



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA MONTANHOLI DE LIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE BAL COM ATIVIDADE  
ANTI- LISTEIRA**  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA CEPA  
BACTERIOCINOGENÉTICA NO CONTROLE DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* EM QUEIJO

---

Londrina  
2022

FERNANDA MONTANHOLI DE LIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE BAL COM ATIVIDADE  
ANTI- LISTERIA**  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA CEPA  
BACTERIOCINOGENICA NO CONTROLE DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* EM QUEIJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti

Co-orientador: Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L768i Lira, Fernanda Montanholi de.  
IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE BAL COM ATIVIDADE ANTI-LISTEIRA :  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA CEPA BACTERIOCINOGÊNICA NO  
CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO / Fernanda Montanholi  
de Lira. - Londrina, 2022.  
53 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.  
Coorientador: Ulisses de Pádua Pereira.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia - Tese. 2. Segurança de Alimentos - Tese. I. Beloti, Vanerli. II.  
Pereira, Ulisses de Pádua . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

FERNANDA MONTANHOLI DE LIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE BAL COM ATIVIDADE  
ANTI- LISTEIRA**  
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA CEPA  
BACTERIOCINOGENÉTICA NO CONTROLE DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* EM QUEIJO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Dr. Ronaldo Tamanini  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2022.

LIRA, Fernanda. **Identificação de cepas de *Lactobacillus* spp. com atividade anti-listeira:** caracterização e aplicação da cepa bacteriocinogênica no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL), são encontradas naturalmente em diversos alimentos, inclusive leite e derivados e podem contribuir como culturas iniciadoras ou adjuvantes para a produção de características desejáveis aos produtos alimentícios, além de produzirem substâncias com atividade antimicrobiana frente a patógenos alimentares como as bacteriocinas. Devido à crescente demanda dos consumidores por produtos sem aditivos químicos, as bacteriocinas podem ser consideradas uma alternativa bastante adequada para a conservação microbiológica de alimentos e proteção contra patógenos. Bacteriocinas têm sido usadas com o objetivo de inibir patógenos, como a *Listeria monocytogenes* em alimentos, através da adição de culturas microbianas produtoras de bacteriocinas ou da adição deste peptídeo antimicrobiano purificado ou semi-purificado. Os queijos, sobretudo os frescos ou de curta maturação, são especialmente vulneráveis à contaminação por patógenos, e em especial pela *Listeria monocytogenes*, que é um microrganismo ambiental frequente no leite e nas plantas de laticínios, e que pode re-contaminar o queijo em qualquer momento do processamento após a pasteurização do leite. O objetivo do estudo foi: identificar BALs produtoras de bacteriocina e caracterizar as cepas com atividade anti-listeria; caracterizar a bacteriocina e avaliar in vitro sua eficiência como conservante natural; avaliar o efeito anti-listeria da cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* bacteriocinogênica em queijos e produzir um filme comestível com efeito antilisterial. De 355 cepas de BAL testadas, duas (QS494 e QS530) foram capazes de produzir bacteriocina contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 pelo método spot-on-lawn e foram identificadas como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*. Observou-se efeito bactericida do sobrenadante livre de células (CFS) da cepa QS494 (*Lactiplantibacillus plantarum*) já nas primeiras 8 horas, com redução de 1,7 log nas contagens de células viáveis de *Listeria*, enumeradas também em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas a 36 °C. Ambas as cepas apresentaram boas características tecnológicas (atividade proteolítica e lipolítica, produção de diacetil) e ausência de produção de fatores de virulência (hemólise e gelatinase). Mudanças no pH do CFS obtido de *Lactiplantibacillus plantarum* não afetou sua atividade antimicrobiana. Além disso sua atividade antimicrobiana permaneceu estável após 10 min a 55, 80 e 100 °C. Nenhuma diminuição na atividade foi relatada após o tratamento por 15 min a 121° C e mesmo após submetido a congelamento (-20 °C) sua atividade inibitória foi observada após descongelamento por 12 semanas. Na avaliação do efeito anti-listeria em queijos, observou-se uma redução de 3 log na contagem de *Listeria monocytogenes* em 120 horas, nos queijos produzidos com a BAL bacteriocinogênica, enquanto nos queijos produzidos com cultura não bacteriocinogênica, observou-se um aumento de 2 log nas contagens. Filmes comestíveis produzidos com adição de bacteriocina precipitada nas concentrações de 50 e 25 mg/ml apresentaram efeito antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, com halos de 19 mm e 14 mm, respectivamente. Assim, as duas cepas estudadas possuem potencial tecnológico e de biossegurança, a bacteriocina por elas produzida apresentou bons resultados quando avaliada quanto à sua resistência às variações de pH e temperatura, e a cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* apresentou excelente resultados no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos, além disso a película comestível produzida com a bacteriocina também apresentou efeito anti-listeria in vitro. O que indica que as cepas apresentam potencial

