *S. aureus* e outra de *B. cereus* apresentaram resistência. Loessner e outros (2003) obtiveram zona de inibição entre 10 e 13mm de diâmetro para todas as 12 linhagens de *L. monocytogenes* avaliadas.

Neste estudo, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 apresentou efeito antimicrobiano sobre 80% (8/10) das linhagens de *L. monocytogenes* e 40% (2/5) das linhagens de *S. aureus* avaliadas, contudo não promoveu a inibição de nenhuma linhagem de *B. cereus* pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços. Resultados similares foram

encontrados por Benkerroum e outros (2002) e Conventry e outros (1999), além destes Millette e outros (2004) e Rilla e outros (2004) relataram atividade inibitória de nisina sobre *S. aureus*.

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo decréscimo da atividade de bacteriocina com o decorrer do tempo, como agregação às proteínas, degradação proteolítica e adsorção à célula produtora (DE VUYST e VANDAMME, 1992).

Nos ensaios para avaliação do desenvolvimento, capacidade de acidificação e produção de bacteriocina em caldo MRS e em LDR 10%, dentre as três culturas avaliadas, a menor produção de bacteriocina foi verificada para *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 tanto em caldo MRS quanto em LDR 10%. Mesmo demonstrando desenvolvimento similar nestes meios, a produção de bacteriocina em LDR 10% se restringiu a 100 UA/ml, sendo detectada apenas em um ponto (6h), enquanto que em caldo MRS foi verificada atividade entre 12 e 24h, com título máximo de 200 UA/ml. Moreno (1995) utilizando *L. innocua* como indicador, também verificou menor produção de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em LDR 10% (1.600UA/ml) quando comparado ao caldo APT (6.400UA/ml).

Em ambos os meios, a produção de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi detectada no final da fase logarítmica. Benkerroum e outros (2002) observaram máxima atividade de bacteriocina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* após 10h de incubação em caldo MRS a 30ºC, correspondendo ao final da fase logarítmica. Elotmani e outros (2002) relataram máxima produção de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *lactis* R9/2 em meio de cultivo no final da fase exponencial, porém, em leite UHT, a maior atividade foi observada durante a fase estacionária. Segundo De Vuyst e Vandamme (1994), a produção de bacteriocina pela maioria das bactérias lácticas ocorre no final da fase de crescimento exponencial.

Lb. plantarum ALC 01 apresentou a maior atividade de bacteriocina, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador, nos dois meios avaliados (caldo MRS e LDR 10%). A atividade desta bacteriocina foi detectada durante a fase logarítmica, após 3h em LDR 10% e 9h em caldo MRS, alcançando máxima atividade após 12h

(400UA/ml) e 24h (6.400UA/ml) em LDR 10% e caldo MRS, respectivamente. Uma diminuição acentuada de atividade foi observada após 24h em ambos os meios de cultivo. O decréscimo na atividade da bacteriocina durante a fase estacionária pode estar relacionado à atividade de proteinases endógenas liberadas no meio extracelular durante a fase exponencial (PARENTE e HILL, 1992; TORRI TARELLI et al.,1994).

Ennahar e outros (1998) detectaram máxima atividade de pediocina AcH produzida por *Lb. plantarum* WHE 92, após 5 dias de incubação em caldo MRS a 15ºC, no final da fase exponencial. Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2006) observaram produção de bacteriocina por *Lb. plantarum* durante a fase logarítmica, com máxima atividade no início da fase estacionária.

O menor rendimento de produção de bacteriocina por *Lb. plantarum* ALC 01 observado em LDR 10% comparativamente ao caldo pode estar relacionado com a adsorção dessas moléculas aos componentes do leite (CHUNG et al., 1989) ou então às células produtoras (YANG et al., 1992).

A atividade da bacteriocina produzida por *E. faecium* FAIR-E 198 em caldo MRS foi detectada durante a fase logarítmica, alcançando título máximo na fase estacionária, condizendo com os achados de Achemchem e outros (2005). Contudo, diversos autores verificaram máxima atividade de enterocinas durante ou no final da fase exponencial (ALVARADO et al., 2005; CINTAS et al., 1997; ELOTMANI et al., 2002; FRANZ et al., 1996).

Utilizando caldo MRS a 37ºC sem controle de pH, a máxima atividade de enterocina foi de 800UA/ml, obtida após 24h de incubação. Sarantinopoulos e outros (2002b) avaliaram a mesma linhagem de *E. faecium* e obtiveram este mesmo título em caldo MRS a 37ºC, porém com pH controlado (6,5) e após 5h de incubação. Já em leite desnatado, estes autores não detectaram atividade desta bacteriocina, contudo quando o suplementaram com hidrolisado de caseína (1,4%) foi verificada atividade de 100 UA/ml após 6h. O mesmo resultado foi encontrado neste estudo utilizando apenas LDR 10% sem suplementação.

Parente e Hill (1992) reportaram redução drástica na produção de bacteriocinas por *E. faecium* em leite quando comparado à atividade obtida em meios de cultura sintéticos. Segundo Moreno e outros (2002), os enterococos apresentam baixa atividade proteolítica, por esse motivo a produção de bacteriocina, encontrada por estes autores, em leite foi menor (200UA/ml) do que a obtida em caldo (1.200UA/ml). Porém, Rodriguez e outros (1997) obtiveram maior atividade de enterocina em leite do que em caldo APT.

5. CONCLUSÃO

Confirmou-se neste estudo que as bacteriocinas da Classe IIa, enterocina e pediocina AcH, produzidas por *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lb. plantarum* ALC 01 apresentam espectro de ação predominante sobre *L. monocytogenes* em relação aos outros microrganismos patogênicos avaliados. A nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 apresentou menor atividade quando comparada as outras bacteriocinas, porém com espectro de ação mais amplo, inibindo 80% das linhagens de *L.* monocytogenes, 40% de *S. aureus* e 12% de *B. cereus*.

As três culturas bacteriocinogênicas apresentaram produção de bacteriocina em ambos os meios avaliados (caldo MRS e LDR 10%). Contudo, melhor desempenho foi observado em caldo MRS, onde *Lactobacillus plantarum* ALC 01 apresentou maior atividade de bacteriocina, seguida por *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 e por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Em leite, não houve diferença de atividade entre *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e *E. faecium* FAIR-E 198. As bacteriocinas das três culturas foram degradadas em ambos os meios em condição de incubação prolongada.

Baseando-se nos resultados obtidos, optou-se por utilizar nas próximas etapas do estudo, como microrganismos indicadores *Listeria monocytogenes* Scott A, por demonstrar a maior resistência dentro da espécie, e *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Bacillus cereus* K1-B041 escolhidas aleatoriamente dentre as linhagens que apresentaram sensibilidade a pelo menos uma das culturas bacteriocinogênicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEMCHEM F.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; ABRINI J.; VALDIVIA E.; MAQUEDA, M. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat´s cheese made in Morocco. **Journal of Applied microbiology**, v.99, p.141-150, 2005.

ALVARADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; MARTIN, S. E.; REGALADO, C. Anti-*Listeria monocytotgenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. **Current Microbiology**, v.51, p.110-115, 2005.

AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control**, v.17, p.454-461, 2006.

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

BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, p.261-268, 1988.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilizaçao de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leite e derivados**. 2003. 98p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin

from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, 4321-4330, 1997.

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

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

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

De VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batchfermentations. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.571-578, 1992.

De VUYST, L.; VANDAMME, E. J. (Eds.) **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Londres: Chapman e Hall, 1994. 539p.

ELOTMANI, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; ASSOBHEI, O.; MILLIÉRE, J. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan tradicional fermented milk. **Current Microbiology**, v.44, p.10-17, 2002.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O.; DORSSELAER, A. V.; BRINGEL, F.; HUBERT, J. C.; HASSELMANN, C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4381-4387, 1996.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; ASSOBHEI, O.; HASSELMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.521-526, 1998.

ENNAHAR, S.; DESCHAMPS, N. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enteroccoccus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.449-457, 2000.

FERCHICHI, M.; FRERE, J.; MABROUK, K.; MANAI, M. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. **FEMS Mcrobiology**, v.205, p.49-55, 2001.

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.255-270, 1996.

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

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v.12, p.291-299, 1995.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bactriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.77-84, 2005.

HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v.27, p.85-123, 1981.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A. L.; DAVDSON, P. M. Ed. **Antimicrobial in Foods**. Marcel Deckker Inc., New York, EUA, 1983. p.327-351

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, v.12, p.39-85, 1993.

LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.235-240, 2003.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1854-1857, 2003.

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

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

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilizacao no processamento de queijo minas frescal**. 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAM, T. M.; VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.1, p.73-84, 2002.

PARENTE, E.; HILL,C. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.55, p.497-502, 1992.

RATTANACHAIKUNSOPON, P. PHUMKHACHORN, P. Isolation and preliminary characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* N014 isolated from Nham, a tradicional thai fermented pork. **Journal of Food Protection**, v.69, n.8, p.1937-1943, 2006.

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

RODRIGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes*in a modeldairy system. **Journal of Food Protection**, v.60, p.28-32, 1997.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.93-105, 2002a.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.125-136, 2002b.

TAGG, J. R.; MCGIVEN, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.943, 1971.

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

TORRI TARELLI, G.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, v.11, p.243-252, 1994.

VIGNOLO, G.; PALACIOS, J.; FARIAS, M. E.; SESMA F.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.; OLIVER G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. **Current Microbiology**, v.40, p.410-416, 2000.

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

CAPÍTULO III

DETERMINAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE DESENVOLVIMENTO DAS CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS COM FERMENTO LÁCTICO E AVALIAÇÃO DE SUAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS

Resumo

Além da utilização como bioconservantes de alimentos, algumas linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas estão sendo empregadas para acelerar a maturação de queijos, promovendo o desenvolvimento de *flavours* desejáveis. Porém, a compatibilidade de desenvolvimento destas culturas com o fermento láctico é essencial para a obtenção de produtos característicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade de desenvolvimento associativo, em leite desnatado, de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 e *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 com duas diferentes marcas comerciais de fermentos lácticos, utilizados na fabricação de queijo Minas Frescal. Inicialmente, foi determinada a sensibilidade *in vitro* dos fermentos lácticos às culturas bacteriocinogênicas pelo método de difusão em ágar por inoculação em poços. Nesta etapa, somente *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi capaz de promover a inibição (halo de 6mm) das linhagens constituintes de ambos os fermentos láctico. Em seguida, a atividade acidificante e de bacteriocinas foram determinadas. Após 8 e 24h de desenvolvimento associativo em leite a 35ºC, a adição de 0,1% e de 0,5% das três culturas bacteriocinogênicas não afetou significativamente a produção de ácido láctico pelos fermentos. O desenvolvimento associativo destes fermentos lácticos com *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, em ambas as concentrações, proporcionou significativo aumento da atividade das bacteriocinas destas culturas, enquanto que a atividade da nisina foi suprimida. Além disso, foi determinada a atividade de aminopeptidases das culturas bacteriocinogênicas. *Lb. plantarum* ALC 01 apresentou a maior atividade de aminopeptidases (0,226 a 0,390), enquanto as demais culturas bacteriocinogênicas e os fermentos lácticos apresentaram atividade entre 0,032 e 0,134. Portanto, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 podem ser empregados como

culturas adjuntas ao fermento láctico tipo O no processamento de produtos lácteos, com o objetivo de aumentar a segurança microbiológica sem alterar a qualidade sensorial destes produtos.

1. INTRODUÇÃO

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas têm despertado interesse da indústria de alimentos como conservantes naturais, visto que apresentam habilidade de inibir o desenvolvimento de muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos, incluindo *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (DE VUYST e VANDAMME, 1994). Outra aplicação interessante das culturas bacteriocinogênicas e suas bacteriocinas é a redução do período de maturação de queijos, resultante da liberação de aminopeptidases intracelulares na matriz do queijo, em decorrência da lise celular do fermento láctico promovida por estas culturas, contribuindo com a proteólise e formação de *flavour* desejáveis (MORGAN et al., 2002).

Existem muitas controvérsias na literatura científica sobre a capacidade acidificante e atividade de aminopeptidases das culturas produtoras de bacteriocinas. Andrighetto e outros (2001) e Sarantinopoulos e outros (2001) relataram baixa atividade acidificante de culturas bacteriocinogênicas e Oumer e outros (2001b) e Garde e outros (2002) não observaram alteração significativa do pH de queijo Hispânico tanto na presença de *E. faecalis* quanto de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Contudo, Oumer e outros (2001a) e Ávila e outros (2005a) verificaram alteração no pH de leite e queijo quando empregaram culturas bacteriocinogênicas.

Com relação à atividade de aminopeptidases, Ávila (2005b) encontraram baixa atividade utilizando culturas bacteriocinogênicas em leite, enquanto Garde e outros (1997; 2002; 2006) e Oumer (2001b) relataram aumento da atividade de aminopeptidases em queijos fabricados com culturas produtoras de bacteriocinas.

Em um estudo realizado por Ayad e outros (2004), 60% das linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* mostraram média atividade acidificante (redução de 0,4 unidade de pH entre

3h e 5h de desenvolvimento). A maioria das linhagens de *Lb. plantarum* demonstrou baixa capacidade acidificante (redução de 0,4 unidades de pH após um período maior que 5h) e as linhagens de *E. faecium* apresentaram atividade acidificante variando entre baixa e média. Quanto à atividade de aminopeptidases, 50% das linhagens de *Lactococcus*, 70% de *Lactobacillus* e 68% de *Enterococcus* exibiram baixa atividade.

Para determinar a viabilidade de aplicação de culturas bacteriocinogênicas na fabricação de queijos, como culturas iniciadoras ou adjuntas, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 foram avaliadas quanto à capacidade de inibição *in vitro* de duas marcas comerciais de fermento láctico. Também, foram estudadas as capacidades de acidificação e de produção de bacteriocina durante co-cultivo em leite desnatado destas culturas com os fermentos lácticos comerciais. Além disso, foi determinada a atividade de aminopeptidases.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos

Foram avaliadas as culturas produtoras de bacteriocinas, *Lactobacillus plantarum* ALC 01, produtora de pediocina AcH e isolada de queijo Munster (ENNAHAR et al., 1996), *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, produtora de enterocina e isolada de queijo Feta (ACA-DC 1618, Universidade de Agricultura de Atenas, Atenas, Grécia) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, produtora de nisina (BCCM-LMG Bacteria Collection, Gent, Bélgica). Todas as culturas lácticas foram mantidas a 4ºC em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA). Para a realização dos testes, todas as culturas foram propagadas duas vezes consecutivas em caldo MRS, com incubação a 30 ºC para *Lc. lactis* subsp. *lactis* e a 37ºC para as demais culturas por 16 a 24h.

Foram utilizadas duas diferentes marcas comerciais (A e B) de fermento mesofílico tipo O, constituído por diferentes linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, as quais foram mantidas liofilizadas a -18ºC.

Os microrganismos patogênicos utilizados como indicadores, *Listeria monocytogenes* Scott A*, Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Bacillus cereus* K1-B041, foram fornecidos pelo Banco de Culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ). A manutenção destas culturas foi feita em ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Difco, Sparks, EUA) para *L. monocytogenes*, ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) para *S. aureus* e ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA) para *B. cereus*. Para a realização dos testes, todos os microrganismos patogênicos foram propagados duas vezes consecutivas em condições de cultivo adequadas a cada espécie por 16 a 24h.

2.2. Determinação da sensibilidade do fermento láctico às culturas bacteriocinogênicas

A sensibilidade dos fermentos lácticos comerciais às culturas produtoras de bacteriocinas foi avaliada *in vitro*, utilizando o método de difusão em ágar por inoculação em poços, adaptado de Tagg e Mcgiven (1971).

Em 20ml de ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente suplementado com 2% β-glicerofosfato de sódio (Sigma, St Louis, EUA) (KOJIC et al., 1991), foi inoculado com 0,2ml das suspensões dos fermentos lácticos comerciais (10^6-10^7 UFC/ml). Após solidificação, foram feitos três orifícios de 5mm de diâmetro no ágar e estes foram inoculados com 50µl dos sobrenadantes obtidos a partir das culturas bacteriocinogênicas. As placas foram incubadas a 35ºC/24h e analisadas quanto à presença de halos de inibição ao redor dos orifícios inoculados.

Os sobrenadantes ativos foram obtidos por centrifugação (7.500g por 20min a 4ºC) (Centrífuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA) a partir dos cultivos das culturas produtoras de bacteriocinas. Em seguida, o pH dos sobrenadantes foi ajustado para 6,5 e então, esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) (MORENO, 1995). Os testes foram realizados em triplicata.

2.3. Determinação da capacidade acidificante e de produção de bacteriocinas durante desenvolvimento associativo das culturas bacteriocinogênicas com os fermentos lácticos

2.3.1. Determinação da concentração do fermento láctico

Aliquotas de 0,1g dos fermentos lácticos liofilizados marcas A e B foram transferidos para tubos contendo 20ml de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, SP) e incubados a 35ºC/24h. Então, foram transferidos 100µl (0,5%), 200µl (1%) e 400µl (2%) dos cultivos para outros tubos contendo 20ml de LDR 10%. Em seguida, os tubos foram incubados a 35ºC por 8h e após este período, o pH do meio foi determinando em pHmetro (Hanna Instruments HI9110, Singapura). A concentração do fermento láctico que reduziu o pH do leite a 5,0 ± 0,1, foi selecionada para ser utilizada nos testes subseqüentes (OUMER et al., 2001).

2.3.2. Inoculação dos fermentos lácticos e das culturas bacteriocinogênicas

Os fermentos lácticos em concentração de 1% (200µl) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20ml de LDR 10%. Em seguida, foram adicionadas as culturas produtoras de bacteriocinas nas concentrações 0,1% (50µl) e 0,5% (100µl), os tubos foram incubados a 35ºC/24h (adaptado de OUMER et al., 2001). Foi utilizado como controle LDR 10% inoculado apenas com os fermentos lácticos ou com as culturas bacteriocinogênicas.

2.3.3. Determinação da atividade acidificante

O pH de cada cultivo foi determinado em pHmetro (Hanna Instruments HI9110, Singapura) após 8 e 24h de incubação a 35ºC.

2.3.4. Determinação do título das bacteriocinas

O título das bacteriocinas foi determinado pelo método de diluição crítica, adaptado de Mayr-Harting e outros (1972). Após 24h de incubação a 35ºC, os cultivos preparados conforme item 2.3.2 foram centrifugados a 7.500g/15min a 4ºC (Centrifuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA) e o pH dos sobrenadantes foi corrigido para 6,5 com NaOH 1N

(Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, estes sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) (MORENO, 1995) e diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 7,0, utilizando placas de microtitulação. Então, 10µl de cada diluição foi depositado sobre placas contendo TSA (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (0,2ml) das culturas indicadoras *S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041 (10^6-10^7 UFC/ml)e sobre placas contendo TSA-YE (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (0,2ml) de *L. monocytogenes* Scott A (10^6-10^7 UFC/ml). As placas foram incubadas a 35ºC/24h. O título de bacteriocina, expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/ml), foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100.

2.4. Determinação da atividade de aminopeptidase

Após incubação em caldo MRS tamponado a pH 7,0 por 24h a 30ºC (*Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e fermentos lácticos) e a 37ºC (*Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198), os cultivos foram centrifugados (Centrifuga Digital CIENTEC – CT 6000R – EQ – TL. 249) a 5.000g/15min a 4ºC. O concentrado celular obtido foi lavado duas vezes com tampão fosfato de sódio 0,01M (Merck, Darmstadt, Alemanha) e transferido para um gral de porcelana, onde foi triturado com alumina (Sigma, St Louis, EUA) adicionada na proporção de 1:2 (DAKO et al., 1995). Em seguida, o material foi transferido para um tubo Eppendorf contendo pérolas de vidro e então submetido à agitação por 3 ciclos de 1min, seguidos por resfriamento em banho de gelo (BOUTROU et al., 1998). Após nova centrifugação do material a 20.000g/10min a 4ºC, o sobrenadante foi removido e o extrato enzimático foi reservado para análise.

A atividade de aminopeptidases foi determinada através da medida da extensão da hidrólise dos substratos cromogênicos: alanina-p-nitroanilida (Ala-p-NA, Sigma, St Louis, EUA), arginina-p-nitroanilida (Arg-p-NA, Sigma, St Louis, EUA), leucina-*p*-nitroanilida (Leu-p-NA, Sigma, St Louis, EUA) e lisina-*p*-nitroanilida (Lys-p-NA, Sigma, St Louis, EUA), segundo o método descrito por Garde e outros (1997).

A mistura de reação foi composta por 0,4ml do extrato enzimático, 0,5ml de tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,0 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,1ml de substrato cromogênico 25mM dissolvido em metanol. Após incubação a 35ºC durante 4 horas, foi adicionado 0,5ml de ácido acético glacial 30% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) para bloquear a reação e a absorbância foi mensurada a 410nm em espectrofotômetro DU-70 (Beckman Coulter, Fullerton, EUA). A unidade de atividade enzimática foi definida como a variação de 0,01 unidade de absorbância em 1 minuto (0,01U/min).

3. RESULTADOS

3.1 Sensibilidade dos fermentos lácticos as culturas bacteriocinogênicas

Foram avaliadas duas diferentes marcas comerciais (A e B) de fermentos lácticos mesofílicos tipo O, constituídos por *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* quanto a sensibilidade às bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198. Utilizando o método de difusão em ágar por inoculação em poços, foi possível detectar que somente a bacteriocina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 promoveu a inibição das linhagens de ambas as marcas de fermentos avaliadas, com halos de inibição de 6mm de diâmetro.

3.2. Determinação da capacidade acidificante e produção de bacteriocinas durante desenvolvimento associativo de culturas bacteriocinogênicas e fermentos lácticos

3.2.1. Capacidade acidificante

A **Tabela 1** mostra a atividade acidificante após 8 e 24h de desenvolvimento associativo das culturas bacteriocinogênicas *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198, em duas diferentes concentrações (0,1% e 0,5%) com duas marcas comerciais de fermento láctico (A e B). Pelos resultados apresentados, verifica-se que após 8 e 24h de incubação a 35ºC, a produção de ácido láctico pelos fermentos lácticos comerciais (A e B) não foi significativamente afetada ($P>0,05$) por nenhuma das três culturas bacteriocinogênicas, em ambas as concentrações avaliadas.

As três culturas bacteriocinogênicas foram caracterizadas como lentas quanto à produção de ácido láctico, uma vez que os valores médios do pH do leite variaram entre 6,27 e 6,34 (ΔpH 0,11- 0,18) e entre 6,04 e 6,13 (ΔpH 0,32- 0,41) para concentrações de 0,1 e 0,5%, respectivamente após 8h de incubação a 35ºC.

Após 24h de incubação, *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lb. plantarum* ALC 01 apresentaram ΔpH de 1,23 e de 1,15 quando empregados na concentração de 0,5%, já *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 manteve valor de ΔpH abaixo de 0,5, mesmo com o aumento da concentração de 0,1% para 0,5%.