para serem utilizadas na indústria de alimentos para a elaboração de produtos lácteos, principalmente na produção de queijos.

**Palavras-chave:** BAL; bacteriocina; queijos; películas comestíveis

LIRA, Fernanda. **Identification of *Lactobacillus* spp. with antilisterial activity:** Characterization and application of the bacteriocinogenic strain in the control of *Listeria monocytogenes* in cheese. 2022. 46 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Health Science) - State University of Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are found naturally in several foods, including milk and dairy products, and can contribute as starter cultures or adjuvants for the production of desirable characteristics in food products, in addition to producing substances with antimicrobial activity against food pathogens such as bacteriocins. Due to the growing consumer demand for products without chemical additives, bacteriocins can be considered a very suitable alternative for the microbiological conservation of food and protection against pathogens. Bacteriocins have been used to inhibit pathogens such as *Listeria monocytogenes* in foods by adding bacteriocin-producing microbial cultures or by adding this purified or semi-purified antimicrobial peptide. Cheeses, especially fresh or short-ripened cheeses, are especially vulnerable to contamination by pathogens, in particular by *Listeria monocytogenes*, which is an environmental microorganism common in milk and dairy plants, and which can re-contaminate cheese anywhere. processing time after pasteurization of milk. The study was carried out in 4 stages: to identify bacteriocin-producing BALs and to characterize the strains with anti-listeria activity; characterize bacteriocin and evaluate in vitro its efficiency as a natural preservative; to evaluate the anti-listeria effect of the bacteriocinogenic strain of *Lactiplantibacillus plantarum* in cheeses and to produce an edible film with anti-listerial effect. Of 355 LAB strains tested, two (QS494 and QS530) were able to produce bacteriocin against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 by the spot-on-lawn method and were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. A bactericidal effect of the cell-free supernatant (CFS) of strain QS494 (*Lactiplantibacillus plantarum*) was observed in the first 8 hours, with a 1.7 log reduction in the viable *Listeria* cell counts, also numbered in 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours at 36°C. Both strains showed good technological characteristics (proteolytic and lipolytic activity, production of diacetyl) and absence of production of virulence factors (hemolysis and gelatinase). Changes in the pH of CFS obtained from *Lactiplantibacillus plantarum* did not affect its antimicrobial activity. Furthermore, its antimicrobial activity remained stable after 10 min at 55, 80 and 100 °C. No decrease in activity was reported after treatment for 15 min at 121°C. And even after freezing (-20°C) its inhibitory activity was observed after thawing for 12 weeks. In the evaluation of the anti-listeria effect in cheeses, a reduction of 3 log in the Count of *Listeria monocytogenes* in 120 hours was observed, in cheeses produced with bacteriocinogenic BAL, while in cheeses produced with non-bacteriocinogenic culture, an increase of 2 logs was observed. in the counts. Edible films produced with the addition of precipitated bacteriocin at concentrations of 50 and 25 mg/ml showed an antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, with halos of 19 mm and 14 mm, respectively. Thus, the two strains studied have technological and biosafety potential, the bacteriocin produced by them showed good results When evaluated regarding its resistance to pH and temperature variations, and the *Lactiplantibacillus plantarum* strain showed excellent results in the control of *Listeria monocytogenes* in cheeses, in addition, the edible film produced with the bacteriocin also showed an anti-listeria effect in vitro. This indicates that the strains have the potential to be used in the food industry for the elaboration of dairy products, mainly in the production of cheeses.

**Key words:** LAB; bacteriocin; cheeses; edible skins

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes* a  $10^6$  ..... 44
- Gráfico 2** - Contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes* a  $10^4$  ..... 44
- Gráfico 3** - Contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes* a  $10^2$  ..... 45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fluxograma da produção de queijos ..... 38
- Figura 2** - Viabilidade de *Listeria monocytogenes* ATCC 7664 em sobrenadante inoculado com a cepa QS494 e ajustado a pH 6.0 e aquecido a 80 °C durante 10 minutos (SAA) e MRS (controle do crescimento)..... 41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| BAL               | Bactérias ácido láticas  |
| BHI               | <i>Brain Hart Infusion</i>                                     |
| CFS               | Sobrenadante livre de células                                  |
| DNA               | Ácido desóxidorribonucléico                                    |
| EDTA              | Ácido etilenodiamino tetra-acético                             |
| FAO               | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura   |
| GRAS              | Geralmente Reconhecida como Segura                             |
| mm                | Mili-mol   |
| mL                | Mililitro  |
| mM                | Mili-molar   |
| MM                | Mega-Molar   |
| pmol              | Pico-mol   |
| TE                | Solução Tris-EDTA Tris 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol |
| EU                | União Europeia   |
| UFC               | Unidade Formadora de Colônia                                   |
| µL                | Micro litro  |
| IN                | Instrução Normativa  |
| AC                | <i>Aerobic Count</i>   |
| LIPOA             | Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal           |
| UEL               | Universidade Estadual de Londrina                              |
| RNA               | Ácido Ribonucléico   |
| EDTA              | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                             |
| USA               | United Estates of America                                      |
| UV                | Ultra-violeta  |
| ng/mL             | nanograma por militro  |
| log               | Logarítimo   |
| pb                | Pares de base  |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de magnésio  |

## SUMÁRIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                 | 13 |
| <b>2</b> | <b>ESTADO DA ARTE</b> .....             | 14 |
| 2.1      | BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA .....             | 14 |
| 2.2      | BACTERIOCINAS .....                     | 16 |
| 2.3      | <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....     | 19 |
| 2.4      | QUEIJO .....                            | 21 |
|          | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> ..... | 23 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....                  | 28 |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....                    | 28 |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....              | 28 |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO A</b> .....                   | 29 |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....                  | 45 |

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são encontradas naturalmente em uma variedade de alimentos, principalmente produtos lácteos (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005). BAL são morfologicamente gram-positivos, em forma de bastonete ou cocóide, não endosporantes, catalase e oxidase negativos, e são capazes de realizar fermentação em condições aeróbias e anaeróbias; além disso, esses microrganismos produzem ácido láctico como principal produto final da fermentação. Geralmente são mesofílicos, mas podem se multiplicar entre 5–45 °C. Além disso, as BALs podem produzir enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (SALMINEN et al., 1998).

As BALs são geralmente reconhecidos como seguras e podem contribuir para a formação de importantes produtos alimentícios em nível organoléptico; além disso, também podem atuar como biopreservativos, pois produzem compostos com atividade bactericida e/ou bacteriostática, como ácidos orgânicos fracos, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005).