Tabela 1. Valores de pH de LDR 10% inoculado com 0,1% e 0,5% de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 e fermentos lácticos (1%) após 8 e 24h de incubação a 35ºC.

Culturas e fermentos lácticos	**pH dos cultivos em diferentes % de culturas bacteriocinogênicas e tempos de inoculação**			
	0,1%		**0,5%**	
	8h	**24h**	**8h**	**24h**
Fermento A	$5,10^{b}$ *	$4,24^{d}$	$4,90^{b}$	$4,26^{b}$
Fermento A + *E. faecium* FAIR-E 198	$5,02^{b}$	$4,22^{d}$	$4,74^{b}$	$4,18^{b}$
Fermento A + *Lb. plantarum* ALC 01	$5,02^{b}$	$4,23^{d}$	$4,76^{b}$	$4,15^{b}$
Fermento A + *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454	$5,03^{b}$	$4,29^{d}$	$4,87^{b}$	$4,27^{b}$
Fermento B	$5,06^{b}$	$4,24^{d}$	$4,89^{b}$	$4,25^{b}$
Fermento B + *E. faecium* FAIR-E 198	$4,95^{b}$	$4,24^{d}$	$4,80^{b}$	$4,21^{b}$
Fermento B + *Lb. plantarum* ALC 01	$4,97^{b}$	$4,24^{d}$	$4,84^{b}$	$4,20^{b}$
Fermento B + *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454	$5,00^{b}$	$4,27^{d}$	$4,80^{b}$	$4,26^{b}$
E. faecium FAIR-E 198	$6,27^{a}$	$5,72^{c}$	$6,13^{a}$	$5,22^{a}$
Lb. plantarum ALC 01	$6,34^{a}$	$6,10^{a}$	$6,08^{a}$	$5,30^{a}$
Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454	$6,28^{a}$	$5,97^{b}$	$6,04^{a}$	$5,99^{a}$

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05);
** pH inicial do leite = 6,45.

3.2.2. Determinação da produção de bacteriocinas

A **Tabela 2** mostra a atividade das bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, em duas concentrações de inóculos (0,1% e 0,5%), após 24 horas de incubação a 35^{o}C em LDR 10%, em cultivo puro e em desenvolvimento associativo com os fermentos lácticos comerciais A e B. Foi verificada atividade inibitória de bacteriocinas apenas sobre *L. monocytogenes* Scott A. Nenhuma produção de bacteriocina foi detectada para os fermentos lácticos analisados.

Em cultivo puro, as três culturas adjuntas demonstraram aumento da atividade de bacteriocina quando a concentração foi elevada de 0,1 para 0,5%. O resultado mais expressivo foi detectado para *Lb. plantarum* ALC 01, cuja atividade passou de 50UA/ml para 400UA/ml com o aumento da concentração do cultivo. A associação dos fermentos lácticos A e B com *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, em ambas as concentrações, proporcionou significativo aumento da atividade das bacteriocinas destas linhagens. Na concentração de 0,5% houve um aumento da atividade de 400 para 800UA/ml para *Lb. plantarum* ALC 01 e de 100 para 400 a 800UA/ml para *E. faecium* FAIR-E 198.

Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454 em cultivo puro a 0,5% apresentou 100UA/ml de atividade de bacteriocina sobre *L. monocytogenes* Scott A, contudo a atividade desta bacteriocina foi suprimida quando a linhagem foi empregada em associação com os fermentos láctico A e B.

Tabela 2. Atividade das bacteriocinas determinada pelo método de diluição crítica, utilizando *L. monocytogenes* Scott A como cultura indicadora.

Culturas e fermentos lácticos	Atividade (UA/ml) da bacteriocina em diferentes concentrações de inóculos*	
	0,1%	**0,5%**
Fermento A	0	0
Fermento B	0	0
E. faecium FAIR-E 198	0	100
Fermento A + *E. faecium* FAIR-E 198	400	400
Fermento B + *E. faecium* FAIR-E 198	200	800
Lb. plantarum ALC 01	50	400
Fermento A + *Lb. plantarum* ALC 01	400	800
Fermento B + *Lb. plantarum* ALC 01	300	800
Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454	0	100
Fermento A + *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454	0	0
Fermento B + *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454	0	0

*Unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/ml) = recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição multiplicada por 100.

3.3. Determinação da atividade de aminopeptidase

No sentido de caracterizar a atividade proteolítica, as culturas bacteriocinogênicas e os fermentos lácticos foram caracterizados quanto à atividade específica de aminopeptidase sobre os substratos cromogênicos Ala-*p*-NA, Arg-*p*-NA, Leu-*p*-NA e Lys-*p*-NA, após desenvolvimento em caldo MRS. Pelos resultados apresentados na **Tabela 3** verifica-se que, dentre as culturas avaliadas, *Lb. plantarum* ALC 01 apresentou a maior atividade específica (0,226 a 0,390) sobre todos os substratos utilizados. Para *E. faecium* FAIR-E 198 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi encontrada atividade entre 0,053 e 0,092 e entre 0,035 e 0,0134, respectivamente. Ambas as marcas comerciais de fermento láctico

demonstraram baixa atividade de aminopeptidases intracelulares, com valores entre 0,032 e 0,054 para a marca A e entre 0,057 e 0,092 para a marca B.

Tabela 3. Atividade de aminopeptidases intracelulares das culturas bacteriocinogênicas e fermentos lácticos comerciais.

Culturas e fermentos lácticos	**Unidade de atividade enzimática* para os substratos**			
	Ala-*p*-Na**	**Arg-*p*-Na**	**Leu-*p*-Na**	**Lys-*p*-Na**
Fermento A	0,068	0,046	0,054	0,032
Fermento B	0,092	0,057	0,059	0,057
E. faecium FAIR-E 198	0,081	0,078	0,053	0,092
Lb. plantarum ALC 01	0,256	0,365	0,226	0,390
Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454	0,134	0,050	0,080	0,035

* Unidade de atividade enzimática = variação de 0,01 unidade de absorbância em 1 minuto (0,01U/min);

** -*p*-Na: *p*-nitroanilida.

4. DISCUSSÃO

A nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 inibiu ambos os fermentos lácticos analisados. Outros autores já haviam mencionado a sensibilidade de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* às bacteriocinas produzidas por linhagens homólogas (CONVENTRY et al., 1997; BENKERROUM et al., 2002; ELOTMANI et al., 2002). Já *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não apresentaram atividade sobre os fermentos avaliados, confirmando os relatos de Franz e outros (1996), Ennahar e outros (1996 e 1998), Leroy e outros. (2003) e Álvarado e outros (2005).

Com relação às características tecnológicas, *Lb. plantarum* ALC 01, *E. faecium* FAIR-E 198 e mesmo *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, cuja bacteriocina demonstrou inibição dos fermentos lácticos no teste de difusão em ágar por inoculação em poços, não afetaram a capacidade acidificante dos fermentos lácticos avaliados. Garde e outros (2002) e Oumer e outros (2001b) também não observaram alterações de pH em queijo Hispânico fabricado com adição de culturas adjuntas produtoras de bacteriocinas. Contudo, em outro

estudo Oumer e outros (2001a) obtiveram alteração significativa do pH do leite, em pelo menos 4 diferentes amostras de fermentos mesofílicos quando associados a linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum* e *E. faecium*. Em queijo, Ávila e outros (2005a) verificaram redução do pH em queijos fabricados com *Lc. lactis* subsp. *lactis* produtor de bacteriocina como culturas adjuntas, durante os primeiros 15 dias de armazenamento.

Ayad e outros (2004) pesquisaram a habilidade de produção de ácido por 755 linhagens de bactérias lácticas isoladas de leite e derivados. Sessenta por cento (60%) das linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* mostraram média atividade acidificante (redução de 0,4 unidade de pH após 3h a 5h). A maioria das linhagens de *Lb. plantarum* demonstrou baixa capacidade acidificante (redução de 0,4 unidade após período maior que 5h) e as linhagens *E. faecium* apresentaram atividade acidificante variando entre baixa e média.

Todas as três culturas bacteriocinogênicas, analisadas neste estudo, demonstraram baixa capacidade acidificante quando empregadas tanto a 0,1% quanto a 0,5%, com ΔpH do leite variando entre 0,11 e 0,41 após 8h a 35ºC. Portanto, estas culturas não são indicadas para serem utilizadas como fermento láctico.

Sarantinopoulos e outros (2001) verificaram que apenas 21 das 129 linhagens de *Enterococcus* sp. promoveram a redução do pH do leite abaixo de 5,0. Estes mesmos autores também observaram baixa capacidade acidificante de *E. faecium* FAIR-E 198, com pH de 6,3 e 6,1 após 6 e 16h, respectivamente. Porém, Vilani e Coppola (1994) utilizando linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium* obtiveram maior atividade acidificante, com ΔpH entre 0,4 e 0,8 após 6h a 37ºC. Ávila e outros (2005b), após 8 e 24h de incubação em leite, obtiveram valores mais altos de pH para *Lb. plantarum* e *E. faecium* do que os observados no presente estudo e valores semelhantes ou inferiores aos verificados para *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, em ambas as concentrações utilizadas.

Segundo Andrighetto e outros (2001) e Sarantinopoulos e outros (2001), o gênero *Enterococcus* apresenta lenta capacidade de acidificação em leite e apenas algumas linhagens são capazes de reduzir o pH abaixo de 5,0-5,2 após 16 a 24h de incubação a 37ºC.

Foi verificado aumento da atividade das bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 após associação com os fermentos lácticos em ambas as concentrações avaliadas. Uma possível explicação para este fato seria a rápida degradação das caseínas promovida pelas proteinases dos fermentos lácticos, disponibilizando, assim, nutrientes para o desenvolvimento mais rápido das culturas adjuntas e consequentemente aumento da produção de bacteriocina. Esta hipótese teve como base os resultados obtidos por Moreno e outros (2002) que mencionaram que a baixa atividade proteolítica dos enterococos prejudicaria a produção de bacteriocinas, devido a indisponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento microbiano, e por Sarantinopoulos e outros (2002) que obtiveram maior taxa de crescimento e maior produção de bacteriocina (100UA/ml) por *E. faecium* FAIR-E 198 quando suplementaram o leite desnatado com 1,4% de caseína hidrolisada.

A bacteriocina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi mais sensível às proteases dos fermentos lácticos do que as demais, uma vez que, após associação com os mesmos, houve redução da atividade. Giraffa e outros (1995) observaram redução da atividade de bacteriocina produzida em leite por *E. faecium* 7C5 em co-cultivo com fermento comercial. Os autores relacionaram esta característica à degradação da bacteriocina por proteases liberadas pelo fermento.

A medida da atividade de aminopeptidases constitui-se numa importante fonte de avaliação, não somente para determinar a contribuição das culturas lácticas nas reações de proteólise, como também para ser utilizada como um marcador da ocorrência de autólise celular durante a estocagem do queijo Minas Frescal.

Os fermentos lácticos, avaliados neste estudo, demonstraram baixa atividade de aminopeptidases, mesmo após lise celular, estes resultados condizem com os relatados por Oumer e outros (2001a). Portanto, estes fermentos apresentam capacidade acidificante e baixa atividade proteolítica.

Da mesma forma, *E. faecium* FAIR-E 198 demonstrou baixa atividade de aminopeptidases, entre 0,053 para leucina e 0,092 para lisina. Sarantinopoulos e outros

(2001) avaliando a mesma linhagem, em uma escala de 0 a 4 de atividade, encontraram 2 para leucina e zero para lisina.

Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454 apresentou atividade acima de 0,1 apenas sobre Ala-*p*-NA e para os demais substratos a atividade variou ente 0,035 e 0,080. Já *Lb. plantarum* ALC 01 apresentou as maiores atividades de aminopeptidases quando comparada as demais culturas. Dako e outros (1995) também observaram maior atividade de aminopeptidases (5 a 100 vezes) no gênero *Lactobacillus* quando comparado a *Lactococcus* e *Pediococcus.*

Segundo Ayad e outros (2004), cinqüenta por cento (50%) das linhagens de *Lactococcus* analisadas, setenta por cento (70%) de *Lactobacillus* e 68% de *Enterococcus* também apresentaram baixa atividade de aminopeptidases.

5. CONCLUSÃO

A nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 114454 foi a única bacteriocina capaz de promover a inibição dos fermentos lácticos comerciais avaliados pelo método de difusão em ágar. Contudo, quando esta e as outras culturas bacteriocinogênicas foram adicionadas, em leite, como adjuntas aos fermentos lácticos, nas concentrações de 0,1 e 0,5%, não foi observado alteração da capacidade acidificante dos mesmos.

Com exceção da nisina que foi suprimida, a produção de pediocina e enterocina foi potencializada pela presença dos fermentos lácticos. Portanto, em virtude da baixa capacidade acidificante e do aumento da atividade de bacteriocina observado durante desenvolvimento associativo com os fermentos lácticos, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 são mais indicadas para serem empregadas como adjuntas, visando aumentar a segurança microbiológica de derivados lácteos.

Baseado nos resultados da capacidade acidificante e da atividade de bacteriocinas, o fermento láctico comercial da marca A na concentração de 1% e as culturas

bacteriocinogênicas na concentração de 0,5% foram escolhidos para serem utilizados nas próximas etapas do estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; MARTIN, S. E.; REGALADO, C. Anti-*Listeria monocytotgenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. **Current Microbiology**, v.51, p.110-115, 2005.

ANDRIGHETTO, C.; KNIFF, E.; LOMBARDI, A.; TORRIANI, S.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheese. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.303-316, 2001.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p.145-153, 2005a.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Effect of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. **Journal of Food Protection**, v.68, n.5, p.1026-1033, 2005b.

AYAD, E. H. E.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; EL-SODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from tradicional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v.21, p.715-725, 2004.

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

BOUTROU, R.; SEPULCHRE, A.; GRIPON, J. C.; MONNET, V. Simple tests for predicting the lytic behavior and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.9, p.2321-2328, 1998.

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

DAKO, E.; EL-SODA, M.; VUILLEMARD J. C.; SIMARD, R. E. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. **Food Research International**, v.28, n.5, p.503-509, 1995.

DE VUYST, L.; VANDAMME E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Blackie Academic & Professional: Londres, 1994. 539p.

ELOTMANI, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; ASSOBHEI, O.; MILLIÉRE, J. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan tradicional fermented milk. **Current Microbiology**, v.44, p.10-17, 2002.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O.; DORSSELAER, A. V.; BRINGEL, F.; HUBERT, J. C.; HASSELMANN, C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4381-4387, 1996.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; ASSOBHEI, O.; HASSELMANN, C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.521-526, 1998.

FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.255-270, 1996.

GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. **Biotechnology Letters**, v.19, p.1011-1014, 1997.

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

GARDE, S.; ÁVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis of Hispânico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* spp. *lactis* INIA 639. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.840-849, 2006.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v.12, p.291-299, 1995.

LEROY, F.; FOULQUIÉ MORENO, M. R.; DE VUYST L. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.235-240, 2003.

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

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilizacao no processamento de queijo minas frescal**. 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAM, T. M.; VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.1, p.73-84, 2002.

MORGAN, S. M.; O´SULLIVAN, L.; ROSS, R. P; HILL, C. The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. **International Dairy Journal**, v.12, p.985-993, 2002.

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

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

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

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.93-105, 2002.

TAGG, J. R.; MCGIVEN, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, v.21, n.5, p.943, 1971.

VILLANI, F.; COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo mozzarella cheese manufacture. **Annual Microbiology Enzimology**, v.44, p.97-105, 1994.

CAPÍTULO IV

ESTUDO COMPARATIVO DO DESENVOLVIMENTO DE *Bacillus cereus* K1-B041, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 E *Listeria monocytogenes* Scott A DURANTE CO-CULTIVO EM LEITE COM *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454

Resumo

O desenvolvimento de *Bacillus cereus* K1-B041, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Listeria monocytogenes* Scott A durante co-cultivo em leite desnatado com culturas produtoras de bacteriocinas e com fermento láctico foi analisado por 48h a 35ºC. *Lactobacillus plantarum* ALC 01 e *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 não influenciaram significativamente o desenvolvimento de *B. cereus* K1-B041 durante as primeiras 24h, porém o patógeno não foi detectado após 48h. O desenvolvimento de *B. cereus* foi afetado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 entre 6 e 12h de incubação com redução de até 1,9 log UFC/ml. Durante co-cultivo com fermento lático este patógeno não foi detectado após 24h. *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não promoveram inibição de *S. aureus* durante as 48h de incubação, contudo um decréscimo de 1,78 log UFC/ml foi observado após 12h de co-cultivo com *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. O fermento láctico promoveu reduções na população deste patógeno de até 2,61 log UFC/ml. Com relação a *L. monocytogenes* Scott A, foi observado redução de 3,52 log UFC/ml após 48h de co-cultivo com *Lb. plantarum* ALC 01. Já *E. faecium* FAIR-E 198 promoveu expressivo efeito inibitório sobre o patógeno durante todo o período de incubação. O decréscimo do número de células viáveis de *L. monocytogenes* foi de 1,85 log UFC/ml após 12h de co-cultivo com *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454. Após 48h de incubação com fermento láctico, o patógeno não foi mais detectado. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a eficiência da atividade antimicrobiana das culturas lácticas está estreitamente relacionada à espécie do microrganismo alvo.

1. INTRODUÇÃO

O risco potencial da presença de patógenos em produtos lácteos é uma preocupação constante na área de segurança alimentar tanto do setor industrial quanto dos órgãos governamentais. Alguns surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) têm sido relacionados ao consumo destes produtos (MEAD et al., 1999; CARMO, 2004). Embora a maioria destes surtos esteja vinculada ao consumo de produtos processados a partir de leite cru (DE BUYSER et al., 2001; CDC, 2001), a contaminação pós-processamento é um fator importante, sendo considerada uma etapa de risco para produtos lácteos.

A contaminação por *Bacillus cereus* é considerada um grande problema para a indústria de laticínios, uma vez que seus esporos não são eliminados durante a pasteurização. Seu desenvolvimento promove a agregação da camada de creme de leite pasteurizado pela ação de lecitinase, sendo responsável pela formação do coágulo doce, o qual ocorre sem redução do pH do leite. Além disso, relatos da literatura mencionam a capacidade deste microrganismo em causar toxinfecção de origem alimentar em concentrações de 10^3 a 10^4 UFC/g (ANDERSSON, RONNER e GRANUM, 1995). Rocha (2005) encontraram contagens superiores a 10^4 UFC/ml em leite pasteurizado.

Staphylococcus aureus é considerado um dos principais patógenos contaminantes de leite e derivados lácteos. A intoxicação alimentar causada por estafilococos está relacionada ao consumo de alimentos contendo enterotoxina termoestável. Lamaita e outros (2005) detectaram *Staphylococcus* sp. com contagens superiores a 10^5UFC/ml em 100% das 80 amostras de leite cru resfriado analisadas. Almeida e outros (2005) isolaram *S. aureus* em 64,55% das amostras de leite cru analisadas.

Listeria monocytogenes pode causar infecção uterina, meningite e septicemia com alta taxa de mortalidade em humanos (SCHLECH, 2000). A contaminação de produtos lácteos por este microrganismo já foi relatada como causa de surtos de origem alimentar nos Estados Unidos e Europa envolvendo produtos lácteos (DE BUYSER et al., 2001; LUNDEN, 2004; MEAD et al., 1999). Waak e outros (2002) detectaram *L. monocytogenes* em 19,6% das amostras de leite cru resfriado analisadas. No Reino Unido, este patógeno foi isolado de 13 amostras de manteiga (LEWIS et al., 2004).

As bactérias lácticas empregadas na fermentação de alimentos são capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, por meio da produção de vários agentes antimicrobianos (MAGRO et al., 2000). A acidificação é, provavelmente, o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica. Entretanto, outros compostos como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas podem exercer ação inibitória sobre diferentes grupos de microrganismos (DAESCHEL, 1989; HELANDER et al., 1997; HOLZAPFEl et al., 1995).

A inibição de *B. cereus* por bactérias lácticas e suas bacteriocinas em produtos lácteos tem sido reportada por alguns autores. Rossland e outros (2003) avaliaram a ação de *Lb. plantarum* 2741e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ML8 sobre *B. cereus* em leite. Este patógeno não foi detectado nas amostras contendo *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lb. plantarum*, respectivamente, após 24 e 48h. Muñoz e outros (2004) observaram significativa ação inibitória de enterocina AS-48 sobre *B. cereus* em leite e queijo, com reduções superiores a 5 log UFC/ml.

Quanto à ação sobre *S. aureus*, Lauková e outros (1999) observaram decréscimo do número de células viáveis do patógeno de 10^{10} UFC/ml para 10^{2} UFC/ml por ação da enterocina CCM 4231 após 24h de desenvolvimento em leite. Rilla e outros (2004) avaliaram a ação de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 sobre amostras contendo duas diferentes concentrações de *S. aureus* (1,8 x 10^{4} (A) e 7,2 x 10^{6} UFC/ml (B)). Após 24h de incubação, não detectaram *S. aureus* na amostra A, enquanto a amostra B apresentou contagem de 5,0 x 10^{4} UFC/ml.

Ennahar e outros (1998) e Bernbom e outros (2006) reportaram forte capacidade inibitória de linhagens de *Lb. plantarum*, produtoras de pediocina AcH, sobre *L. monocytogenes*, durante desenvolvimento associativo em meio de cultivo. Já Elotmani e outros (2002) obtiveram redução de 2 log UFC/ml desta espécie após 24h de desenvolvimento associativo com *Lc. lactis* subsp. *lactis* R9/2 e *E. faecium* R18 em leite.

No sentido de aumentar a qualidade e segurança de alimentos fermentados, o uso de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas como culturas iniciadoras ou fermentos lácticos tem sido estudado (MARTINEZ et al., 2005; MATTILA et al.,2003; MOTLAGH

et al., 1992). O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento dos microrganismos patogênicos *B. cereus* K1-B041, *S. aureus* ATCC 27154 e *L. monocytogenes* Scott A em desenvolvimento associativo em leite com as culturas produtoras de bacteriocinas e o fermento láctico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos

As culturas produtoras de bacteriocinas, *Lactobacillus plantarum* ALC 01, produtora de pediocina AcH e isolada de queijo Munster (ENNAHAR et al., 1996), *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, produtora de enterocina e isolada de queijo Feta (ACA-DC 1618, Universidade de Agricultura de Atenas, Atenas, Grécia) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, produtora de nisina (BCCM-LMG Bacteria Collection, Gent, Bélgica) foram mantidas a 4ºC em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA).

O fermento mesofílico tipo O (marca A) constituído por diferentes linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* foi mantido a -18ºC.