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente que possuem atividade antimicrobiana e podem ser usados como conservantes naturais, aumentando assim a segurança do alimento e prolongando sua vida útil. Normalmente são produzidas por bactérias para eliminar cepas concorrentes e agir nas células-alvo, formando poros ou inibindo a síntese da parede celular (HASSAN et al., 2012).

Algumas BALs têm sido usadas para inibir patógenos alimentares como culturas iniciadoras, ou através da adição de bacteriocinas purificadas ou semipurificadas e inclusão de bacteriocinas em filmes comestíveis (CÁRDENAS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2014; VERA PINGITORE et al., 2012). Sua aplicação em filmes comestíveis tem ganhado imenso interesse, principalmente porque apenas uma quantidade mínima utilizada tem grande efeito antimicrobiano e não precisa ser incorporada como aditivo alimentar direto (KAPETANAKOU; SKANDAMIS, 2016a).

Vários países relataram o surto de listeriose devido ao consumo de leite e produtos lácteos (MARTINEZ-RIOS; DALGAARD, 2018). *Listeria monocytogenes* é capaz de colonizar,

sobreviver e se multiplicar em alimentos prontos para consumo, como queijo, mesmo sob condições de refrigeração; portanto, a contaminação do queijo por esse patógeno é uma grande preocupação (SCHVARTZMAN et al., 2011).

Sendo assim, a pesquisa de BAL bacteriocinogênicas é de suma importância, e, poderá contribuir com a segurança e preservação da qualidade de queijos, seja na forma de cultura para a produção dos queijos ou de biopelícula revestindo os queijos.

## 2. ESTADO DA ARTE

### 2.1 Bactérias ácido lácticas

As BAL pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacillus*, ordem *Lactobacilae* e famílias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae* (GAMAL et al., 2018).

Entre os gênero pertencentes as BAL estão: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissell* (GAMAL et al., 2018). As BAL são morfológicamente caracterizadas por serem cocos e bacilos, Gram-positivos, dispostos individualmente ou em cadeia, são catalase e oxidase negativas, não esporuladas, capazes de realizar a fermentação em aerobiose e anaerobiose e produzirem ácido láctico como principal produto da fermentação. Geralmente são mesófilas, no entanto, capazes de se multiplicarem entre 5 e 45 °C (SALMINEN et al., 1998).

Algumas das BAL são bem aceitas para serem usadas como culturas iniciadoras e/ou coadjuvantes em produtos fermentados e são Geralmente Reconhecidas Como Seguras (GRAS) (WESSELS et al., 2004).

As BAL podem produzir enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que agem transformando os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis. (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005)

O sistema proteolítico das bactérias lácticas está relacionado com a utilização da caseína e fornece às células aminoácidos essenciais durante o seu crescimento no leite. As bactérias lácticas e a produção de proteases desempenham um papel crucial nas propriedades organolépticas dos

produtos lácteos fermentados. O sistema proteolítico das bactérias lácticas compreende proteinases, peptidases e proteínas de transporte específicas. As proteinases clivam a caseína em peptídeos, então as peptidases (intracelulares) degradam os peptídeos em aminoácidos e peptídeos menores (KIELISZEK et al., 2021).

Na indústria de produtos lácteos as enzimas proteolíticas são utilizadas para hidrolisar proteínas e também para coagular proteínas do leite no processo de fabricação de queijos. Vários hidrolisados de proteínas são obtidos do leite usando enzimas proteolíticas. Enzimas proteolíticas exógenas utilizadas para a produção de queijo são muito importantes. Algumas proteases microbianas produzidas por BAL podem substituir a quimosina no processo de coagulação de queijos. *E. faecalis* é capaz de produzir uma protease ativa, o que indica a possibilidade de sua aplicação para apoiar a quebra e liberação de peptídeos bioativos da proteína do soro do leite além disso, essa espécie também produz enzimas que são capazes de hidrolisar proteínas alergênicas no leite, possuindo assim um bom potencial para a fabricação de produtos lácteos hipoalergênicos (BISCOLA et al., 2018; KIELISZEK et al., 2021; WORSZTYNOWICZ et al., 2019).

As enzimas lipolíticas produzidas são responsáveis pela lipólise, que é um processo crucial para a formação de sabor em alguns queijos como os queijos azuis (Roquefort e Gorgonzola), queijos curados à superfície (Camembert e Brie) e em queijos duros, como o italiano Parmigiano Reggiano e o Pecorino Romano (WORSZTYNOWICZ ; SPINNLER, 1996; QIAN; NELSON; BLOOMER, 2002).

A lipólise começa com a hidrólise das gorduras presentes no leite, e continua com a transformação de alguns produtos em compostos secundários, contribuindo para o sabor final do queijo (OMAR et al., 2016).

O diacetil, é um produto final do metabolismo do citrato, é um componente essencial em muitos produtos lácteos, pois fornece um aroma amanteigado típico (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010)

Além de contribuir no aroma e textura dos queijos através da produção de proteases, lipases e diacetil, as BAL também podem atuar como biopreservadoras. Isso se deve principalmente pela acidificação originada da produção de ácidos orgânicos fracos, dióxido de carbono ou peróxido de hidrogênio e também pela síntese de bacteriocinas (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005).

Apesar de ser caracterizada como benéfica e geralmente reconhecida como segura (GRAS), a BAL pode expressar uma variedade de mecanismos patogênicos e causar doenças em hospedeiros humanos e em animais. Para seleção de cepas probióticas faz-se necessária a avaliação da expressão de fatores de virulência, como: produção de hemolisinas e gelatinase (ROSCA et al., 2016).

A hemolisina é uma toxina bacteriana formadora de poros clássica. A toxina purificada tem propriedades hemolíticas, dermonecróticas e letais impressionantes. A proteína interage e danifica uma variedade de membranas celulares, libera hemoglobina de eritrócitos de várias espécies de mamíferos e aves e é citotóxica para várias linhagens celulares em cultura de tecidos. Ela lisa plaquetas de coelho e humanos e rompe os lisossomos. Causa contração no músculo liso esquelético e vascular, sendo que esta última ação talvez explique sua propriedade de causar necrose dérmica localizada. A toxina  $\alpha$  forma poros nas membranas das células endoteliais, levando à vasoconstrição e aumentando a permeabilidade vascular, e também tem efeitos que levam à apoptose de várias células diferentes (BURNSIDE et al., 2010).

As outras toxinas hemolíticas,  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\delta$  hemolisina, também possuem atividades hemolíticas e citotóxicas. Altamente citotóxica, a  $\gamma$  hemolisina lisa os neutrófilos humanos e a toxina  $\beta$  produz efeitos letais e dermonecróticos (BURNSIDE et al., 2010).

A gelatinase também desempenha um papel importante na patogenicidade, pois é uma protease envolvida na hidrólise de gelatina, caseína, colágeno e hemoglobina, e pequenas proteínas bioativas, particularmente feromônios sexuais são alvos dessas enzimas. (ARCHIMBAUD et al., 2002).

## 2.2 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos microbianos, sintetizados pelos ribossomos, produzidos por um grande número de bactérias, incluindo as bactérias ácido lácticas, possuem atividade antimicrobiana, tendo o poder de aumentar a segurança e prolongar a vida útil dos alimentos (AUTHORS; FURLANETO; MAIA, 2016).

As bacteriocinas, são produzidas, frequentemente para ajudar na sobrevivência da bactéria, eliminando suas competidoras do mesmo gênero ou espécie. No entanto, vários patógenos mostram-se sensíveis a essas substâncias e são também eliminados por elas (KAYA; SIMSEK, 2019). O mecanismo de ação utilizado mais frequentemente pelas bacteriocinas para eliminar cepas

competidoras, consiste na destruição das células alvo através da formação de poros ou inibição da síntese da parede celular (HASSAN et al., 2012).