Os microrganismos patogênicos, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Bacillus cereus* K1-B041, foram fornecidos pelo Banco de Culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ)e mantidos a 4ºC em ágares inclinados *L. monocytogenes* foi mantida em ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Difco, Sparks, EUA), *S. aureus* em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) e *B. cereus* em ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA).

Para a realização dos testes, todas as culturas foram propagadas duas vezes em condições de cultivo adequadas a cada espécie por 16 a 24h.

2.2. Preparo e inoculação das amostras de leite

Em 200ml de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, SP) foram inoculados 0,5% das culturas produtoras de bacteriocinas ($10^6 – 10^7$ UFC/ml) ou 1% do fermento láctico (marca A) ($10^6 – 10^7$ UFC/ml). Em seguida, *B. cereus, L. monocytogenes* e *S. aureus* foram inoculados na concentração de aproximadamente 10^2 UFC/ml. Foi utilizado como controle amostras de leite inoculadas com cada espécie isoladamente. Então, o leite foi incubado a 35ºC por 48 horas.

2.3. Método de enumeração

Foram coletadas amostras, em intervalos regulares de 3h, durante as primeiras 12h e após 24 e 48h de incubação. Foram realizadas diluições decimais seriadas em solução aquosa de peptona 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foi realizado semeadura em superfície para determinação do número de células viáveis das culturas lácticas e dos microrganismos patogênicos. O Ágar M17 (Difco, Sparks, EUA) foi utilizado para *Lc. lactis* subsp. *lactis* e para o fermento láctico, com incubação a 30ºC/48h. O ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) foi empregado para enumeração de *Lb. plantarum* e o ágar KF *Streptococcus* (Difco, Sparks, EUA) para *E. faecium*, ambos incubados a 37ºC/48h. Para os microrganismos patogênicos foi utilizado ágar Oxford modificado (Difco, Sparks, EUA) para *L. monocytogenes*, ágar Baird-Parker (Difco, Sparks, EUA) para *S. aureus,* ambos incubados a 35ºC/48h e ágar Manitol Polimixina Gema de Ovo (MYP, Difco, Sparks, EUA) para *B. cereus*, com incubação a 30ºC/24h. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.4. Determinação do pH

O pH de cada amostra foi determinado após todas as coletas, utilizando pHmetro (Hanna Instruments HI9110, Singapura).

2.5. Determinação do título de bacteriocina

O título das bacteriocinas foi determinado pelo método de diluição crítica adaptado de Mayr-Harting e outros (1972). Após cada coleta, os cultivos foram centrifugados a

7.500g/15min a 4ºC (Centrifuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA), em seguida, o pH dos sobrenadantes foi corrigido para 6,5 com NaOH 1N (Merck, Darmstadt, Alemanha), então, estes foram esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22µm (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) (MORENO, 1995) e diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 7,0 (Merck, Darmstadt, Alemanha), utilizando placas de microtitulação. Então, 10µl de cada diluição foi depositada sobre placas contendo TSA (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (10^6-10^7 UFC/ml) das culturas indicadoras *S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041 e sobre placas contendo TSA-YE (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (10^6-10^7 UFC/ml) de *L. monocytogenes* Scott A. As placas foram incubadas a 35ºC/24h e o título de bacteriocina, expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/ml), foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100.

2.6. Análise estatística

A análise de variância paramétrica (ANOVA) e comparação de média pelo teste de Tuckey ao nível de significância de 95% foram realizadas com o auxílio do SAS (SAS Institute, Cary, NC) com a finalidade de avaliar estatisticamente os resultados obtidos a partir de diferentes culturas lácticas.

3. RESULTADOS

3.1. *Bacillus cereus* K1-B041

Na **Tabela 1** e **Figura 1** são apresentados os resultados do desenvolvimento de *B. cereus* K1-B041 em LDR 10% em cultivo puro e em co-cultivo com as culturas produtoras de bacteriocinas e o fermento láctico. Na amostra controle, o patógeno foi inoculado na proporção de 1,65 log UFC/ml, alcançando contagem média de 8,37 log UFC/ml após 48h de incubação a 35ºC.

As linhagens de *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não demonstraram efeito inibitório altamente significativo (<0,7 log UFC/ml) sobre *B. cereus* durante as primeiras 24h de incubação. Contudo, após 48h, foi observado redução da população desta linhagem a níveis abaixo do limite de detecção (<1 log UFC/ml).

No ensaio de desenvolvimento associativo com *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, no período de 6 a 12h, *B. cereus* apresentou contagem microbiana entre 1,04 e 1,94 log UFC/ml menor que o da amostra controle. Porém, após 12h, não foi mais observada influência de *Lc. lactis* subsp. *lactis* sobre o patógeno que atingiu contagem de 8,58 log UFC/ml após 24h de incubação, permanecendo semelhante à contagem apresentada pela amostra controle até o final do período de incubação (48h).

Não foi detectada atividade de bacteriocina sobre *B. cereus* por nenhuma das três culturas lácticas produtoras durante as 48h de incubação a 35ºC em leite desnatado.

Quando o fermento láctico foi empregado em associação ao *B. cereus,* a partir de 6h de incubação foi observada redução nas contagens do patógeno superiores a 1 log UFC/ml em relação à amostra controle, sendo que, após 24h, a contagem foi menor que 2 log UFC/ml e após 48h inferior a 1 log UFC/ml.

B. cereus não interferiu significativamente (P>0,05) no desenvolvimento das culturas lácticas, quando em associação com as mesmas.

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 2** e **Figura 2**, verifica-se que em cultivo puro *B. cereus* apresentou menor valor de pH (5,17) após 24h de incubação. Quando este patógeno foi associado a *Lb. plantarum* ALC 01 ou *E. faecium* foi observada diferença significativa (P<0,05) do pH do meio a partir de 9h de incubação. Contudo, esta diferença não ultrapassou 0,35 unidade até 24h e apenas após 48h foi encontrada diferença superior a 0,95 unidade em relação ao pH da amostra controle.

A curva de variação do pH da amostra contendo *B. cereus* em associação a *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi semelhante à apresentada pela amostra contendo apenas o patógeno, porém muito distinta da curva de acidificação apresentada pela amostra controle

de *Lc. lactis* subsp. *lactis*, onde o pH permaneceu acima de 6,10 durante todo o período de 48h.

Com relação aos perfis de acidificação utilizando fermento láctico tanto em cultura pura quanto em associação ao patógeno, estes apresentaram comportamento semelhante, podendo ser observado uma queda acentuada do pH iniciada após 3h de incubação, estabilizando-se ao redor de 4,27 após 24h.

Tabela 1. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Contagem microbiana (Log UFC/ml)**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
B. cereus	1,65^{c}*	3,54^{c}	6,19^{abcde}	8,12^{abc}	8,32^{abc}	8,59^{a}	8,37^{a}
B. cereus + fermento	1,54^{c}	3,24^{c}	4,54^{e}	7,08^{e}	7,18^{bc}	<2,00^{c}	<1,00^{c}
B. cereus + *Lb. plantarum*	1,74^{c}	3,48^{c}	6,02^{bcde}	7,53^{de}	8,14^{abc}	8,30^{a}	<1,00^{c}
B. cereus + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	1,65^{c}	3,36^{c}	5,15^{de}	6,18^{f}	6,91^{c}	8,58^{a}	8,30^{ab}
B. cereus + *E. faecium*	1,50^{c}	3,34^{c}	5,72^{cde}	7,44^{de}	8,15^{abc}	8,08^{a}	<1,00^{c}
Fermento	7,34^{a}	7,63^{ab}	8,18^{ab}	8,77^{a}	9,16^{a}	6,00^{b}	5,70^{b}
Fermento + *B. cereus*	7,52^{a}	7,59^{ab}	8,20^{ab}	8,70^{ab}	8,41^{ab}	6,62^{b}	6,26^{ab}
Lb. plantarum	7,17^{a}	7,17^{ab}	7,75^{abc}	7,77^{cde}	7,93^{abc}	8,17^{a}	7,93^{ab}
Lb. plantarum + *B. cereus*	7,00^{ab}	7,10^{ab}	7,61^{abc}	7,89^{cd}	8,16^{abc}	8,67^{a}	8,20^{ab}
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,52^{ab}	7,86^{a}	8,42^{ab}	8,34^{abc}	8,51^{ab}	8,04^{a}	7,06^{ab}
Lc. lactis subsp. *lactis* + *B. cereus*	6,52^{ab}	7,68^{ab}	8,20^{ab}	8,48^{abc}	8,26^{abc}	8,37^{a}	8,85^{a}
E. faecium	6,00^{b}	6,20^{b}	7,00^{abcd}	8,04^{abcd}	8,04^{abc}	8,35^{a}	8,13^{ab}
E. faecium + *B. cereus*	6,78^{b}	6,90^{ab}	7,30^{abcd}	8,00^{bcd}	8,10^{abc}	8,45^{a}	8,90^{a}

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

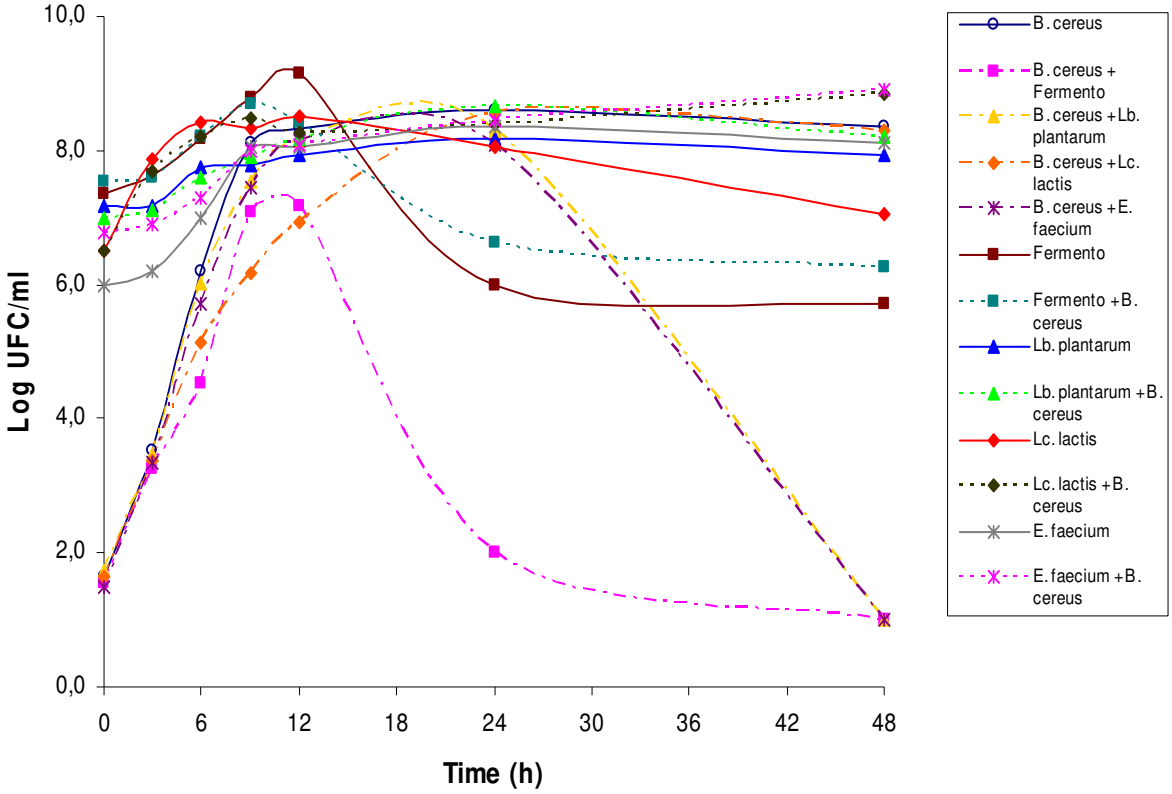

Figura 1. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Tabela 2. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Valores de pH**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
B. cereus	6,45[a]*	6,40[a]	6,40[a]	6,29[a]	5,95[ab]	5,17[c]	5,22[b]
B. cereus + fermento	6,45[a]	6,13[b]	5,50[b]	4,56[d]	4,40[e]	4,27[f]	4,28[c]
B. cereus + *Lb. plantarum*	6,45[a]	6,35[ab]	6,22[a]	6,04[bc]	5,75[cd]	4,83[e]	4,18[c]
B. cereus + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	6,45[a]	6,26[ab]	6,13[a]	6,12[ab]	6,08[ab]	5,06[d]	5,20[b]
B. cereus + *E. faecium*	6,45[a]	6,24[ab]	6,10[a]	5,84[c]	5,69[d]	4,88[e]	4,25[c]
Fermento	6,45[a]	6,17[ab]	5,52[b]	4,63[d]	4,43[e]	4,29[f]	4,30[c]
Lb. plantarum	6,45[a]	6,33[ab]	6,24[a]	6,06[bc]	5,92[bc]	5,67[b]	5,46[b]
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,45[a]	6,26[ab]	6,15[a]	6,12[ab]	6,13[a]	6,15[a]	6,40[a]
E. faecium	6,45[a]	6,33[ab]	6,23[a]	6,06[bc]	5,92[bc]	5,65[b]	5,35[b]

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

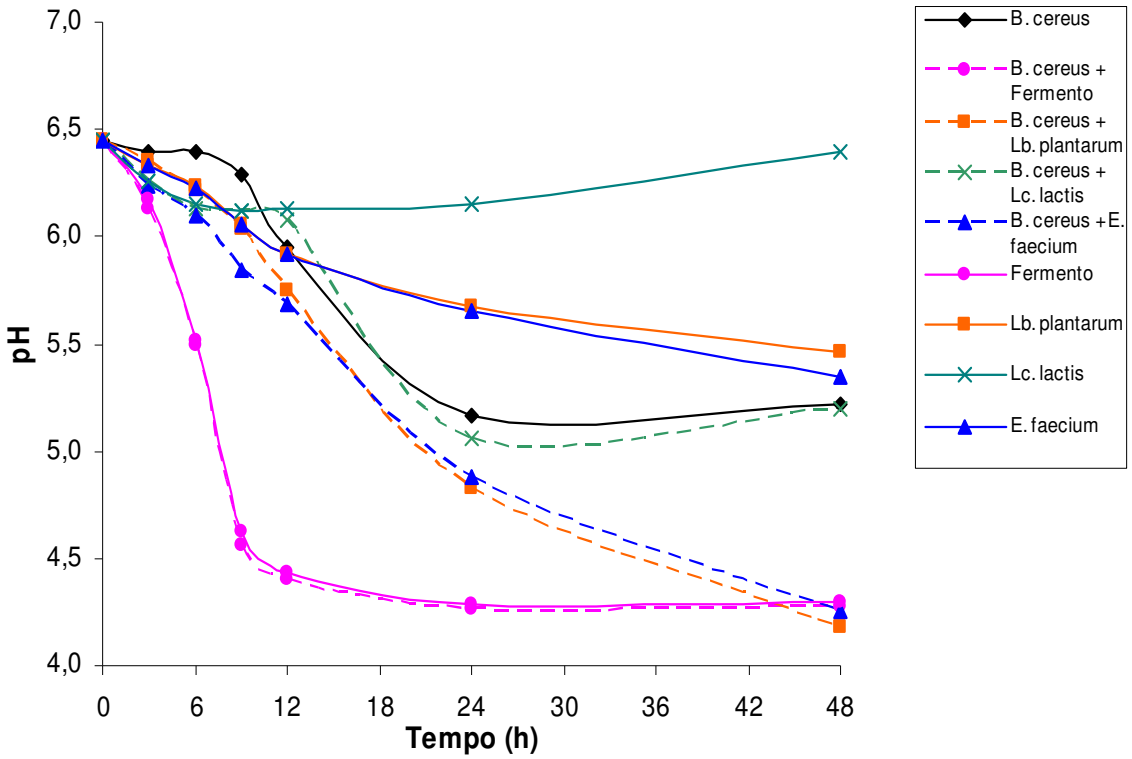

Figura 2. Variação do pH durante o desenvolvimento associativo de *B. cereus* K1-B041 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

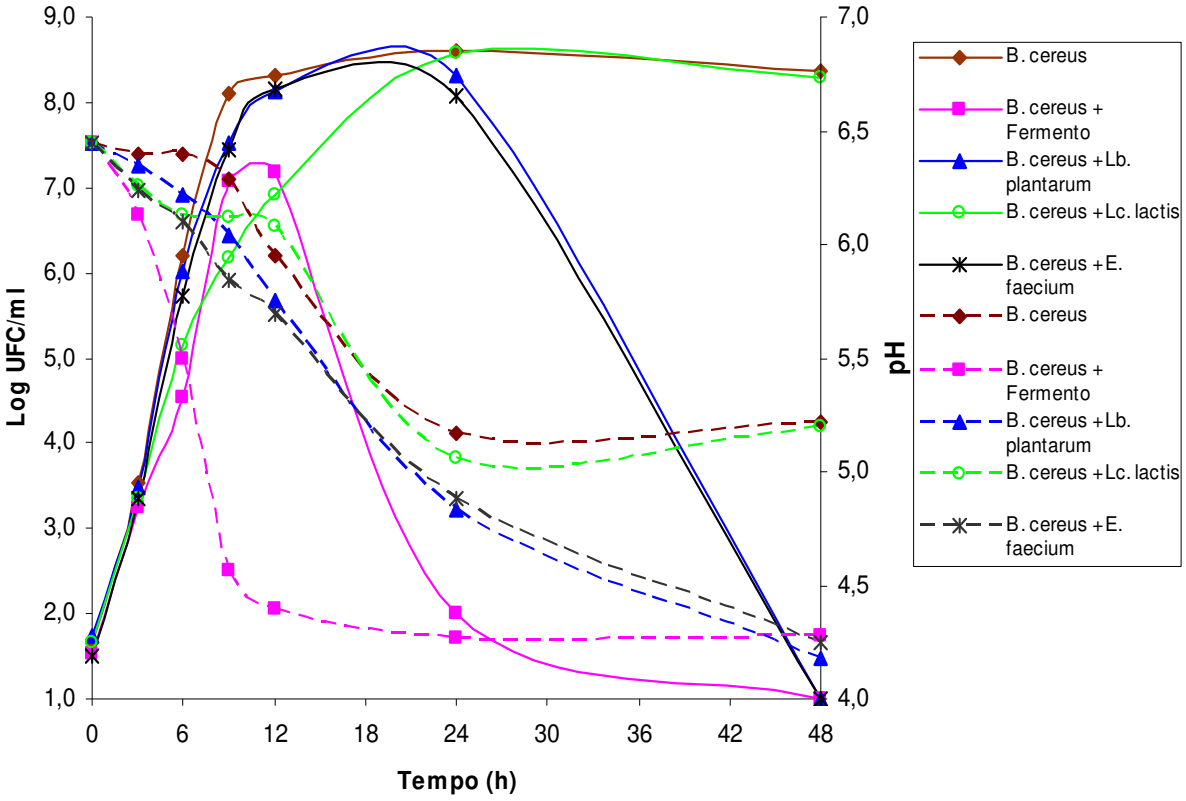

Figura 3. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *B. cereus* K1-B041 e variação do pH de LDR 10% durante 48h a 35ºC. Contagem microbiana (Log UFC/ml), -------- pH.

3.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 27154

A **Tabela 3** e a **Figura 4** mostram os resultados do desenvolvimento associativo em LDR 10% de *S. aureus* ATCC 27154 com as culturas produtoras de bacteriocinas e com o fermento láctico. A amostra controle, inicialmente inoculada com 2,79 log UFC/ml de *S. aureus,* apresentou população de 8,80 log UFC/ml após 24h de incubação a 35ºC.

As linhagens de *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não promoveram nenhum efeito inibitório significativo (P>0,05) sobre *S. aureus* durante as 48h de incubação. A máxima ação inibitória de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 foi observada após 12h, com redução de 1,78 log UFC/ml de *S. aureus* em relação ao controle. Contudo, após este período não foi mais notada inibição do desenvolvimento da população do patógeno, a qual alcançou 8,96 log UFC/ml após 48h de incubação, contagem esta superior em 1,86 log UFC/ml à apresentada pela amostra controle de *S. aureus* no mesmo período. O fermento láctico apresentou o maior efeito inibitório sobre o patógeno, com redução de 2,61 log UFC/ml após 48h de incubação (**Figura 6**).

Conforme ocorrido com *B. cereus*, também não foi detectada atividade de bacteriocinas produzidas pelas três culturas lácticas analisadas sobre *S. aureus* durante todo o período de incubação em LDR 10% a 35ºC.

Quanto à influência de *S. aureus* ATCC 27154 sobre o desenvolvimento das culturas lácticas, após 24h de incubação, as contagens de *Lb. plantarum* ALC 01 e *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 quando em co-cultivo com *S. aureus* foram estatisticamente significativas (P<0,05) e maiores que as contagens das amostras controles, contudo a diferença não ultrapassou 1,4 log UFC/ml. O desenvolvimento de *E. faecium* FAIR-E 198 não sofreu influência de *S. aureus* durante todo o período de incubação (**Tabela 3**).

Na **Tabela 4** e na **Figura 5** observam-se os resultados da variação do pH durante o desenvolvimento associativo de *S. aureus* com as culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e o fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC. Todas as amostras contendo as três culturas bacteriocinogênicas em associação com *S. aureus* demonstraram

resultado semelhante à amostra controle deste patógeno, com uma queda acentuada do pH (>1,5 unidades) no período entre 12 e 24h de incubação, atingindo valores ao redor de 4,7. Comportamento este muito diferente do apresentado pelas culturas bacteriocinogênicas quando cultivadas isoladamente, *E. faecium* e *Lb. plantarum* mostraram acidificação mais lenta com pH entre 5,5 e 5,3 após 24 e 48h, respectivamente, já *Lc. lactis* subsp. *lactis* manteve o pH acima de 6,0 durante as 48h de incubação.

Para o co-cultivo com o fermento láctico foi observada diferença significativa (P<0,05) do pH do leite entre 9 e 12h de incubação com relação à amostra controle de *S. aureus.*

Tabela 3. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Contagem microbiana (Log UFC/ml)**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
S. aureus	2,79^{d}*	4,23^{c}	6,42^{ef}	8,08^{abc}	8,68^{abc}	8,80^{abcd}	7,10^{ab}
S. aureus + fermento	2,85^{d}	3,99^{c}	5,66^{f}	6,45^{c}	6,29^{e}	6,64^{e}	4,49^{b}
S. aureus + *Lb. plantarum*	2,88^{d}	4,42^{c}	6,41^{ef}	7,95^{abc}	8,32^{abc}	8,93^{abcd}	8,26^{a}
S. aureus + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	2,99^{d}	4,10^{c}	5,59^{f}	6,44^{c}	6,90^{de}	8,99^{abc}	8,96 ^{a}
S. aureus + *E. faecium*	2,83^{d}	4,30^{c}	6,48^{def}	8,41^{ab}	8,98^{ab}	8,96^{abc}	7,76 ^{a}
Fermento	8,00^{a}	7,77^{ab}	8,76^{a}	9,21^{a}	8,97^{ab}	8,91^{abcd}	7,57 ^{a}
Fermento + *S. aureus*	7,34^{ab}	7,27^{ab}	8,33^{abc}	7,75^{abc}	9,11^{a}	9,25^{ab}	7,64 ^{a}
Lb. plantarum	6,69^{bc}	6,96^{ab}	7,30^{cde}	7,02^{bc}	7,94^{bcd}	7,90^{d}	8,08 ^{a}
Lb. plantarum + *S. aureus*	6,85^{bc}	6,99^{ab}	7,57^{bcd}	7,82^{abc}	7,85^{cd}	9,28^{ab}	8,49 ^{a}
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,73^{bc}	7,91^{a}	8,55^{ab}	8,13^{abc}	8,33^{abc}	8,51^{cd}	9,30 ^{a}
Lc. lactis subsp. *lactis* + *S. aureus*	6,65^{bc}	7,63^{ab}	8,40^{abc}	7,91^{abc}	8,13^{abc}	9,65^{a}	8,97 ^{a}
E. faecium	6,22^{c}	7,10^{ab}	7,38^{cde}	7,67^{abc}	8,07^{abc}	8,19^{cd}	8,22 ^{a}
E. faecium + *S. aureus*	6,35^{c}	6,63^{b}	6,99^{de}	7,54^{abc}	7,78^{cd}	8,15^{cd}	8,22 ^{a}

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

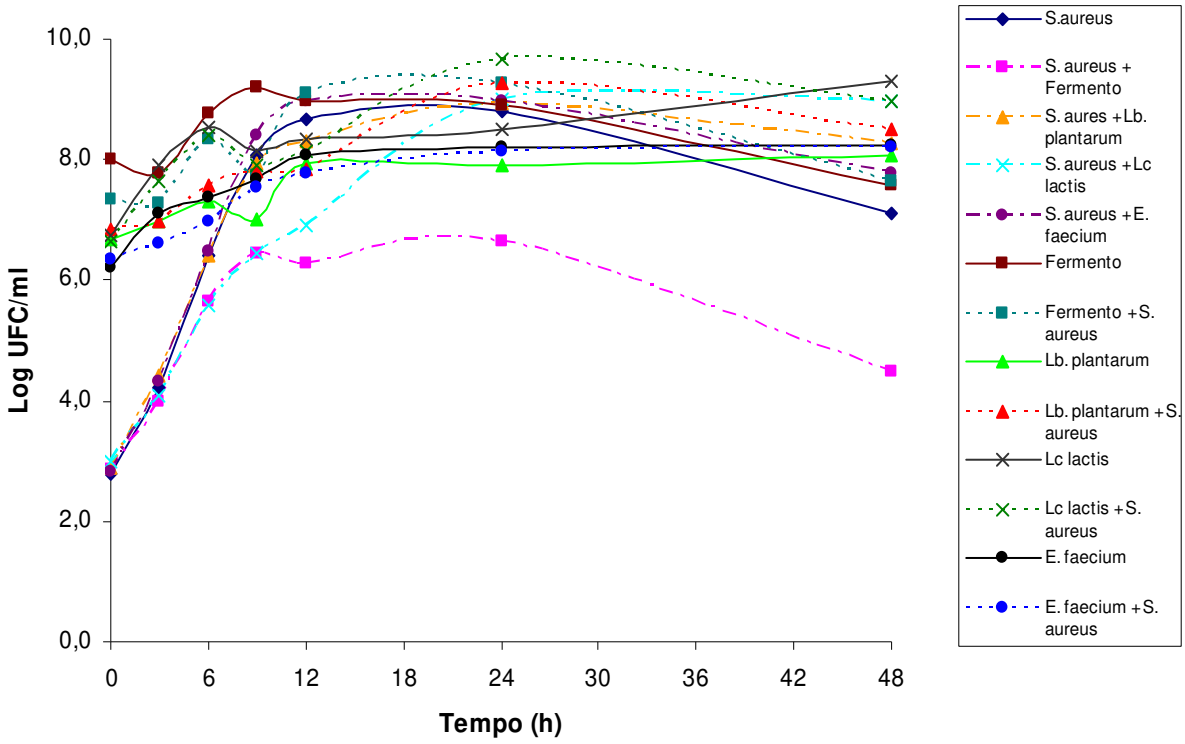

Figura 4. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Tabela 4. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Valores de pH**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
S. aureus	6,46^{a}*	6,42^{a}	6,44^{a}	6,31^{a}	6,37^{a}	4,70^{c}	4,98^{bcd}
S. aureus + *Lb. plantarum*	6,37^{e}	6,39^{a}	6,32^{a}	6,21^{a}	6,11^{a}	4,53^{c}	4,74^{cd}
S. aureus + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	6,46^{a}	6,35^{a}	6,20^{a}	6,09^{ab}	6,02^{a}	4,70^{c}	4,95^{bcd}
S. aureus + *E. faecium*	6,41^{d}	6,36^{a}	6,32^{a}	6,22^{a}	6,12^{a}	4,71^{c}	4,64^{d}
S. aureus + fermento	6,44^{c}	6,43^{a}	6,17^{a}	5,43^{b}	4,81^{b}	4,74^{c}	4,84^{bcd}
Fermento	6,45^{b}	6,25^{a}	5,73^{b}	4,96	4,67^{b}	4,48^{c}	4,48^{d}
Lb. plantarum	6,45^{b}	6,33^{a}	6,23^{a}	6,03^{ab}	5,82^{a}	5,56^{ab}	5,36^{b}
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,45^{b}	6,27^{a}	6,16^{ab}	6,08^{ab}	6,08^{a}	6,09^{a}	6,23^{a}
E. faecium	6,45^{b}	6,29^{a}	6,17^{a}	5,95^{ab}	5,77^{a}	5,51^{b}	5,25^{bc}

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

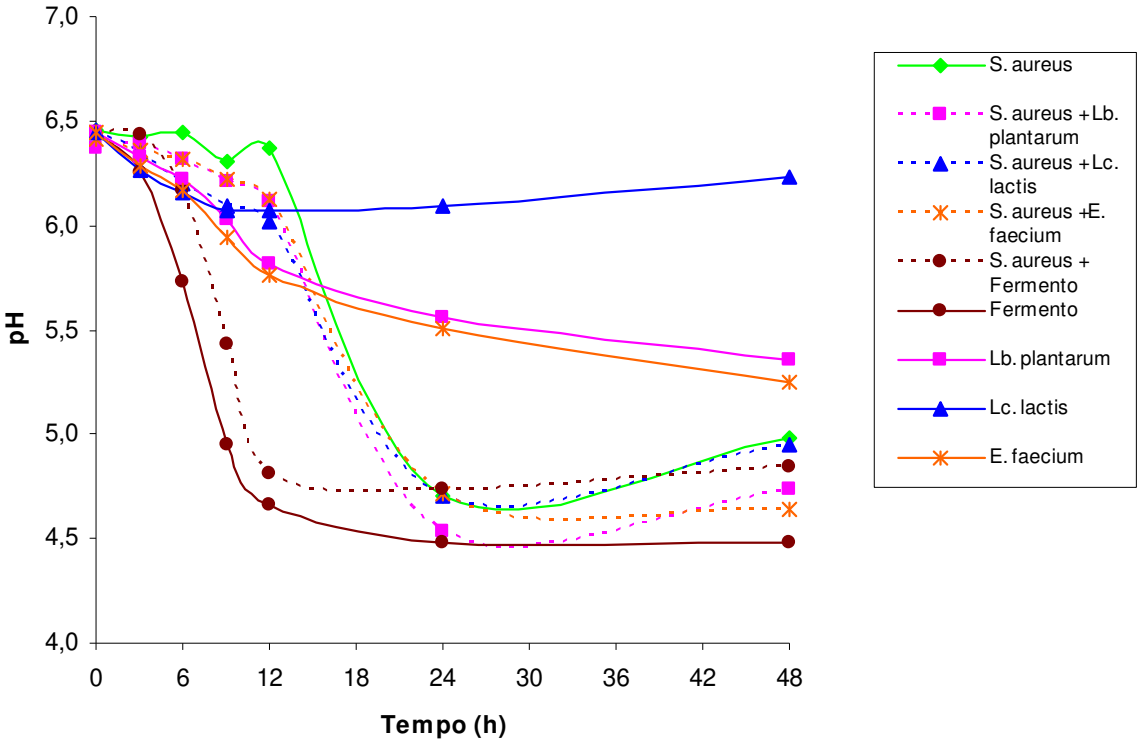

Figura 5. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *S. aureus* ATCC 27154 com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

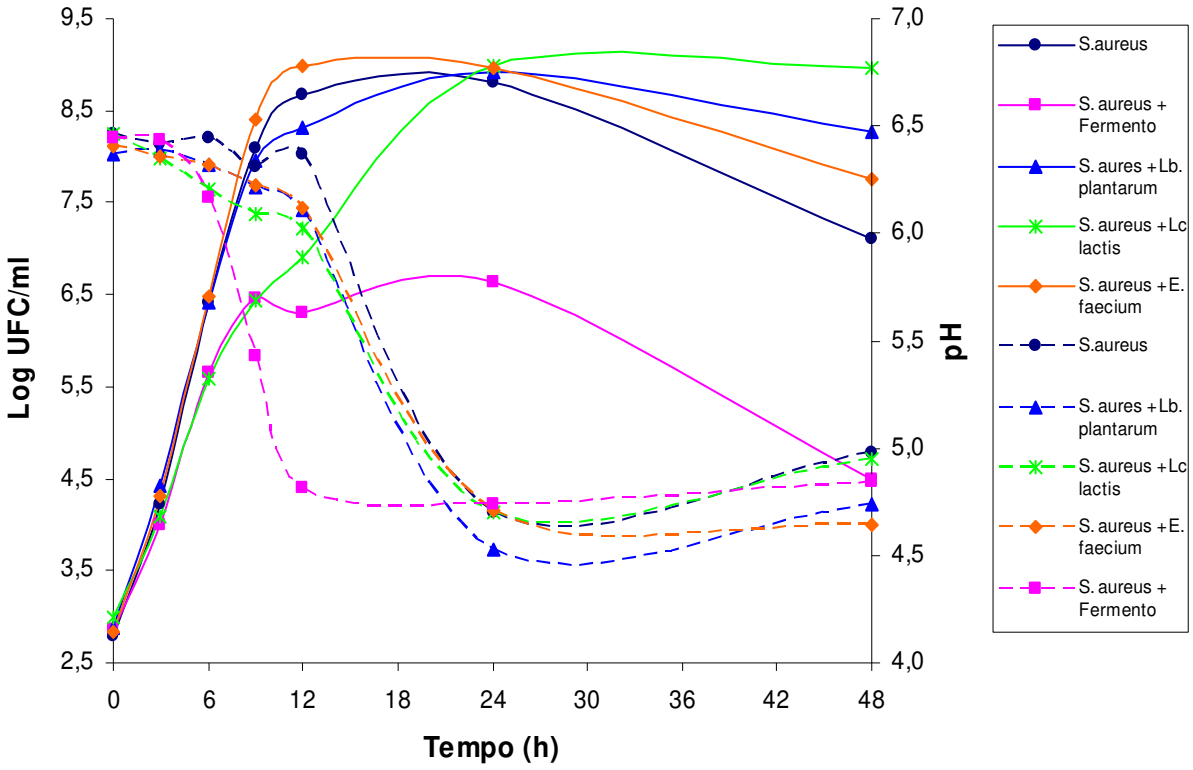

Figura 6. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *S. aureus* ATCC 27154 e variação do pH de LDR 10% por 48h a 35ºC. ——— Contagem microbiana (Log UFC/ml), ------ pH.

3.3. *Listeria monocytogenes* Scott A

Na **Tabela 5** e na **Figura 7** estão apresentadas as contagens microbianas de *L. monocytogenes* Scott A durante desenvolvimento associativo em LDR 10% com culturas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico. A amostra controle inicialmente inoculada com 2,63log UFC/ml, após 48h de incubação a 35ºC, atingiu 7,26 log UFC/ml.

Todas as culturas bacteriocinogênicas promoveram inibição do desenvolvimento de *L. monocytogenes* Scott A, dentre as quais a mais ativa foi *E. faecium* FAIR-E 198. Nas primeiras 3h de incubação pôde-se verificar uma ação bactericida desta cultura sobre o patógeno, reduzindo a contagem inicial de 2,19 para 1,15 log UFC/ml. Após este período, as células remanescentes reiniciaram desenvolvimento, alcançando contagem de 3,68 log UFC/ml após 48h de incubação. Foi detectada atividade de bacteriocina (100UA/ml) produzida por esta cultura láctica apenas na amostra coletada após 6h de incubação.

Utilizando *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 a maior inibição (1,85 log UFC/ml) foi observada após 12h de incubação e a produção de bacteriocina com atividade de 100UA/ml foi detectada apenas após a sexta hora de incubação.

Empregando *Lb. plantarum* ALC 01 obteve-se inibição significativa ($P<0,05$) do desenvolvimento de *L. monocytogenes* Scott A a partir de 12h de incubação, com redução de 3,52 log UFC/ml após 48h. Quanto à atividade de bacteriocina produzida por esta cultura láctica sobre *L. monocytogenes* Scott A, foi detectada atividade a partir de 3h de incubação (100UA/ml), de 12 a 24h a atividade foi de 400UA/ml e após este período foi observada redução para 100UA/ml.

O fermento láctico demonstrou atividade inibitória significativa ($P<0,05$) sobre *L. monocytogenes* Scott A após 12h de incubação, com redução de 1,99 log UFC/ml, resultando, após 48h, em população abaixo do limite de detecção (< 1,0 log UFC/ml), conforme **Figura 9**.

L. monocytogenes Scott A não influenciou o desenvolvimento das culturas lácticas avaliadas, conforme **Tabela 5** e **Figura 7**.

A **Tabela 6** e a **Figura 8** mostram a variação do pH durante o desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com as culturas bacteriocinogênicas e o fermento láctico em LDR 10%. Comparando os resultados com a amostra contendo apenas o patógeno, pode-se observar diferença significativa (P<0,05) do pH do leite nos períodos entre 9 e 24h e entre 12 e 48h para *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e *Lb. plantarum* ALC 01, respectivamente. Contudo, a amostra com *E. faecium* FAIR-E 198 apresentou valores de pH significativamente diferentes (P<0,05) da amostra controle durante as 48h de desenvolvimento associativo. As curvas de acidificação das amostras com fermento láctico demonstraram queda acentuada dos valores do pH após 6h, atingindo pH de 4,85 após 12h de incubação.

Tabela 5. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Contagem microbiana (Log UFC/ml)**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
L. monocytogenes	2,63^{c}*	3,05^{c}	4,28^{d}	5,30^{d}	6,36^{d}	7,00^{bcd}	7,26^{ab}
L. monocytogenes + fermento	2,75^{c}	2,95^{c}	3,72^{d}	4,40^{de}	4,37^{ef}	4,15^{e}	<1,00^{d}
L. monocytogenes + *Lb. plantarum*	2,51^{c}	2,99^{c}	3,50^{d}	4,07^{de}	4,46^{e}	5,51^{de}	3,74^{c}
L. monocytogenes + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	2,08^{c}	3,02^{c}	3,72^{d}	4,34^{de}	4,51^{e}	5,79^{cde}	5,59^{bc}
L. monocytogenes + *E. faecium*	2,19^{c}	1,15^{d}	2,05^{e}	3,06^{e}	3,07^{f}	3,89^{e}	3,68^{c}
Fermento	6,71^{ab}	7,46^{ab}	8,68^{a}	9,60^{a}	9,27^{a}	9,35^{a}	8,73^{a}
Fermento + *L. monocytogenes*	6,70^{ab}	7,62^{ab}	8,08^{abc}	9,23^{ab}	9,13^{ab}	9,32^{a}	7,93^{ab}
Lb. plantarum	7,16^{a}	7,18^{ab}	7,48^{abc}	7,85^{bc}	7,87^{bc}	7,64^{abc}	7,66^{ab}
Lb. plantarum + *L. monocytogenes*	7,06^{ab}	6,94^{ab}	7,48^{abc}	7,46^{c}	7,59^{cd}	7,50^{abc}	7,86^{ab}
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,63^{ab}	7,29^{ab}	8,03^{abc}	8,13^{abc}	8,11^{abc}	8,53^{ab}	8,17^{a}
Lc. lactis subsp. *lactis* + *L. monocytogenes*	6,66^{ab}	8,12^{a}	8,42^{ab}	7,99^{abc}	8,47^{abc}	8,88^{ab}	8,65^{a}
E. faecium	6,00^{b}	6,20^{b}	7,00^{bc}	7,43^{c}	7,78bc	7,60^{abc}	7,32^{ab}
E. faecium + *L. monocytogenes*	6,15^{ab}	6,49^{b}	7,28^{c}	7,60^{bc}	7,80^{bc}	7,55^{abc}	7,59^{ab}

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

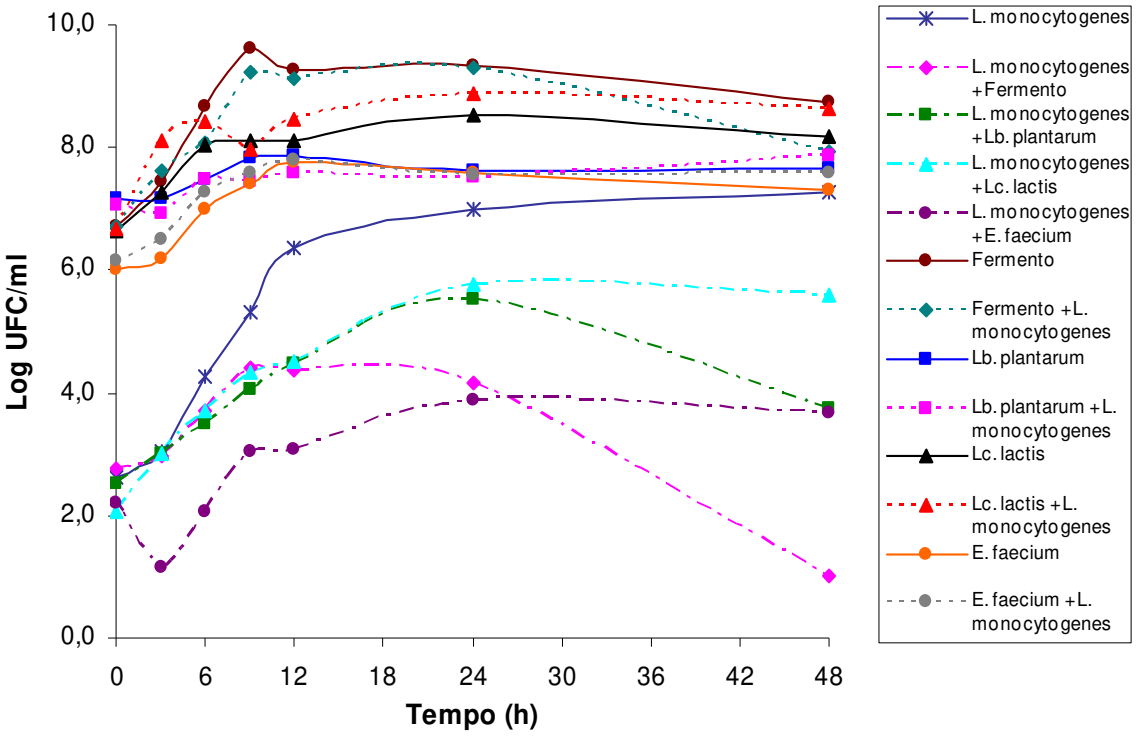

Figura 7. Contagens microbianas durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Tabela 6. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

Cultura	**Valores de pH**						
	0h	**3h**	**6h**	**9h**	**12h**	**24h**	**48h**
L. monocytogenes	6,47[a]*	6,47[a]	6,44[a]	6,43[a]	6,43[a]	6,35[a]	6,08[a]
L. monocytogenes + *Lb. plantarum*	6,45[ab]	6,42[ab]	6,26[a]	6,11[ab]	5,94[b]	5,55[c]	5,34[bc]
L. monocytogenes + *Lc. lactis* subsp. *lactis*	6,47[a]	6,37[ab]	6,17[a]	6,05[bc]	6,03[b]	6,04[b]	5,89[ab]
L. monocytogenes + *E. faecium*	6,41[b]	6,31[b]	6,18[a]	5,95[bc]	5,89[bc]	5,42[c]	5,27[bc]
L. monocytogenes + fermento	6,47[a]	6,36[ab]	5,99[a]	5,20[d]	4,85[d]	4,74[d]	4,85[c]
Lb. plantarum	6,45[ab]	6,38[ab]	6,06[a]	5,86 [bc]	5,85[bc]	5,54[c]	5,34[bc]
Lc. lactis subsp. *lactis*	6,45[ab]	6,35[b]	5,99[a]	6,06[bc]	6,03[b]	6,04[b]	6,04[a]
E. faecium	6,45[ab]	6,30[b]	6,03[a]	5,73[c]	5,59[c]	5,28[c]	5,08[c]
Fermento	6,44[ab]	6,38[ab]	6,04[a]	5,28[d]	4,87[d]	4,70[d]	4,75[c]

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)

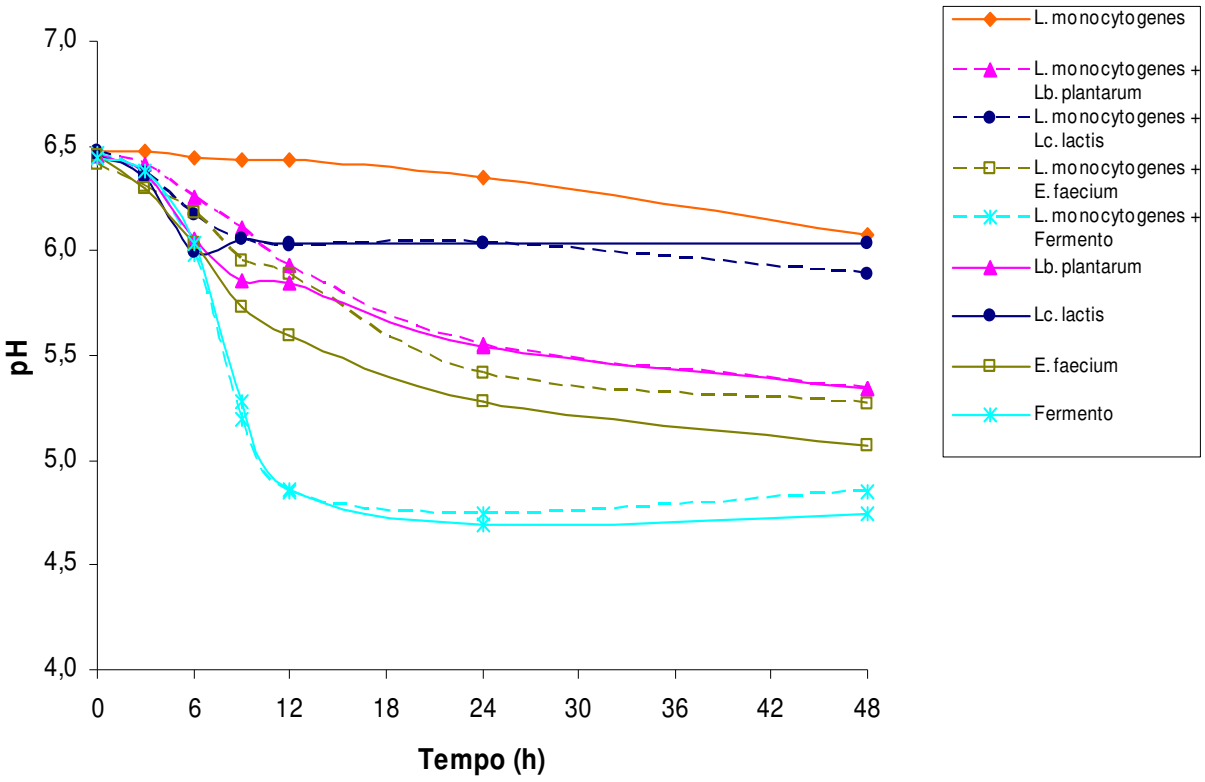

Figura 8. Variação do pH durante desenvolvimento associativo de *L. monocytogenes* Scott A com culturas lácticas produtoras de bacteriocinas e fermento láctico em LDR 10% por 48h a 35ºC.