Atualmente as bacteriocinas são divididas em três principais classes, de acordo com suas características genéticas e bioquímicas. As de classe I compreendem de 19 a 50 aminoácidos, dentre elas, se encontram a Nisina, lantionina,  $\beta$ -metilantionina, desidratãodrobutirina, desidroalanina e labiríntico. Dentre as bacteriocinas de classe II estão pequenos peptídeos estáveis ao calor. Não modificados, pertencem à essa classe bacteriocinas como a pediocina. Finalmente, na classe III, se encontram as bacteriocinas grandes e lábeis ao calor, para as quais existem informações escassas. A colicina, a helviticina e a enterolisina são exemplos de bacteriocinas dessa classe (KAYA; SIMSEK, 2019).

Apesar de várias bacteriocinas já terem sido caracterizadas, como, por exemplos: plantaricinas (FERNANDES et al., 2017), pediocinas (GUTIÉRREZ-CORTÉS et al., 2018), enterocinas (VERA PINGITORE et al., 2012), entre outras, apenas a nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é aprovada pela Organização Mundial de Saúde desde 1969, sendo a única bacteriocina amplamente comercializada e utilizada como conservante alimentar direto em mais de 40 países, incluindo o Brasil (BALCIUNAS et al., 2013).

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e buscam por produtos naturais e saudáveis. As bacteriocinas podem ser consideradas uma alternativa aos conservantes químicos em alimentos, pois são inofensivas às células eucarióticas e são prontamente digeridas pelas enzimas proteolíticas estomacais devido à sua natureza proteica (YILDIRIM et al., 2014). Além de serem compostos inodoros, insípidos e incolores, podendo ser adicionados à produtos alimentícios sem alterar suas propriedades principais (SOLTANI et al., 2021). A aplicação de bacteriocinas com o objetivo de inibir patógenos em alimentos, tem sido feita através da adição de culturas produtoras ou diretamente de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas (CÁRDENAS et al., 2016).

O uso das bacteriocinas como conservantes de alimentos além de estender a vida útil desses produtos e diminuir o risco de transmissão de patógenos alimentares por meio da cadeia alimentar, reduz as perdas econômicas devido à deterioração de alimentos, *recalls* ou surtos e permitem a aplicação de tratamentos menos severos durante o processamento dos alimentos, o que tem como resultado uma melhor preservação de nutrientes, vitaminas e propriedades organolépticas desses produtos (SOLTANI et al., 2021).

A nisina é a bacteriocina mais estudada e é amplamente utilizada como conservante em alimentos. Nisina pura ou preparações de nisina podem ser obtidas cultivando cepas produtoras de nisina de *L. lactis ssp. lactis* seguido por métodos de extração e purificação adequados (HURST, 1981). A nisina é eficaz no controle de vários patógenos, como *Listeria monocytogenes* (ZHAO et al., 2020), *Staphylococcus aureus* (WANG et al., 2020) e *Clostridium tyrobutyricum* (ÁVILA et al., 2020).

A nisina é utilizada como conservante em vários alimentos, como em leite integral, magro e desnatado, queijos, linguiça, comida enlatada e carne crua (GHARSALLAOUI et al., 2016). No processo de preservação da carne, quando a nisina está em contato com a matriz da carne, ela terá uma atividade antimicrobiana dependente das características da carne, como teor de gordura e tipo de fosfato, condições de processamento e armazenamento. Em carnes curadas ou em produtos cárneos embalados à vácuo o crescimento da microbiota acontece essencialmente na superfície, sendo assim nesses produtos a eficácia de um tratamento antimicrobiano pode ser aumentada aplicando o composto antimicrobiano à superfície. Isso poderia ser obtido através do banho de imersão dos produtos, através do uso de spray ou ainda usando um sistema de embalagem (HASSAN et al., 2019; SOLTANI et al., 2021).