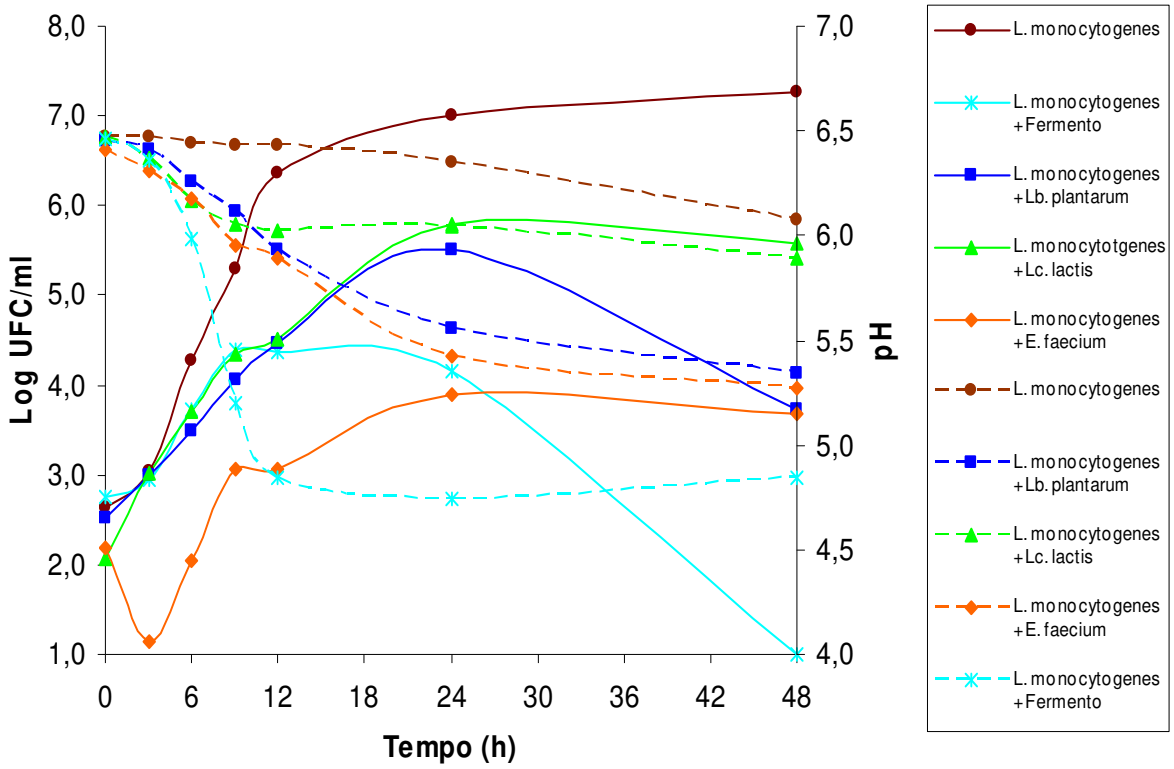

Figura 9. Efeito de culturas bacteriocinogênicas e fermento láctico sobre o desenvolvimento de *L. monocytogenes* Scott A e variação do pH de LDR 10% durante 48h a 35ºC. ——— Contagem microbiana (Log UFC/ml), ------ pH.

4. DISCUSSÃO

O uso de bacteriocinas ou culturas bacteriocinogênicas na biopreservação de alimentos pode ser considerado um obstáculo adicional ao desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, contribuindo para o aumento da segurança microbiológica e reduzindo o risco de desenvolvimento de alguns deteriorantes. Entretanto, muitas espécies apresentam variações na susceptibilidade e na capacidade de desenvolvimento de resistência às bacteriocinas.

Neste estudo, os resultados observados durante co-cultivo em leite, referentes à ação inibitória exercida pelas culturas bacteriocinogênicas sobre os patógenos avaliados, condizem com o espectro de ação obtido no capítulo II.

Lb. plantarum ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não exerceram atividade inibitória significativa sobre *B. cereus* K1-B041 durante as primeiras 24h de incubação. Grande e outros (2006) observaram redução de 4,7 log UFC/g na população de *B. cereus* em amostras de arroz suplementadas com enterocina AS-48.

A redução da população de *B. cereus* K1-B041 para níveis inferiores a 1 log UFC/ml, observada após 48h de desenvolvimento associativo com *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, pode ser atribuída à redução do pH para índices abaixo de 4,4. Este mesmo fenômeno foi observado utilizando fermento láctico após 24h de incubação (**Figura 3**). De acordo com Goepfert e outros (1972), o pH mínimo para o desenvolvimento de *B. cereus* em meio de cultura é aproximadamente 4,9. Wong e Chen (1988) reportaram que o desenvolvimento de *B. cereus* ficaria prejudicado quando o pH do meio de cultivo fosse inferior a 5,0. Segundo Rossland e outros (2003), um rápido decréscimo do pH durante o início da fase logarítmica estaria fortemente relacionado à inibição do patógeno.

A ação exercida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 sobre *B. cereus* observada entre 6 e 12h de incubação, onde se notou menor velocidade de desenvolvimento (μ) e conseqüentemente aumento do tempo de duração da fase logarítmica de 6 para 24h em relação à amostra controle do patógeno, não pode ser atribuída à ação do pH, uma vez que a curva de acidificação da amostra mista foi semelhante à amostra contendo apenas *B. cereus*

(**Figura 3**). Como não foi detectada atividade de bacteriocina sobre o patógeno, a inibição do mesmo poderia estar relacionada à exclusão competitiva. Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram relatados por Olasupo e outros (1999) que ao utilizarem uma linhagem de *Lc. lactis* subps. *lactis* BFE 1500 produtora de nisina A observaram inibição do desenvolvimento de *B. cereus* por 12h. Contudo, Rossland e outros (2003) não detectaram *B. cereus* nas amostras de leite contendo *Lc. lactis* subsp. *lactis* ML8 e *Lb. plantarum* 2741 após 24 e 48h, respectivamente.

S. aureus ATCC 27154 demonstrou ser o microrganismo mais resistente a todas as culturas avaliadas neste estudo. *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 não apresentaram atividade de bacteriocina, nem qualquer outro efeito inibitório sobre este patógeno. Lauková e outros (1999) estudaram o efeito de enterocina CCM 4231 sobre o desenvolvimento de *S. aureus* em leite e observaram redução do número de células viáveis do patógeno de 10^{10} UFC/ml (controle) para 10^{2} UFC/ml (amostra com enterocina) após 24h de incubação.

O efeito inibitório exercido por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 sobre *S. aureus* entre 6 e 12h de incubação resultou em redução da velocidade de desenvolvimento do patógeno e aumento do tempo de duração da fase logarítmica. Contudo, não impediu que este atingisse contagens superiores a 8 log UFC/ml após 24h de incubação. Rilla e outros (2004) analisaram a ação de *Lc. lactis* subsp. *lactis* IPLA 729 sobre *S. aureus* CECT 4013 inoculado a 1,8 x 10^{4} (A) e a 7,2 x 10^{6} UFC/ml (B). Após 24h de incubação, não detectaram *S. aureus* na amostra A e a amostra B apresentou contagem de 5,0 x 10^{4} UFC/ml.

O fermento láctico apresentou o melhor desempenho sobre *S. aureus* e a população do patógeno não ultrapassou 6,7 log UFC/ml ao longo das 48h de incubação, com reduções de até 2,6 log UFC/ml. Segundo Rilla e outros (2004) o pH parece não exercer efeito predominante sobre o desenvolvimento de *S. aureus* durante curtos períodos de incubação. Portanto, a ação inibitória promovida pelo fermento láctico sobre *S. aureus* poderia estar relacionada a algum composto antimicrobiano produzido por ele e não pelas culturas bacteriocinogênicas ou então, por simples exclusão competitiva.

L. monocytogenes Scott A demonstrou ser o microrganismo mais sensível, dentre os três avaliados, às culturas produtoras de bacteriocinas em questão. As culturas bacteriocinogênicas *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e *Lb. plantarum* ALC 01 e o fermento láctico apresentaram comportamento semelhante sobre *L. monocytogenes* Scott A durante as primeiras 12h de incubação. A ação bactericida do fermento láctico sobre o patógeno, observada após 48h, poderia ser atribuída à produção de ácido láctico ou outros compostos com poder antimicrobiano ou à exclusão competitiva. Elotmani e outros (2002) atribuíram à redução do pH o efeito bacteriostático promovido por uma linhagem de *Lc. lactis* subsp. *lactis* não produtora de bacteriocina sobre *L. monocytogenes.*

Embora tenha sido detectada atividade de bacteriocina produzida por *Lb. plantarum* ALC 01 durante 45 das 48h de incubação, esta cultura promoveu inibição de *L. monocytogenes* Scott A superior a 2 ciclos logarítmicos apenas após 48h. Ennahar e outros (1998) observaram redução da população de *L. monocytogenes* de 10^8 UFC/ml para 10^2 UFC/ml na amostra contendo *Lb. plantarum* WHE 92, produtor de pediocina AcH após 4 dias de incubação em caldo MRS a 15ºC.

Mesmo tendo apresentado atividade de bacteriocina apenas na coleta referente a 6h de incubação, dentre as culturas bacteriocinogênicas, *E. faecium* FAIR-E 198 demonstrou o melhor desempenho sobre *L. monocytogenes* Scott A, com inibição significativa ($P<0,05$) durante todo o período de incubação e reduções superiores as relatadas por Rodrigues e outros (1997) e Elotmani e outros (2002).

O efeito bactericida inicialmente promovido por *E. faecium* FAIR-E 198 sobre *L. monocytogenes* Scott A e a retomada do desenvolvimento do patógeno pode estar relacionado à produção de quantidade insuficiente de bacteriocina para inibir todas as células do microrganismo alvo, fenômeno este mencionado por Muriana (1996) utilizando outras culturas bacteriocinogênicas.

Quanto à detecção de bacteriocinas, Lauková e outros (1999) observaram efeito inibitório sobre *S. aureus* na amostra adicionada de enterocina, porém não detectaram atividade desta bacteriocina no meio. Segundo Muñoz e outros (2004), a baixa atividade de enterocina detectada por eles poderia estar relacionada a condições de desenvolvimento da

cultura bacteriocinogênica em leite, à interação da bacteriocina a compostos do leite ou à baixa liberação das moléculas de bacteriocina adsorvidas às células.

5. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, pôde-se observar uma variação significativa da ação inibitória exercida pelas culturas bacteriocinogênicas e pelo fermento láctico sobre os três patógenos Gram-positivos avaliados. *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 apresentaram atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* Scott A e *B. cereus*, sendo que para este último a inibição foi relacionadas à acidificação do meio. Já *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 demonstrou espectro de ação mais amplo, promovendo desenvolvimento mais lento das três espécies patogênicas. O fermento láctico, por sua vez, apresentou maior redução dos patógenos no final do período de incubação, devido a maior acidificação do meio. Portanto, dentro do contexto da tecnologia de barreiras, as linhagens produtoras de bacteriocinas podem ser utilizadas em alimentos fermentados como um mecanismo de imunidade "natural", interagindo com outras barreiras para aumentar a segurança destes alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. C.; MENDES, C. P. A.; SILVA, D. B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite de latões. **Higiene Alimentar**, v.19, n, 134, p.81-87, 2005.

ANDERSSON, A.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.145-155, 1995.

CARMO, L S. Casos de intoxicação alimentar por toxinas estafilocócicas. In: **Seminário de Segurança dos Alimentos**. Vassouras, 2004. CD-ROM. Produzido por SENAI-RJ.

CDC. Center for Disease Control. Outbreak of listeriosis associated with homemade mexican-style cheese – North Carolina, October 2000 – January 2001. **MMWR**, v.50, n.26, p560-562, 2001. Disponível em : <http//www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm 5026a3.htm>. Acesso em 28 jul. 2004.

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bactéria for use as food preservatives. **Food Technology**, v.43, p.164-167, 1989.

DE BUYSER, M. L., DUFOUR, B., MARIE, M., LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.1-17, 2001.

ELOTMANI, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; ASSOBHEI, O.; MILLIÉRE, J. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan tradicional fermented milk. **Current Microbiology**, v.44, p.10-17, 2002.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O.; DORSSELAER, A. V.; BRINGEL, F.; HUBERT, J. C.; HASSELMANN, C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4381-4387, 1996.

ENNAHAR, S.; ASSOBHEI, O.; HASSELMANN, C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE92 a pediocin AcH producer. **Journal of Food Protection**, v.61, n.2, p.186-191, 1998.

GOEPFERT, J. M.; SPIRA, W. M.; KIM, H. U. *Bacillus cereus* food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v.35, p.213-227, 1972.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; MARTINEZ-CAÑAMERO, M.; GALVEZ, A. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocina AS-48. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.185-194, 2006.

HELANDER, I. M., VON WRIGHT, A., MATTILASANDHOLM, T. M. Potential of lactic and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.146-150, 1997.

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

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, v.16, p.93-99, 1999.

LEWIS, H. C.; LITTLE, C. L.; ELSON, R.; GREENWOOD, M.; GRANT, K. A.; McLAUCHILIN, J. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in butter from United Kingdom production, retail and catering premises. **Journal of Food Protection**, v.69, p.1518-1526, 2006.

LUNDEN, J. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal Dairy Science**, v.87, suppl. 1:E6-E12, 2004.

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

MARTINEZ, B.; BRAVO, D.; RODRIGUEZ, A. Consequences of the development of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v.68, p.2383-2388, 2005.

MATTILA, K.; SARIS, P.; TYOPPONEN, S. Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausage after treatment with pediocina AcH. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, p.281-286, 2003.

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

MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M., TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emergency Infection Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilização no processamento de queijo minas frescal**. 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MUÑOZ, A., MAQUEDA, M., GÁLVEZ, A., MARTINÉZ-BUENO, M., RODRIGUEZ, A., VALDIVIA, E. Biocontrol of psychrotrophic enteroxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard cheeseby na enterococcal strain-producing enterocin AS-48. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1517-1521, 2004.

MURIANA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection,** Suppl., v.56, p.54-63, 1996.

OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; NARBAD, A.; DODD, H.; HOLZAPFEL, W. H. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from Wara, a tradicional Nigerian cheese product. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.141-152, 1999.

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

ROCHA, J. A. K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo Minas Frescal.** 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RODRIGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes*in a modeldairy system. **Journal of Food Protection**, v.60, p.28-32, 1997.

ROSSLAND, E.; BORGE, G. I. A.; LANGSRUD, T.; SORHAUG, T. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, p.205-212, 2003.

SCHLECH, W. F. Foodborne listeriosis. **Clinical Infection Disease**, v.31, p.770-775, 2000.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L. Prevalence and fngerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.68, n.7, p.3366-3370, 2002.

WONG, H. C., CHEN, C. L. F. Growth, germination and toxigenic activity of Bacillus cereus in milk products. **Journal of Food Protection**, v.51, p.707-710, 1988.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DO EMPREGO DAS CULTURAS BACTERIOCINOGÊNICAS *Lactobacillus plantarum* ALC 01, *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 E *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 COMO ADJUNTAS EM QUEIJO MINAS FRESCAL PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS GRAM-POSITIVOS

Resumo

O emprego de bacteriocinas purificadas na bioconservação de alimentos é muito dispendioso, sendo sua aplicação viável apenas em produtos de alto valor agregado. Uma alternativa tecnológica eficaz e mais econômica que vêm sendo amplamente estudada é a adição de culturas bacteriocinogênicas, as quais irão produzir bacteriocinas no alimento. Este estudo teve como objetivo avaliar as características antimicrobianas e tecnológicas de três culturas bacteriocinogênicas como adjuntas em queijo Minas Frescal. Os queijos foram processados utilizando 1% de fermento láctico comercial e 0,5% de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 ou *Enterococcus faecium* FAIR-E 198. Após o processamento estes queijos foram artificialmente inoculados com *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Bacillus cereus* K1-B041 e estocados por 21 dias a 8 ± 1ºC. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as três culturas bacteriocinogênicas e o fermento láctico quanto à atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* ATCC 27154. Porém, *B. cereus* K1-B041 demonstrou susceptibilidade a *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, a partir do 7º dia de estocagem. Não foi detectada atividade de bacteriocina nos queijos durante 21 dias. A adição das três culturas produtoras de bacteriocinas como adjuntas ao queijo Minas Frescal não promoveu alteração no pH e na acidez, contudo *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, na concentração de 0,5%, provocaram aumento da proteólise primária e secundária do queijo. Portanto, estas culturas não podem ser empregadas como adjuntas em queijo Minas Frescal, uma vez que promoveram a descaracterização do produto.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal é um produto de grande popularidade, aceitação, consumo e produção em quase todo o país. Representa 5,63% (27.500t) da produção nacional de queijos, ocupando a quarta posição atrás apenas da Mussarela, do Prato e do requeijão (ABIQ, 2004). É classificado como um queijo de muita alta umidade (>55%), semigordo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004), com baixa acidez (pH >4,5), massa de consistência mole, não cozida e ligeiramente compacta, características favoráveis ao desenvolvimento microbiano que, além de limitar a vida-de-prateleira do produto, podem oferecer riscos à saúde do consumidor.

A contaminação microbiana de queijos assume destaque em saúde pública, ao se considerar que bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* são comumente encontradas em derivados lácteos e freqüentemente relacionadas a surtos de doenças transmitidas por alimentos. A espécie *S. aureus* é considerada um dos principais agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Embora seja termolábel, sua patogenia está relacionada à produção de enterotoxina termoestável (100ºC/30min) (FRANCO e LANDGRAFT, 1996). Com relação à ocorrência de *S. aureus* em queijo Minas Frescal, Filho e Filho (2000) obtiveram contagens deste patógeno acima de 10^5UFC/g em 50% das 40 amostras analisadas.

L. monocytogenes é o agente etiológico da listeriose, uma enfermidade grave que afeta principalmente grávidas, recém-nascidos e imunodeprimidos. No Brasil, alguns trabalhos registram a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal. Silva e outros (1998) e Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) obtiveram 41,17% e 42,9% de amostras positivas para *L. monocytogenes* em queijos de fabricação artesanal e por acidificação direta, respectivamente.

Muito embora o arroz seja o produto mais envolvido em surtos de origem alimentar causados por *B. cereus*, este microrganismo tem sido freqüentemente isolado de produtos lácteos (ROCHA, 2005; VIDAL-MARTINS et al., 2005). Kabuki, Rocha e Kuaye (2005) analisaram 90 amostras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processos

tecnológicos e em 22,2% das amostras (20/90) encontraram contagens de *B. cereus* superiores a 10^5UFC/g.

A adoção de diferentes métodos de fabricação, como a substituição do fermento láctico tipo O pela acidificação direta com ácido láctico, visando minimizar o problema de acidificação excessiva durante a comercialização, tornou o queijo Minas Frescal mais susceptível ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. O queijo obtido por acidificação direta não conta com barreiras de proteção originadas pela presença do fermento láctico como a produção de ácido láctico e outros compostos antimicrobianos, dentre os quais, as bacteriocinas. Estas são peptídeos ou proteínas, com ação antimicrobiana, sintetizadas no ribossomo das bactérias lácticas. Apresentam efeito significativo sobre bactérias Gram-positivas como os gêneros *Listeria, Bacillus, Clostridium* e *Staphylococcus* (HUGAS, 1998). São efetivas em baixa concentração, por exemplo, 10mg/kg, e não afetam a qualidade sensorial do produto (RODGERS, 2001).

A nisina, descoberta em 1928, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, é aprovada há mais de 50 anos e utilizada por cerca de 40 países como conservante de alimentos. No Brasil é permitido seu emprego em queijos na concentração de até 12,5mg/kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996). Sua efetividade foi demonstrada por vários autores em diversos tipos de queijos (HAMAMA et al., 2002; OLASUPO et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2001)

Recentemente, um novo produto comercial encontra-se no mercado, a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Esta bacteriocina também apresenta amplo espectro de atividade e tem-se revelado efetiva na inibição de *L. monocytogenes* e *B. cereus* em carnes frescas e produtos cárneos fermentados.

Além dessas, outras bacteriocinas, como a pediocina AcH, produzida por *P. acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* e algumas enterocinas têm sido avaliadas para aplicação comercial. A pediocina AcH apresenta atividade antimicrobiana, principalmente, sobre *L. monocytogenes* (LOESSNER et al., 2003; MOTLAGH et al., 1992), além de ser tão segura quanto a nisina (ENNAHAR et al., 1996). As enterocinas apresentam ação antimicrobiana seletiva, não são efetivas sobre os gêneros *Leuconostoc* e *Lactococcus*,

porém agem sobre algumas espécies de *Clostridium, Staphylococcus* e *Listeria* (CINTAS et al., 1997; LAUKOVÁ et al., 2001; MORENO et al., 2002).

Uma alternativa tecnológica eficaz para aumentar a segurança microbiológica de alimentos é o emprego de bacteriocinas purificadas ou culturas bacteriocinogênicas como bioconservantes. Porém, o uso de bacteriocinas purificadas é muito dispendioso e as culturas produtoras nem sempre são apropriadas para serem utilizadas como fermentos lácticos, visto que a maioria possui baixa atividade acidificante e proteolítica, além de alta sensibilidade a bacteriófagos (ROBERTS et al, 1992). Por este motivo, alguns autores recomendam o emprego de fermentos lácticos convencionais associados às culturas produtoras de bacteriocinas visando o aumento da segurança de queijos quanto à possível presença de patógenos gram-positivos (MORENO et al., 2002; ROBERTS et al., 1992). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de culturas bacteriocinogênicas como adjuntas ao fermento láctico no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A*, Staphylococcus aureus* ATCC 27154 e *Bacillus cereus* K1-B041 em queijo Minas Frescal. Além de verificar possíveis alterações provocadas por estas culturas nas características físico-químicas e proteólise do queijo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Origem e manutenção dos microrganismos

Os microrganismos patogênicos fornecidos pelo Banco de Culturas do Laboratório de Higiene (FEA-UNICAMP, Campinas, SP) e pela Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ), foram mantidos em ágares inclinados a 4ºC: *Listeria monocytogenes* Scott A em ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE, Difco, Sparks, EUA), *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Sparks, EUA) e *Bacillus cereus* K1-B041 em ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA).

As culturas produtoras de bacteriocinas utilizadas foram *Lactobacillus plantarum* ALC 01, produtora de pediocina AcH e isolada de queijo Munster (ENNAHAR et al.,

1996), *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, produtora de enterocina e isolada de queijo Feta (ACA-DC 1618, Universidade de Agricultura de Atenas, Atenas, Grécia) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, produtora de nisina (BCCM-LMG Bacteria Collection, Gent, Bélgica). Todas as culturas lácticas foram mantidas a 4ºC em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, EUA).

Foi utilizado fermento láctico mesofílico tipo O liofilizado (marca A), constituído por diferentes linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, o qual foi mantido a -18ºC.

Para o processamento do queijo o fermento láctico e as culturas bacteriocinogênicas foram ativados duas vezes em LDR 10% (Molico, Nestlé Brasil, Araçatuba, SP), antes de serem adicionados à matéria-prima.

2.2. Processamento do queijo

O processamento do queijo foi realizado em sala limpa certificada do tipo ISO classe 7 (>352.000 partículas de 0,5 μm/m^3 de ar), utilizando utensílios previamente esterilizados a 121ºC/30min. Para cada processamento foram utilizados 20kg de leite pasteurizado tipo B, obtendo-se um rendimento de 10 peças de queijos de aproximadamente 250g cada.

O leite pasteurizado foi resfriado a 35^{o}C e inoculado com fermento láctico tipo O (1%) e as culturas produtoras de bacteriocina (0,5%). Em seguida, foram adicionados ao leite 5ml de solução de cloreto de cálcio a 50% e coalho líquido diluído em água destilada na proporção de 1,2g/20l de leite. Após três vezes o tempo do início da formação da coalhada, a massa foi cortada e após repouso por 5 minutos, foi iniciada agitação intermitente a cada 3 minutos durante 30 minutos. A salmoura a 2% (p/p) foi adicionada à mistura massa/soro e após a retirada de parte do soro, a massa foi vertida em formas para dessoragem. Os queijos foram virados após 30, 60 e 120min, em seguida, foram fracionados em porções de 10g, as quais foram acondicionadas em bolsas plásticas estéreis (Nasco Whirl-Park, Fort Atkinson, EUA) para subseqüente inoculação dos patógenos e

estocagem a 8 ± 1ºC por 21 dias (**Figura 1**). Os processamentos dos queijos foram realizados em duplicata.

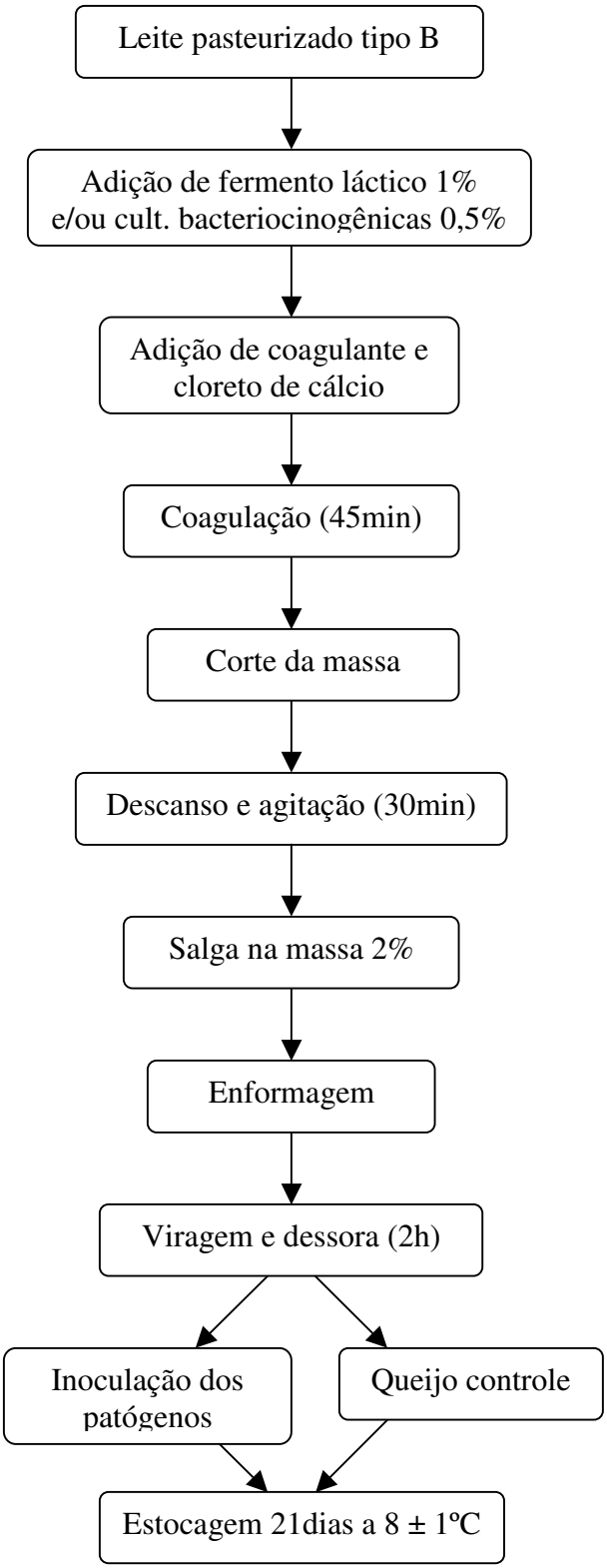

Figura 1. Fluxograma de processamento de queijo Minas Frescal empregado neste estudo.

2.3. Inoculação dos microrganismos patogênicos

Após propagação em meio de cultivo adequado para cada espécie por 16 a 24h, os cultivos de *L. monocytogenes* Scott A*, S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041 foram submetidos à centrifugação a 5.000g por 10min a 4ºC (Centrífuga J2-21, Beckman, Palo Alto, EUA). A biomassa obtida foi lavada com solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 7,0 e ressuspensa em 10ml de solução aquosa peptonada 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após realização de diluições decimais seriadas nesta mesma solução, suspensões de células (2ml) contendo aproximadamente 10^4 UFC/ml dos patógenos foram inoculadas às amostras de queijo (10g) e homogeneizadas em "stomacher" Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra) por 15 segundos. As amostras foram armazenadas a 8 ± 1ºC por até 21dias. A determinação da concentração dos patógenos foi realizada previamente pela técnica de plaqueamento em superfície, em condições de cultivo adequadas a cada espécie.

2.4. Monitoramento microbiológico do processamento dos queijos

Como monitoramento microbiológico dos processamentos, foram coletadas amostras do leite pasteurizado antes do início do processo e dos queijos imediatamente antes da inoculação dos patógenos. As amostras de leite foram analisadas quanto à presença de estafilococos coagulase positiva, *B. cereus, L. monocytogenes, Salmonella* spp., coliformes termotolerantes (45ºC), além da contagem padrão em placa. Nas amostras de queijo, a contagem padrão em placa foi substituída pela contagem de bactérias lácticas.

As amostras de leite (25ml) foram homogeneizadas em 225ml de solução aquosa de peptona 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), enquanto as amostras de queijos (25g) foram homogeneizadas em 225ml de citrato trisódico (20g/l) (Merck, Darmstadt, Alemanha), durante 2 minutos em "stomacher" Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução aquosa peptonada 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). O plaqueamento foi realizado por espalhamento em superfície e foram utilizados ágar Baird-Parker (Difco, Sparks, EUA)

para estafilococos coagulase positiva e ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) para as bactérias lácticas, com incubação a 35ºC/48h e ágar Manitol Polimixina Gema de Ovo (MYP, Difco, Sparks, EUA) para *B. cereus,* com incubação a 30ºC/24h. Para contagem padrão em placa foi realizado plaqueamento em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA, Difco, Sparks, EUA), com incubação a 35ºC/48h (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Para determinação de coliformes termotolerantes (45ºC) foi utilizada a técnica de Número Mais Provável (NMP), série de três tubos. As diluições decimais seriadas das amostras foram inoculadas em caldo lauril sulfato triptose (LST, Difco, Sparks, EUA) a 35ºC por 48h. As culturas dos tubos com resultado presuntivo positivo foram transferidas para caldo EC (Difco, Sparks, EUA) e incubadas em banho-maria a 45ºC para confirmação da presença de coliformes termotolerantes (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Para pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizado pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (BPW, Merck, Darmstadt, Alemanha), com incubação a 35ºC/18h, seguido por enriquecimento em caldos Rappaport Vassiliadis (RV, Difco, Sparks, EUA) e Tetrationato (TT, Difco, Sparks, EUA), incubados a 35ºC/24h e plaqueamento em ágar Sulfito de Bismuto (BS, Difco, Sparks, EUA), ágar Entérico de Hecktoen (HE, Difco, Sparks, EUA) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Difco, Sparks, EUA), com incubação a 35ºC/24h (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Para determinação de *L. monocytogenes* foi empregada metodologia segundo Pagotto e outros (2001), com pré-enriquecimento em meio para enriquecimento de *Listeria* (UVM, Difco, Sparks, EUA) por 24 a 48h a 30ºC, enriquecimento seletivo em caldo Fraser (Difco, Sparks, EUA), por 48h a 35ºC e plaqueamento em ágar Oxford modificado (Difco, Sparks, EUA) e ágar cloreto de lítio fenil etanol moxalactano (LPM, Difco, Sparks, EUA), com incubação por 48h a 35ºC e 30ºC, respectivamente.

Todas as colônias típicas foram submetidas a provas bioquímicas específicas para cada espécie. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.5. Avaliação do efeito das culturas bacteriocinogênicas sobre os microrganismos patogênicos

Os queijos foram analisados após 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC. Amostras de queijos (10g) foram homogeneizadas em 90 g de citrato trisódico (20g/l), previamente aquecido a 40-45^{o}C, durante 2 minutos em "stomacher" Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução aquosa peptonada 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha). O plaqueamento foi realizado por espalhamento em superfície e foram utilizados ágar Oxford modificado (Difco, Sparks, EUA) para *L. monocytogenes*, ágar Baird-Parker (Difco, Sparks, EUA) para *S. aureus,* ágar Manitol Polimixina Gema de Ovo (MYP, Difco, Sparks, EUA) para *B. cereus,* ágar M17(Difco, Sparks, EUA) para *Lc. lactis* subsp. *lactis* e fermento láctico, ágar MRS (Difco, Sparks, EUA) acidificado (pH 5,5) para *Lb. plantarum* e ágar KF *Streptococcus* (Difco, Sparks, EUA) para *E. faecium*. As placas foram incubadas a 30ºC/24h para *B. cereus* e a 35ºC/48h para os demais microrganismos (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992).

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como logaritmo de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (log UFC/g).

2.6. Análises físico-químicas dos queijos

Após 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC foram determinados no queijo controle: pH, acidez (AOAC, 1995) e teores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel a pH 4,6 e nitrogênio solúvel em TCA 12% pelo método de Kjeldahl (IDF, 1962). Nos queijos com um dia de processamento também foram determinados os teores de sal (IDF, 1979) e de umidade (AOAC, 1995). Todas as análises foram realizadas em triplicata, exceto o teor de umidade que foi determinado em quadruplicata.

2.7. Determinação da produção de bacteriocinas nos queijos

A produção de bacteriocinas nos queijos foi determinada pelo método de diluição crítica, adaptado de Mayr-Harting e outros (1972), após 1, 7, 14 e 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC. A extração de bacteriocina a partir das amostras de queijos foi realizada segundo RODRIGUEZ e outros (2001). Porções de 5g de queijo foram homogeneizadas em 20ml de HCL 0,02N a 70ºC e submetidas à centrifugação (7.500g/15min a 4ºC) (Centrífuga J2-21, Beckman, Palo Alto, EUA). Os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana Millex-GV 0,22µm (Millipore S.A., Carrigtwohill, Irlanda) (MORENO, 1995) e diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução tampão fosfato de sódio 10mM a pH 7,0, utilizando placas de microtitulação. Então, 10µl de cada diluição foi depositado sobre placas contendo TSA (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar) ou TSA-YE (Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% ágar), previamente inoculado com 1% (10^6-10^7 UFC/ml) das culturas de *B. cereus* K1-B041, *S. aureus* ATCC 27154 ou *L. monocytogenes* Scott A. As placas foram incubadas a 35ºC/24h. O título de bacteriocina foi expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/ml), ou seja, a recíproca da maior diluição que apresentar halo de inibição multiplicada por 100.

2.8. Análise estatística

A análise de variância paramétrica (ANOVA) e comparação de média pelo teste de Tuckey ao nível de significância de 95% foram realizados com o auxílio do SAS (SAS Institute, Cary, NC) com a finalidade de avaliar estatisticamente os resultados obtidos a partir de diferentes culturas lácticas.

3. RESULTADOS

3.1. Monitoramento microbiológico

As amostras de leite pasteurizado tipo B utilizado nos processamentos dos queijos Minas Frescal apresentaram-se de acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura através do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, BRASIL, 1952), conforme **Tabela 1**. Além dos critérios exigidos pela legislação, não foi detectado nas amostras a presença de estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria* sp. Com relação a *Bacillus cereus* a contagem não ultrapassou 3,0 x 10^1 UFC/ml.

Tabela 1. Características microbiológicas das amostras de leite pasteurizado tipo B utilizado no processamento do queijo Minas Frescal.

Determinações	**Leite pasteurizado tipo B**				
	P1	**P2**	**P3**	**P4**	**Padrão (RIISPOA, 1952)**
Contagem total (UFC/ml)	1,4 x 10^4	1,9 x 10^4	1,6 x 10^4	1,9 x 10^4	4,0 x 10^4
Coliformes a 45ºC (NMP/ml)	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	tolerância em 0,5ml
Estafilococos coagulase positiva (UFC/ml)	<10	<10	<10	<10	----
Salmonella spp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	----
Listeria sp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	----
Bacillus cereus (UFC/ml)	1,0 x 10^1	<1,0 x 10^1	2,0 x 10^1	3,0 x 10^1	----

RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal;

UFC: Unidades formadoras de colônias;

NMP: Número mais provável.

Na **Tabela 2** constam as características microbiológicas das amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas bacteriocinogênicas, determinadas logo após o término do processamento. Em todas as amostras de queijo analisadas a contagem de coliforme termotolerante (45ºC) e de estafilococos coagulase positiva ficaram abaixo do nível de detecção, além disso não foram encontrados *Salmonella* spp. e nem *Listeria* sp. A contagem de *B. cereus* aumentou no final do processamento em aproximadamente 1 log UFC/g, variando entre 1,9 e 3 x 10^2 UFC/g. A população de bactérias láticas manteve-se entre 2,2 e 3,2 x 10^7 UFC/g em todos os queijos.

Tabela 2. Características microbiológicas das amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, determinadas logo após o término do processamento.

Parâmetros microbiológicos	**Queijo 1[a]**	**Queijo 2[b]**	**Queijo 3[c]**	**Queijo 4[d]**
Coliformes a 45ºC (NMP/g)	<3	<3	<3	<3
Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	<10	<10	<10	<10
Salmonella spp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Listeria sp. (25g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Bacillus cereus (UFC/g)	1,9 x 10^2	2,1 X 10^2	3 x 10^2	3 x 10^2
Bactérias lácticas (UFC/g)	2,9 x 10^7	3,2 x 10^7	2,2 x 10^7	2,2 x 10^7

[a] Q1: fermento láctico comercial
[b] Q2: cultura adjunta *Lc. lactis lactis* ATCC 11454
[c] Q3: cultura adjunta *Lb. plantarum* ALC 01
[d] Q4: cultura adjunta *E. faecium* FAIR-E 198

A **Tabela 3** mostra a evolução da contagem dos patógenos Gram-positivos artificialmente inoculados e das bactérias lácticas presentes em queijo Minas Frescal, fabricado com diferentes culturas bacteriocinogênicas, durante 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC. As **Figuras 2**, **3** e **4** mostram as curvas de desenvolvimento de *L. monocytogenes* Scott A, *S. aureus* ATCC 27154 e *B. cereus* K1-B041, respectivamente.

As populações de *L. monocytogenes* Scott A *S. aureus* ATCC 27154 mantiveram-se praticamente constante em todos os queijos, durante todo o período de estocagem. As contagens oscilaram entre 3,93 e 4,76 log UFC/g e 3,64 e 4,01 log UFC/g para *L. monocytogenes* Scott A *S. aureus* ATCC 27154, respectivamente. Nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) foi verificada entre as contagens das amostras dos queijos adicionados de culturas bacteriocinogênicas (Q2, Q3 e Q4) e a amostra controle (Q1) processada apenas com fermento láctico comercial. No queijo contendo *E. faecium* FAIR-E 198 verifica-se uma redução da contagem de *L. monocytogenes* de 0,45 log UFC/g, após 14 dias de estocagem, porém após este declínio foi observado aumento da contagem do patógeno para 4,50 log UFC/g (**Figura 2**).

Quanto ao *B. cereus* K1-B041, observa-se na **Tabela 3** e **Figura 4** redução significativa ($P<0,05$) deste patógeno (≥2 log UFC/g) a partir do sétimo dia de estocagem, nos queijos fabricados com as culturas bacteriocinogênicas *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198. Após 21 dias foram obtidas reduções superiores a 2,4 log UFC/g em todos os queijos avaliados, sendo que naqueles com *E. faecium* (Q4) ou *Lb. plantarum* (Q3) a população de *B. cereus* ficou abaixo do limite de detecção (<1 log UFC/g) após 14 e 21 dias, respectivamente.

A população de bactérias lácticas, inicialmente inoculadas ao redor de 6,0 log UFC/g, aumentou em dois ciclos logarítmicos nos queijos com um dia, alcançando populações superiores a 9,0 log UFC/g após 14 dias (**Tabela 3**). Estes resultados demonstraram o bom desenvolvimento destas culturas durante a etapa de estocagem do queijo Minas Frescal. Mesmo assim, nenhuma atividade de bacteriocina foi detectada nas amostras de queijo analisadas durante os 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC.

Tabela 3. Contagem microbiana dos patógenos inoculados artificialmente e das bactérias lácticas em queijo Minas Frescal fabricado com adição de diferentes culturas adjuntas e estocados a 8 ± 1ºC por 21 dias.

Microrganismo	Queijo	Contagem microbiana (Log UFC/g)			
		Tempo (dias)			
		1	7	14	21
Listeria monocytogenes Scott A	Q1[1]	4,07[a]*	4,05[a]	4,23[a]	4,07[a]
	Q2[2]	3,93[a]	4,03[a]	4,16[a]	4,23[a]
	Q3[3]	4,43[a]	4,41[a]	4,32[a]	4,76[a]
	Q4[4]	4,37[a]	4,31[a]	3,85[a]	4,50[a]
Staphylococcus aureus ATCC 27154	Q1	4,01[a]	3,83[a]	4,04[a]	3,64[a]
	Q2	4,00[a]	4,09[a]	4,11[a]	3,96[a]
	Q3	3,98[a]	3,99[a]	3,78[a]	3,82[a]
	Q4	3,85[a]	3,94[a]	3,74[a]	3,55[a]
Bacillus cereus K1-B041	Q1	4,12[a]	3,87[a]	1,67[ab]	1,69[a]
	Q2	4,10[a]	3,83[a]	2,18[a]	1,45[ab]
	Q3	4,08[a]	1,59[b]	1,35[bc]	<1,00[b]
	Q4	4,04[a]	2,05[b]	<1,00[c]	<1,00[b]
Bactérias lácticas	Q1	8,25[a]	8,83[a]	9,25[a]	9,31[a]
	Q2	8,21[a]	9,05[a]	9,35[a]	9,48[a]
	Q3	8,00[a]	9,16[a]	9,36[a]	9,32[a]
	Q4	8,02[a]	8,44[a]	9,17[a]	9,31[a]

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)
[1] Q1: fermento láctico comercial
[2] Q2: cultura adjunta *Lc. lactis lactis* ATCC 11454
[3] Q3: cultura adjunta *Lb. plantarum* ALC 01
[4] Q4: cultura adjunta *E. faecium* FAIR-E 198