Na produção de queijos, a nisina é adicionada durante a etapa do aquecimento do leite, juntamente com os sais de fusão em produtos que o utilizam, como o requeijão e o queijo fundido, ou ainda pode ser incorporada ou pulverizada na superfície desses produtos na forma de pó comercial seco contendo uma pequena quantidade de nisina pura (2,5% em peso) (GHARSALLAOUI et al., 2016).

Davies; Bevis; Delves-Broughton., (1997) demonstraram que a incorporação de nisina em queijos poderia inibir efetivamente o crescimento de *Listeria monocytogenes* por um período de oito semanas ou mais (dependendo do tipo de queijo). E que queijos sem a adição de nisina continham níveis inseguros do patógenos dentro de 1-2 semanas de incubação.

Pinto *et al.*, (2011) estudaram o efeito da nisina em queijos Serro e observaram que a adição de nisina não afetou as características físico-químicas e mecânicas dos queijos e que a adição de nisina inibia o crescimento de *Staphylococcus aureus* nesses queijos.

As funções essenciais da embalagem dos alimentos são a proteção e a conservação desses produtos, até seu consumo. As embalagens agem preservando-os de fatores externos que podem acelerar à sua degradação (KHARKWAL, 2015).

Nas últimas décadas a embalagem ativa antimicrobiana têm recebido bastante atenção da comunidade científica. A embalagem ativa é definida como: embalagem na qual constituintes subsidiários foram incluídos no material de embalagem para melhorar o desempenho do sistema de embalagem (KAPETANAKOU; SKANDAMIS, 2016b).

Os principais sistemas de embalagem ativa incluem removedores de oxigênio, absorvedores de umidade e emissores de carbono, a versão da embalagem ativa antimicrobiana é de grande interesse científico e comercial, pois o desenvolvimento de embalagens contendo substâncias ativas, como antimicrobianos naturais, possibilita estender o prazo de validade dos produtos, aumentar sua segurança alimentar e ainda melhorar suas propriedades sensoriais. O que não ocorre com os sistemas de embalagens tradicionais que geralmente só representam uma barreira entre o produto e o ambiente externo (KAPETANAKOU; SKANDAMIS, 2016b).

Os filmes ativos são produtos que contêm em sua composição substâncias que atuam melhorando propriedades sensoriais dos alimentos e/ou auxiliam em sua proteção, são formados preferencialmente a partir de polímeros naturais, atuando como uma matriz contínua e servindo de suporte para substâncias como antimicrobianos (RYSER, 2004).

Embalagens ativas devem possuir biodegradabilidade de seus componentes e distinguir-se pela retenção de superfície do agente ativo, difusão controlada e a possibilidade de agir em conjunto com outros métodos de conservação (RYSER, 2004).

Estudos recentes relataram a eficiência de películas preparadas com bacteriocinas no controle de *L. monocytogenes* em queijos. Eles avaliaram o efeito antilisteria de enterocinas produzidas por *Enterococcus avium*, incorporadas aos filmes comestíveis e aplicados como revestimentos antimicrobianos em queijos. Neste estudo eles observaram a redução de pelo menos 1 unidade logarítmica na contagem de *Listeria monocytogenes* (GUITIÁN et al., 2019) (IBARGUREN et al., 2019).

### 2.3 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* inclui mais de 20 espécies, mas somente uma é patogênica para humanos, a *L. monocytogenes* (WELLER et al., 2015).

*Listeria monocytogenes* é capaz de colonizar, sobreviver e/ou multiplicar-se em alimentos prontos para o consumo, como o queijo, mesmo em condições de refrigeração, já que é um micro-

organismo psicrotrófico (SCHVARTZMAN et al., 2011). É o agente causador da listeriose, que pode levar a doenças gastrointestinais ou septicemia, abortos, encefalites e até à morte de pacientes imuno-comprometidos e indivíduos suscetíveis, como mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos (MARTINEZ-RIOS; DALGAARD, 2018).