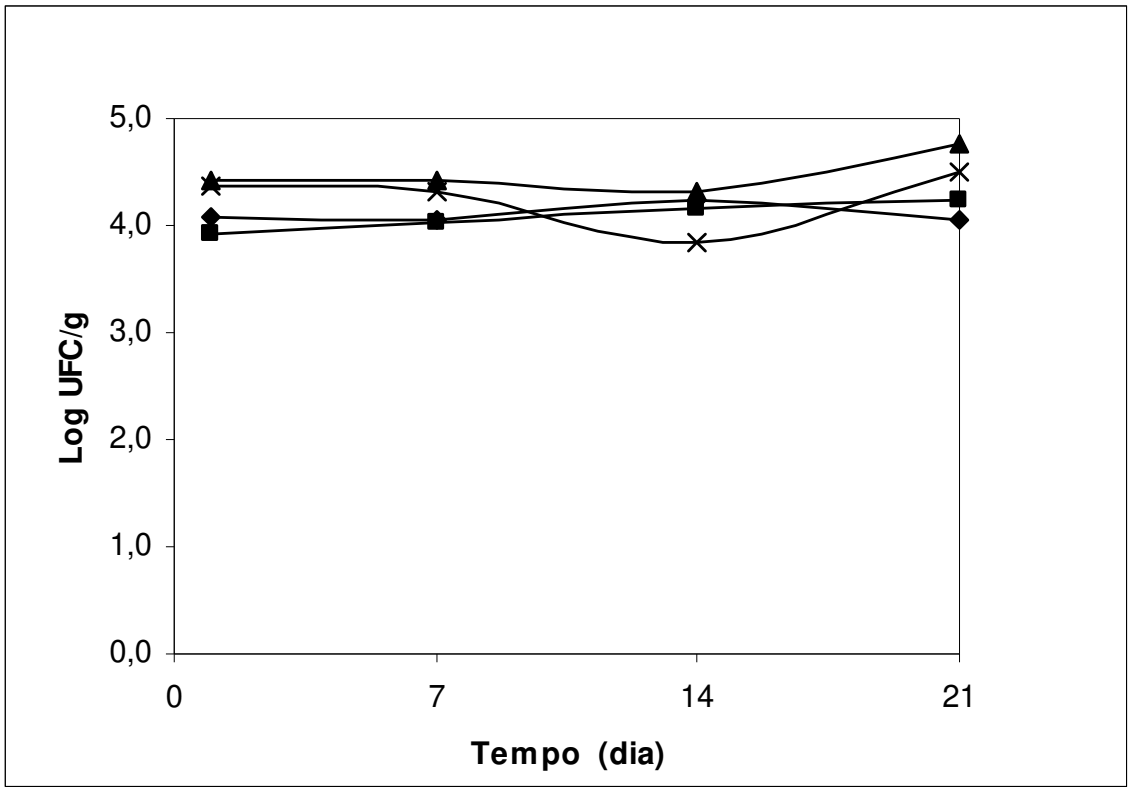

Figura 2. Contagem de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

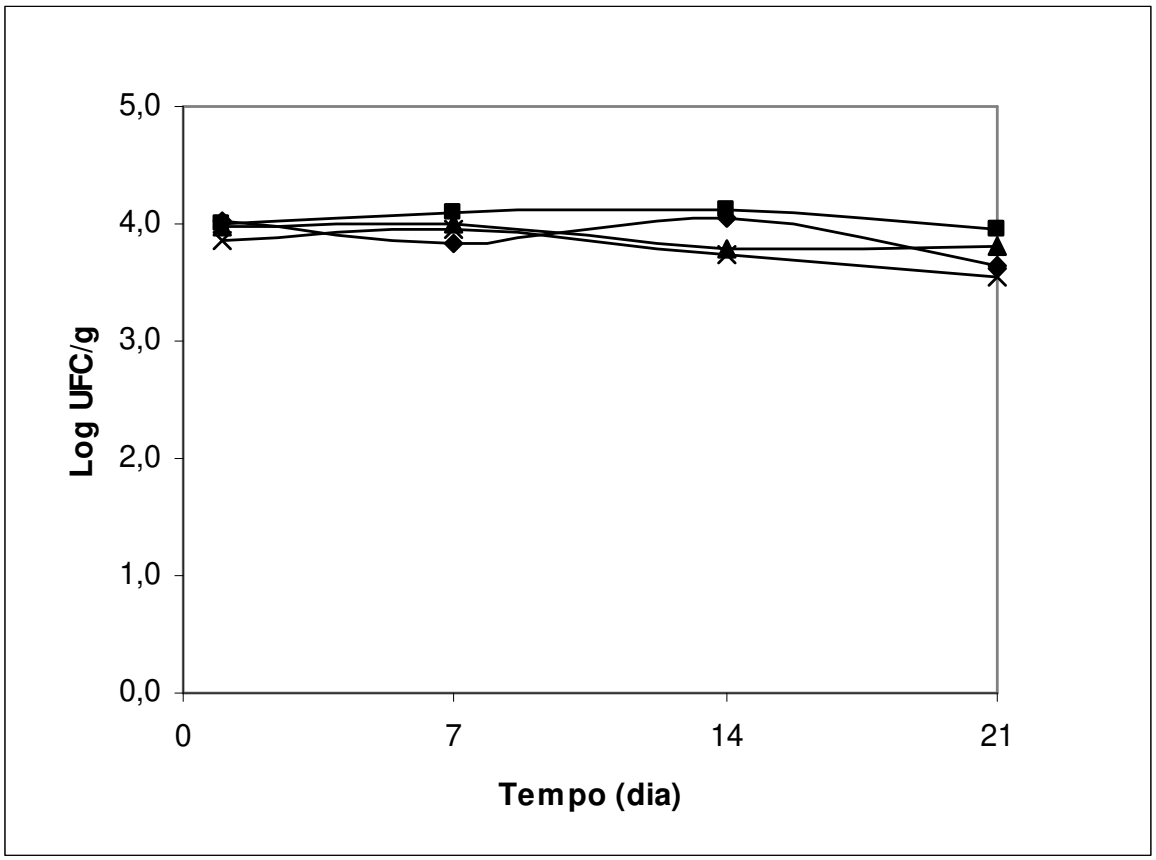

Figura 3. Contagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

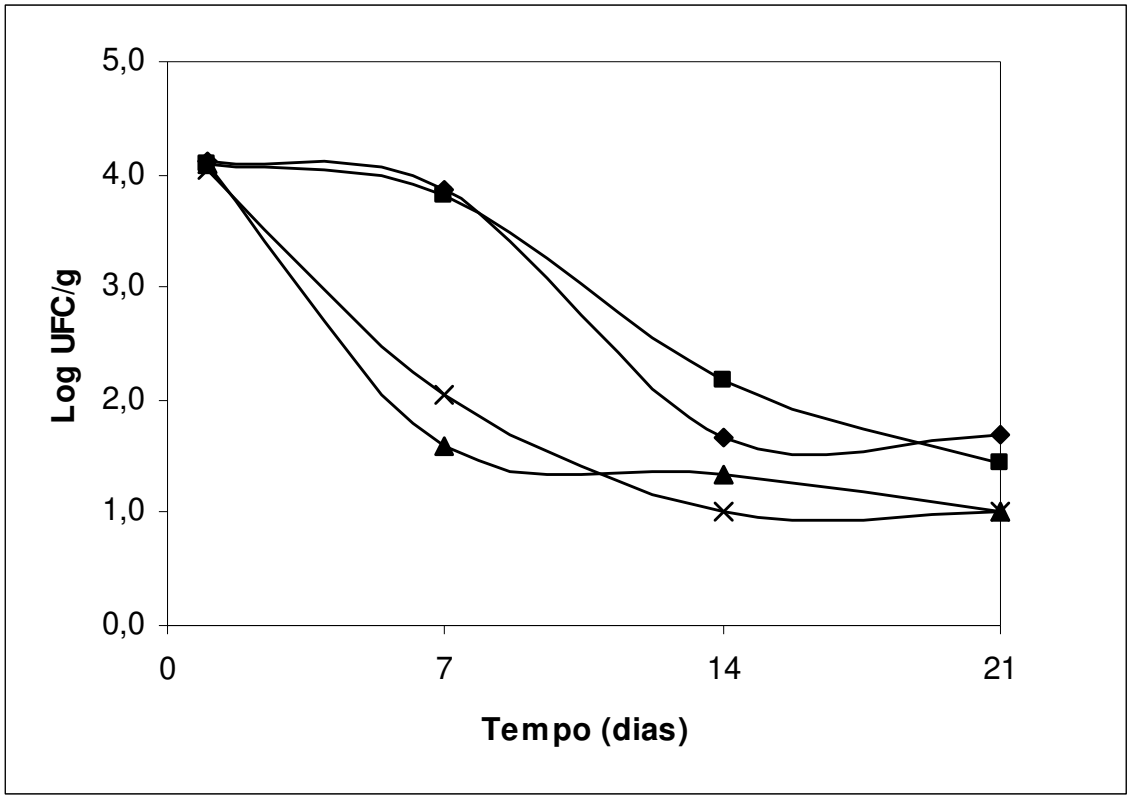

Figura 4. Contagem de *Bacillus cereus* K1-B041 em queijo Minas Frescal durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

3.2. Características físico-químicas dos queijos

A **Tabela 4** mostra as características físico-químicas de amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas bacteriocinogênicas, determinadas um dia após o processamento. Todos os queijos apresentaram parâmetros físico-químicos semelhantes, com pH entre 6,4 e 6,48, acidez entre 0,10 e 0,12, teor de sal ao redor de 1,10%, umidade entre 65,10 e 66,15% e proteína ao redor de 12,6%.

Tabela 4. Características físico-químicas de amostras de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas determinadas um dia após o processamento.

Queijo	Parâmetro				
	pH	Acidez titulável (% de ac. láctico)	Sal (%)	Umidade (%)	Proteína (%)
Q1[a]	6,41	0,10	1,10	65,10	12,53
Q2[b]	6,40	0,10	1,15	65,87	12,43
Q3[c]	6,48	0,12	1,10	66,15	12,63
Q4[d]	6,44	0,11	1,10	66,13	12,89

[a] Q1: fermento láctico comercial
[b] Q2: cultura adjunta *Lc. lactis lactis* ATCC 11454
[c] Q3: cultura adjunta *Lb. plantarum* ALC 01
[d] Q4: cultura adjunta *E. faecium* FAIR-E 198

A **Figura 5** apresenta a variação do pH dos queijos fabricados com diferentes culturas adjuntas produtoras de bacteriocina. Foi observado um decréscimo acentuado, acima de 1,2 unidade no pH dos queijos durante a primeira semana de estocagem, alcançando valores ao redor de 5,0 após 21dias. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os valores do pH dos queijos produzidos com as culturas bacteriocinogênicas e o queijo controle durante todo o período de estocagem.

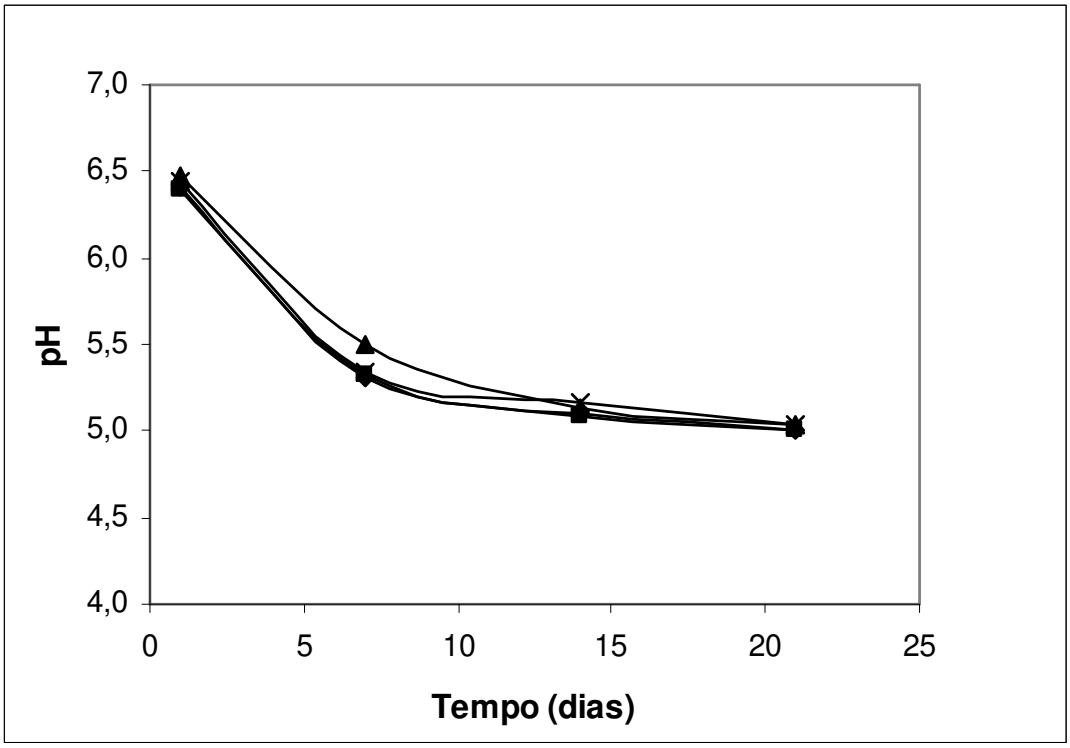

Figura 5. Variação do pH de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

A **Figura 6** mostra a variação da acidez titulável (% de ácido láctico) de queijo Minas Frescal processado com diferentes culturas adjuntas bacteriocinogênicas. Como ocorrido para o pH, também não foi observada diferença significativa entre os valores da acidez titulável dos queijos adicionados de culturas produtoras de bacteriocinas e do queijo controle. Ao longo do período de estocagem foi verificado um aumento da acidez dos queijos, atingindo valores ao redor de 0,85 após 21 dias a 8 ± 1ºC.

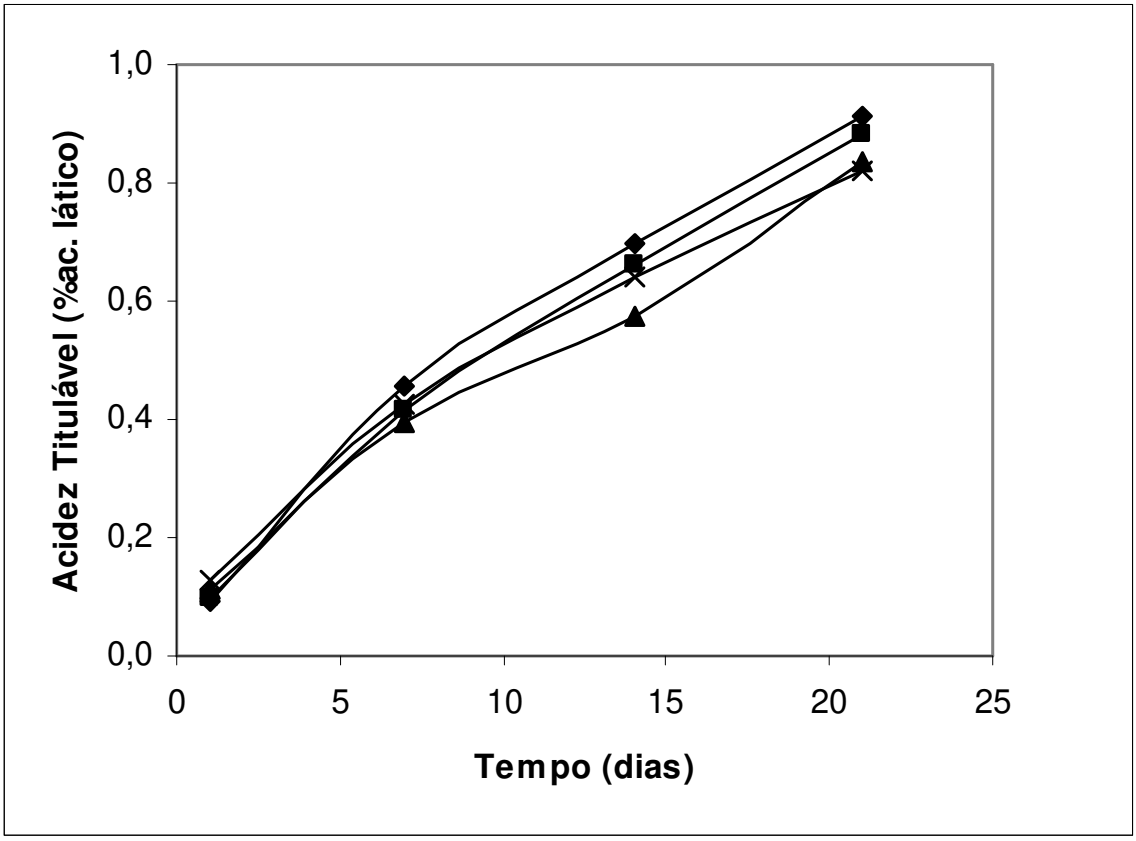

Figura 6. Variação da acidez titulável de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas, durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

Na **Tabela 5** verifica-se a evolução dos índices de extensão (NCN/NT) e profundidade da proteólise (NPN/NT) em queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas bacteriocinogênicas e estocado a 8 ± 1ºC/21 dias. Verifica-se diferença significativa (P<0,05) nos índices de extensão da proteólise a partir do 7º dia entre os queijos processados com *Lb. plantarum* ALC 01 (Q3) e *E. faecium* FAIR-E 198 (Q4) e os demais. Após 21 dias, os queijos contendo estas culturas adjuntas apresentaram aumento de 86,4% e 80,4%, respectivamente, em relação à amostra controle. Para aqueles processados com *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 observa-se índices semelhantes ou menores que os da amostra controle durante todo o período de estocagem (**Figura 7**).

Quanto ao índice de profundidade da proteólise, expresso pela porcentagem de nitrogênio não protéico em relação ao nitrogênio total (NNP/NT), verifica-se que o queijo adicionado de *Lb. plantarum* ALC 01 (Q3) apresentou diferença significativa (P<0,05) dos demais queijos a partir do 14º dia, resultando em um aumento de 45,2% após 21 dias em relação ao queijo controle. Também foi observado aumento de 7,8% e 18,3% nos queijos processados com *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 e *E. faecium* FAIR-E 198, respectivamente, após 21 dias de estocagem, contudo estes queijos não diferem estatisticamente (P>0,05) do queijo controle, conforme observado na **Tabela 5** e **Figura 8**.

Tabela 5. Evolução dos índices de extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas e estocado a 8 ± 1ºC por 21 dias.

Parâmetro	Queijo	Tempo (dias)			
		1	**7**	**14**	**21**
NCN[5]/NT[6] (%)	Q1[1]	6,68[a]*	10,15[bc]	12,69[b]	14,94[b]
	Q2[2]	6,26[a]	8,34[c]	11,62[b]	14,78[b]
	Q3[3]	7,35[a]	14,08[a]	19,43[a]	22,75[a]
	Q4[4]	7,17[a]	15,93[a]	18,70[a]	22,07[a]
NPN[7]/NT (%)	Q1	1,69[a]	3,28[a]	4,87[a]	6,16[a]
	Q2	1,58[a]	3,57[a]	4,61[a]	6,40[a]
	Q3	1,79[a]	3,98[a]	5,70[b]	8,28[b]
	Q4	1,85[a]	3,69[a]	4,80[a]	7,14[a]

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (P<0,05)
[1]Q1: fermento láctico comercial;
[2]Q2: cultura adjunta *Lc. lactis lactis* ATCC 11454;
[3]Q3: cultura adjunta *Lb. plantarum* ALC 01;
[4]Q4: cultura adjunta *E. faecium* FAIR-E 198;
[5]NCN: nitrogênio não caseico;
[6]NT: nitrogênio total;
[7]NPN: nitrogênio não protéico.

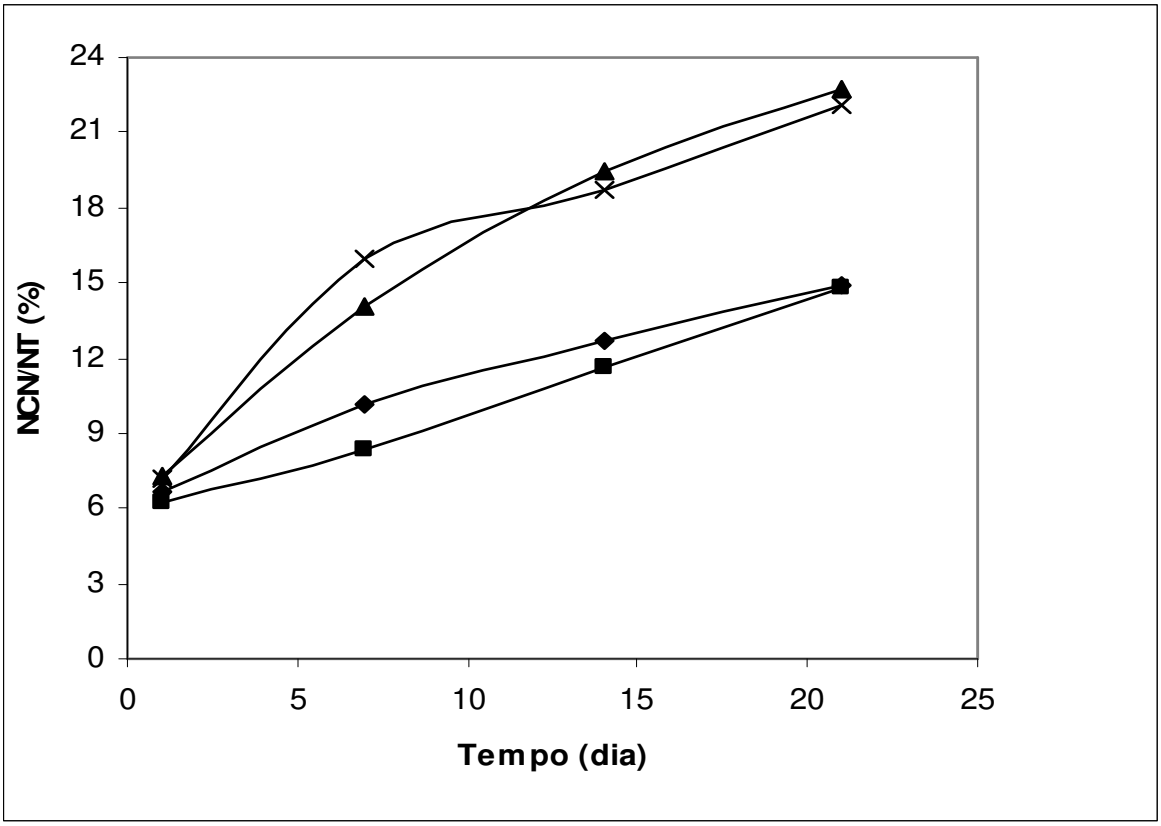

Figura 7. Evolução dos teores de nitrogênio não caseico expressos em % de nitrogênio total (índice de extensão da proteólise), durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC, de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

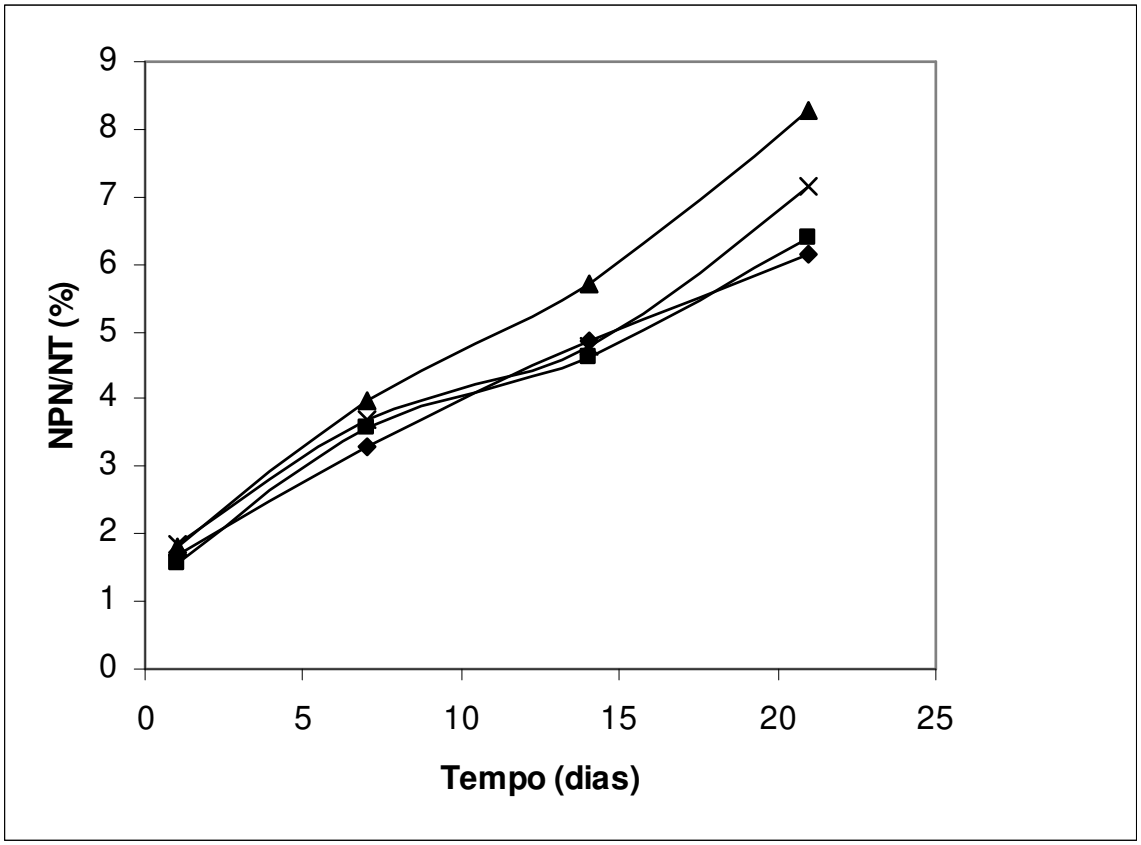

Figura 8. Evolução dos teores de nitrogênio não proteico expressos em % de nitrogênio total (índice de profundidade da proteólise), durante estocagem por 21 dias a 8 ± 1ºC, de queijo Minas Frescal fabricado com diferentes culturas adjuntas. (♦) queijo controle, (■) queijo com adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, (▲) queijo com adição de *Lb. plantarum* ALC 01 e (x) queijo com adição de *E. faecium* FAIR-E 198.

4. DISCUSSÃO

Os queijos Minas Frescal processados em sala limpa apresentaram boa qualidade microbiológica, estando de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2001). Vários autores relatam a baixa qualidade microbiológica de amostras deste tipo de queijo encontradas na indústria e no varejo. Hoffmann e outros (2002) relataram que 100% das amostras analisadas de queijo Minas Frescal comercializados em feiras livres em São José do Rio Preto, SP estavam fora do padrão estabelecido pela legislação vigente para estafilococos coagulase positiva. Carvalho (2003) obteve 29% das amostras fora do padrão para coliformes termotolerantes (45ºC) e 12,9% para estafilococos coagulase positiva. Kabuki, Rocha e Kuaye (2005) verificaram contagens de *B. cereus* superiores a 10^5 UFC/g em 22,2% das amostras analisadas.

Dos três microrganismos patogênicos avaliados neste estudo, *B. cereus* K1-B041 foi o que demonstrou maior sensibilidade às culturas lácticas durante estocagem de queijo Minas Frescal. *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 promoveram redução significativa na população deste patógeno a partir do 7º dia de estocagem, nos outros queijos foi verificada redução após o 14º dia. Este efeito inibitório não pode ser relacionado unicamente à queda do pH, uma vez que não foi observada diferença significativa no pH dos queijos durante a estocagem. A inibição inicial promovida por *Lb. plantarum* e *E. faecium* pode ser atribuída às bacteriocinas, a outros compostos antimicrobianos ou à exclusão competitiva.

Pôde-se observar um efeito bacteriostático promovido pelo fermento láctico sobre *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* ATCC 27154. Porém, nenhum efeito antimicrobiano adicional sobre estes patógenos foi verificado nos queijos produzidos com *Lb. plantarum* e *E. faecium* FAIR-E 198. A fraca atuação destas culturas bacteriocinogênicas sobre *S. aureus* ATCC 27154 já havia sido observada no capítulo IV, durante co-cultivo em leite. Segundo Sutra e outros (1990) e Myllus e outros (1992) o estafilococo possui habilidade de produzir uma cápsula de polissacarídeo viscosa que impede a penetração de substâncias antimicrobianas na célula.

Com relação ao *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, não foi verificada diferença significativa entre as contagens dos patógenos do queijo controle e do adicionado desta cultura, ou seja, *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 não promoveu efeito inibitório sobre os três patógenos avaliados. Uma possível explicação para este fato pode ser encontrada no capítulo III, onde foi observada supressão da atividade de nisina pelo femento láctico.

Sulzer e outros (1992) obtiveram inibição de *L. monocytogenes* em queijo Camembert apenas quando empregaram culturas bacteriocinogênicas isoladamente e não como adjuntas. Nuñez e outros (1997) verificaram maior inibição do desenvolvimento de *S. aureus,* naturalmente presente em queijo Manchego, na amostra controle e não na amostra contendo cultura produtora de bacteriocina.

Entretanto, desempenhos mais significativos de culturas bacteriocinogênicas no controle destes patógenos em queijo foram relatados na literatura. Em 2001, Rodríguez e outros detectaram redução de 2,64 log UFC/g de *L. monocytogenes* no queijo fabricado com cultura produtora de nisina. Hamama e outros (2002) não observaram *S. aureus* em queijo fresco marroquino produzido com cultura nisina positiva, utilizando inóculo de 3 log UFC/g após 4 dias de estocagem. Porém, quando o inóculo inicial foi maior (5 log UFc/g), obtiveram redução na população do patógeno de apenas 0,86 log UFC/g. Rilla e outros (2004) não detectaram *S. aureus*, após 2 semanas, em queijo Afuega'l Pitu contendo nisina Z.

Em queijo de cura de superfície, Loessner e outros (2003) utilizando a mesma linhagem de *Lb. plantarum* avaliada neste estudo, observaram redução de *L. monocytogenes* entre 1 e 2 log UFC/g. Esper e outros (2006) obtiveram redução na população de *L. monocytogenes* entre 2,49 e 2,79 log UFC/g em ricota aspergida com uma suspensão de *Lb. plantarum* produtor de bacteriocina em relação à amostra controle após 21 dias de estocagem a 7ºC.

Em queijo Saint Paulin, Lauková e outros (2001) obtiveram redução de 4,3 log UFC/g de *L. monocytogenes* na amostra com enterocina e apenas 0,1 ciclo no controle. Achemchem e outros (2006) observaram redução inicial de *L. monocytogenes* a níveis abaixo do limite de detecção em queijo Jben processado com uma linhagem de *E. faecium*

produtora de bacteriocina, após 3 dias a 22ºC, os autores obtiveram contagem de 3 log UFC/g. Areal e outros (2006) observaram redução de 1 log UFC/g em *S. aureus* presente em queijo Minas Frescal produzido com *E. faecium* E86 em relação ao queijo controle após 18 dias.

Como observado neste trabalho, alguns autores também não detectaram atividade de bacteriocina em queijos durante o período de estocagem (FARIAS et al., 1999; LAUKOVÁ et al., 1999; SULZER e BUSSE, 1991). Sarantinopoulos e outros (2002b) utilizando a mesma linhagem de *E. faecium* avaliada neste estudo também não detectaram atividade de enterocina em queijo Feta. Contudo, em outros estudos foi observada atividade destes compostos ao longo do período de maturação de diferentes tipos de queijos (ACHEMCHEM et al., 2006; ARQUÉS et al., 2005; MORENO et al., 2002; NUÑEZ et al., 1997).

Nem sempre um ótimo desenvolvimento celular resulta em alta atividade de bacteriocina. Condições ambientais como pH, temperatura, atividade de água podem interferir na produção e/ou estabilidade destes compostos (LEROY e De VUYST, 1999). Em queijo, a atividade de bacteriocina pode ser influenciada pela adsorção à molécula de caseína (MAISNIER-PATIN et al., 1992), por ação de proteases do fermento láctico ou fúngico (GIRAFFA et al., 1995), por ação do coagulante (OHMOMO et al., 2000), por adsorção a molécula de gordura ou pela baixa capacidade de difusão na matriz do queijo (GARRIGA et al., 2002).

O emprego das culturas bacteriocinogênicas como adjuntas em queijo Minas Frescal não promoveu alteração significativa das características físico-químicas (pH, acidez, sal, umidade e proteína) comparativamente a amostra controle. Resultados similares foram relatados para queijo Cheddar (GARDINER et al., 1999) e Feta (SARANTINOPOULOS et al., 2002a), ambos processados com linhagens de *E. faecium* produtoras de bacteriocinas.

O decréscimo acentuado dos valores de pH observado para o queijo Minas Frescal na primeira semana de estocagem a 8 ± 1ºC, está relacionado à degradação da lactose em ácido láctico pelas bactérias lácticas. Os valores de pH obtidos no final do período de

estocagem são semelhantes aos encontrados por Saboya (2002), porém ligeiramente inferiores aos valores mencionados por Campos (2000) e Rossi (1997).

As culturas bacteriocinogênicas utilizadas como adjuntas no processamento de queijo Minas Frescal não promoveram alteração significativa do pH e da acidez titulável durante os 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC, condizendo com os resultados encontrados no capítulo III, durante o desenvolvimento associativo destas culturas com o fermento láctico em leite. Vários autores também não observaram alteração do pH de queijos processados com culturas bacteriocinogênicas (RODRÍGUEZ et al., 2000; OUMER et al., 2001; GARDE et al., 2003; MUÑOZ et al., 2004; ARQUÉS et al., 2005; ÁVILA et al., 2005). Porém, Garde e outros (1997) observaram diferença acima de 0,4 e 0,36 unidade nos valores de pH de queijo fabricado com enterococos produtores de bacteriocina após 1 e 15 dias de maturação.

Em geral, a proteólise primária é causada, principalmente, por ação do coagulante e da plasmina, contudo proteases produzidas por bactérias lácticas também podem atuar neste processo. Os valores encontrados neste estudo para queijo Minas Frescal processado sem adição de culturas adjuntas, durante os 21 dias de estocagem a 8 ± 1ºC, assemelham-se aos resultados obtidos por Dornellas (1997) e Saboya (2002). Entretanto, o índice de profundidade da proteólise observado foi, inicialmente, menor que os valores relatados por estes autores.

Algumas bacteriocinas podem promover lise celular precoce das células do fermento láctico, resultando em aumento da liberação de aminopeptidases e conseqüentemente aumento do índice de profundidade da proteólise ou proteólise secundária (GARDE et al, 1997; OUMER et al., 1999). Uma correlação entre lise celular e índice de proteólise foi observada em queijo Saint-Paulin por Kawabata e outros (1997). Esta liberação precoce de aminopeptidases consiste num evento bastante desejável na fabricação de queijos maturados, porém não para queijo Minas Frescal.

A cultura bacteriocinogênica *Lb. plantarum* ALC 01 promoveu os maiores aumentos nos índices de extensão (86,4%) e profundidade da proteólise (45,2%) do queijo, estes resultados estão de acordo com a avaliação da atividade aminopeptidásica

determinada no Capítulo III, onde *Lb. plantarum* ALC 01 apresentou a maior atividade (0,226-0,390). Após 21 dias de estocagem a 8ºC, *E. faecium* FAIR-E 198 promoveu aumentos de 80,4% e 18,2% nos índices de extensão e profundidade da proteólise, respectivamente, em relação à amostra controle, embora não tenha apresentado alta atividade de aminopeptidases. Sarantinopoulos e outros (2002a), utilizando a mesma linhagem de *E. faecium*, verificaram aumento de 6,3 e 10,3% na proteólise (nitrogênio solúvel em água / nitrogênio total) de queijo Feta após 15 e 30 dias de estocagem, respectivamente. Contudo, um aumento mais significativo (50%) na proteólise secundária de queijo Cheddar processado com *E. faecium* PR88 foi observado por Gardiner e outros (1999).

Não foi verificado aumento da proteólise nos queijos adicionados de *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, condizendo com a baixa atividade aminopeptidásica (0,035-0,134) encontrada no Capítulo III. Garde e outros (2003) também não observaram diferença na proteólise de queijo contendo nisina, durante 25 dias de maturação. Contudo, outros estudos mencionaram o aumento da proteólise de queijo Hispânico devido à adição de *Lc. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 produtor de bacteriocina (ÁVILA et al., 2005; GARDE et al., 2002).

5. CONCLUSÃO

O emprego de *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 como adjuntas ao fermento láctico, na concentração de 0,5%, promoveu ação bactericida sobre *B. cereus* K1-B041 maior que a observada no queijo controle. Contudo, nenhuma atividade inibitória adicional foi observada sobre *L. monocytogenes* Scott A e *S. aureus* ATCC 27154 nos queijos processados com as três culturas bacteriocinogênicas, durante estocagem a 8 ± 1ºC por 21 dias. Estas culturas não acarretaram alterações significativas das características de acidificação dos queijos. Porém, *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198 promoveram aumento acentuado da proteólise do queijo, levando a descaracterização do produto. *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produtor de nisina mesmo não tendo demonstrado atividade antimicrobiana significativa durante o período de estocagem do

queijo Minas Frescal, apresentou características tecnológicas adequadas para utilização como cultura adjunta nste tipo de queijo. Portanto, outros estudos são necessários para viabilizar a aplicação destas culturas na bioconservação de diferentes tipos de queijos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEMCHEM, F., ABRINI, J., MARTINEZ-BUENO, M., VALDIVIA, E., MAQUEDA, M. Control of *L. monocytogenes* in Goat's milk e Goat's Jben by the bacteriocinogenic *E. faecium* F58 strain. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2370-2376, 2006.

ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1.

AREAL, M. F. T., MONTEIRO, E. B., BERES, C., LEITE, S. G. F., MIGUEL, M. A. L. Emprego de BAL bacteriocinogênicas na produção e na inibição de *S. aureus* em queijo minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. Anais... CD-ROM, 2006.

ARQUÉS, J. L., RODRIGUEZ, E., GAYA, P., MEDINA, M., NUNEZ, M. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *L. monocytogenes* in raw milk cheese. **International Dairy Journal**, v.15, p.893-900, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA DE QUEIJOS (ABIQ). **Produção de queijos no Brasil**. Mensagem recebida por luesper@fea.unicamp.br em 19 nov. 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16 ed. Washington, 1995.

ÁVILA, M.; GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on proteolysis and texture of Hispánico cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p.145-153, 2005.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial**, Brasília, 31 mar. 1952. Seção 1.

CAMPOS, A. C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológicae propriedade mecânicas do queijo Minas Frescal**. 2000. 90p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos tecnológicos e comercializados em Campinas, SP**. 2003. 59p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CARVALHO, J. D. G; VIOTTO, W.H.; KUAYE, A.Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, p.262-267, 2007.

CINTAS, L. M.; CASAUS, P.; HAVARSTEIN, L. S.; HERNANDEZ, P. E.; NES, I. F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, 4321-4330, 1997.

DORNELLAS, J. R. F. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e shelf life do queijo minas frescal**. 1997. 90p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

ENNAHAR, S.; AOUDE-WERNER, D.; SOROKINE, O.; DORSSELAER, A. V.; BRINGEL, F.; HUBERT, J. C.; HASSELMANN, C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4381-4387, 1996.

ESPER, L. M. R., ROSA, V. P., ROSSI, P., SANT'ANA, A. S., KUAYE, A. Y., VIOTTO, W. H. Efeito da adição de culturas protetoras (Holdbac) sobre *Listeria monocytogenes* inoculadas na superfície de ricota. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. Anais... CD-ROM, 2006.

FARIAS, M. E., NUNEZ DE KAIRUZ, M., SESMA, F., PALACIOS, J., DE RUIZ-HOLGADO, A., P., OLIVER, G. Inhibition of *L. monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. **Milchwissenschaft**, v.54, p.30-32, 1999.

FILHO, E. S. A.; FILHO, A. N. Ocorrência de *S. aureus* em queijo tipo frescal. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, p.578-80, 2000.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 1996. 177p.

GARDE, S.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. **Biotechnology Letters**, v.19, p.1011-1014, 1997.

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

GARDE, S.; GAYA, P.; FERNANDEZ-GARCIA, E.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis, volatile compounds and sensory evaluation in hispânico cheese manufactured with the addition of a thermophilic adjunct culture, nisin and calcium alginate-nisin microparticles. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3038-3047, 2003.

GARDINER, G. E.; ROSS, R. P.; WALLACE, J. M.; SANLAN, F. P.; JAGER, P. P. J. M.; FITZGERALD, G. F.; COLINS, J. K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *E. faecium* on the quality of Cheddar cheese. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.47, p.4907-4916, 1999.

GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T.; COSTA, S.; MONFORT, J. M.; HUGAS, M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in meat model system during storage. **Food Microbiology**, v.19, p.509-518, 2002.

HAMAMA, A.; EL-HANKOURI, N.; EL-AYADI, M. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dary Journal**, v.12, n.11, p.933-938, 2002.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo " Minas Frescal", vendidos em feiras livres na região de São Jose do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.69-76. 2002.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v.49, p.1537-1542, 1998.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total nitrogen content of cheese by the Kjeldahl method. IDF-FIL., n.20, p.1-3, 1962.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. IDF-FIL., n.88, p.1-3, 1979.

KABUKI, D.Y.; ROCHA, J. A.; KUAYE, A. Y. Ocorrência de *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal elaborado por diferentes processos tecnológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. CD-ROM, 2005.

KAWABATA, S.; VASSAL, L.; LE BARS, D.; CESSELIN, B.; NARDI, M.; GRIPON, J. C.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Phage-induced lysis of *Lc. lactis* during Saint-Paulin cheese ripening and its impact on proteolysis. **Lait**, v.77, p.229-239.

LAUKOVÁ, A.; CZIKKOVÁ, S.; DOBRANSKY, T.; BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, v.16, p.93-99, 1999.

LAUKOVA, A.; VLAEMYNCK, G.; CZIKKOVA, S. Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. **Folia Microbiologica**, v.46, n.2, p.157-160, 2001.

LEROY, F. DE VUYST, L. Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.65, p.974-981, 1999.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1854-1857, 2003.

MAISNIER-PATIN, S., DESCHAMPS, S. N., TATINI, S. R., RICHARD, J. Inhibition of *L. monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. **Lait**, v.72, p.249-263, 1992.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº04, de 01 de março de 2004. Altera a portaria 352 de 04/09/1997. **Diário Oficial**, Brasília, 05 mar. 2004. Seção 1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5mg/kg. **Diário Oficial**, Brasília, 23 jan. 1996. Seção 1.

MORENO, I. **Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de lactococos e sua utilizacao no processamento de queijo minas frescal**. 1995. 190p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MORENO, M. R. F.; REA, M. C.; COGAM, T. M.; VUYST, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, n.1, p.73-84, 2002.

MOTLAGH, A. M.; HOLLA, S.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; FIELD, R. A. Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. **Journal of Food Protection**, v.55, n.5, p.337-343, 1992.

MYLLYS, V.; LOUHI, M.; ALI-VHEMAS, T. **Journal of Veterinary Medicine Serie B**, v.39, p.723-731, 1992.

NUNEZ, M., RODRIGUEZ, J. L., GARCIA, E., GAYA, P., MEDINA, M. Inhibition of *L. Monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.671-677, 1997.

OHMOMO, S., MURATA, S., KATAYAMA, N. NITISINPRASART, S., KOBAYASHI, M., NAKAJIMA, T., YAJIMA, M., NAKANISHI, K. Purification and some characteristics of enterocina ON-157, a bateriocin produced by *E. faecium* NIAI 157. **Journal Applied Microbiology**, v.88, p.81-89, 2000.

OLASUPO, N. A.; SCHILLINGER, U.; NARBAD, A.; DODD, H.; HOLZAPFEL, W. H. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from Wara, a tradicional Nigerian cheese product. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p.141-152, 1999.

OUMER, A.; GARDE, S.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Defined starter system includinga bacteriocina producer for the enhancement of cheese flavour. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.267-270, 1999.

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

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

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

ROBERTS, R. F, ZOTTOLA, E. A., MCKAY, L. L. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2353-2363, 1992.

ROCHA, J. A. K. **Estudo da presença de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* em indústria processadora de queijo Minas Frescal.** 2005. 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures: a review. **Food Science Technology**,v.12, p.276-284, 2001.

RODRIGUEZ, E.; ARQUÉS, J. L.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M.; MEDINA, M. Behaviour of *S.* aureus in semi-hard cheese made with raw milk with nisin´producing starter cultures. **International Dairy Journal**, v.15, p.51-57, 2000.

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

ROSSI, D. A. **Utilização do coalho bovino e coagulantes microbianos e genéticos na elaboração do queijo minas frescal**. 1997. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – niversidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

SABOYA, L. V. **Lise de *Lactococcus* sp. e proteólise em queijos fabricados com ultrafiltração e microfiltração**. 2002. 218p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.93-105, 2002a.

SARANTINOPOULOS, P.;LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.125-136, 2002b.

SILVA, M. C. D.;HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.354-356, 1998.

SULZER, G., BUSSE, M. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitiory substances. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.287-296, 1991.

SULZER, G.; BUSSE, M.; ROSENBERG, M. Inhibition of *Listeria* spp. in Camembert cheese by inhibitory starter cultures. **Journal of Dairy Science**, v.75, Suppl.1, p.94, 1992.

SUTRA, L.; MENDOLIA, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.447-451, 1990.

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

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JUNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *B. cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

A atividade antimicrobiana das culturas bacteriocinogênicas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 e *Enterococcus faecium* FAIR-E 198, foi dependente do microrganismo alvo tanto no método *in vitro* quanto durante desenvolvimento associativo em leite. Além disso, a produção de bacteriocina variou de acordo com a espécie produtora, sendo influenciada pelo tipo de meio de cultivo utilizado.

As culturas bacteriocinogênica mostraram baixa capacidade acidificante, característica desejável para culturas adjuntas. Além disso, a interação dos fermentos lácticos com *Lb. plantarum* ALC 01 e *E. faecium* FAIR-E 198, observada em leite, potencializou a produção de pediocina AcH e enterocina. Porém, houve supressão da atividade de nisina produzida por *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, o que prejudicou o desempenho desta cultura sobre *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* quando empregada em queijo Minas Frescal.

Embora os resultados obtidos demonstrem que as culturas bacteriocinogênicas avaliadas não possam ser empregadas como único método de conservação, estas podem atuar em sinergia com outros fatores para aumentar a eficiência do controle de patógenos Gram-positivos em derivados lácteos fermentados.

Nas condições avaliadas neste estudo, as culturas bacteriocinogênicas *Lb. plantarum* ALC 01 e mesmo *E. faecium* FAIR-E 198 que apresentou baixa atividade de aminopeptidases promoveram aumento da proteólise do queijo Minas Frescal, característica esta indesejável para o produto. Porém, outros estudos poderiam ser realizados para avaliar a viabilidade de aplicação destas culturas em outros tipos de queijos.

Lc. lactis subsp. *lactis* ATCC 11454 produtor de nisina, mesmo não tendo demonstrado atividade antimicrobiana significativa durante o período de estocagem do queijo Minas Frescal, apresentou características tecnológicas adequadas para utilização como cultura adjunta neste tipo de queijo. Porém, há necessidade de estudos para determinação as

condições ideais de utilização, além da identificação de fatores que interfiram na produção e atuação da nisina produzida por esta cultura no queijo Minas Frescal.