Na União Europeia (UE), entre os anos de 2009 a 2015 houve uma tendência crescente significativa a casos de listeriose. O número de casos humanos confirmados de listeriose foi de 1331 em 2009 e 2206 em 2015 (TURCK et al., 2016). Um total de 270 mortes por listeriose foram relatadas em dezenove estados membros da União Europeia (UE), sendo que a taxa geral de notificação da UE foi de 0,46 casos por 100.000 habitantes, com uma taxa de letalidade de 17,7% (TURCK et al., 2016)

Em Portugal, surtos de listeriose foram relatados entre março de 2009 e fevereiro de 2012, onde a taxa de mortalidade foi de 36,7%. Em 2009 e em 2010 foram observados 20 e 40 casos de listeriose, respectivamente. O rastreamento da fonte de contaminação, identificou que a infecção foi causada por queijos curados e frescos feitos com leite de vaca e cabra pasteurizado (MAGALHÃES et al., 2015).

Em 2001, no Japão, 84 pessoas foram acometidas por um surto de listeriose, após o consumo de queijo típico do país. Cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas do ambiente de processamento dos queijos (MAKINO et al., 2005).

Os primeiros relatos de surtos de listeriose associados a queijos, nos Estados Unidos (EUA), ocorreram em 1985. Esse surto resultou em 142 casos, 28 mortes e 20 perdas fetais. Os queijos envolvidos nesse caso eram queijos frescos e cotage, produzidos com uma mescla de leite cru e pasteurizado (JACKSON et al., 2018). No ano de 2012, nos Estados Unidos, houve um surto de listeriose, associada a ricota feita com leite de ovelha, pasteurizado, o queijo era importado da Itália. Esse caso envolveu 22 pacientes e causou 4 mortes (ACCIARI et al., 2016). Dos 58 surtos de listeriose relatados entre 1998 e 2014 nos EUA, um total de 17 (30%) foi associado ao queijo mole, particularmente queijos macios ao estilo latino (JACKSON et al., 2018).

No Brasil, devido à subnotificação, dados concretos não são gerados, impossibilitando maiores estatísticas sobre os surtos de listeriose. Barancelli (2011) em sua revisão de dados sobre a presença de *L. monocytogenes*, no Brasil, entre os anos de 1991 e 2009 encontrou uma ampla gama de ocorrência desse micro-organismo presente em queijos (BARANCELLI et al., 2011).

Entre 2007 e 2009 foram registrados 19 casos de listeriose no estado do Rio Grande do Sul e em 2017 a Anvisa proibiu a comercialização de 3 lotes de queijos, devido a presença de *Listeria monocitogenes*. Dentre os queijos contaminados encontravam-se 290 queijos prato, 303 mussarela e 312 queijo coalho (ANVISA, 2017).

## 2.4 Queijo

A produção mundial de queijo é de aproximadamente 22 milhões de toneladas por ano, e vem aumentando aproximadamente 4% ao ano nos últimos 30 anos. O maior produtor mundial é a Europa, onde são produzidas 11 milhões de toneladas por ano (FOX et al., 2017). Já na América do Sul, o Brasil é o maior produtor de queijos, produzindo aproximadamente 46,6 mil toneladas (FAO, 2012).

A produção de queijos no Brasil é uma prática realizada há séculos e devido à grande extensão territorial do país, cada região produz queijos com características sensoriais próprias e distintas entre si, a esses queijos se dá o nome de queijos artesanais.

Por ser bastante nutritivo e sofrer considerável manipulação, o queijo é susceptível a contaminações bacterianas e fúngicas, que podem interferir na qualidade final do queijo e causar danos à saúde do consumidor (AMADEU; LAVORATO, 2014).

Um dos queijos mais consumidos no Brasil atualmente é o queijo Minas Frescal, ele é obtido através da coagulação, agitação, moldagem, salga, embalagem e armazenamento, não havendo maturação (PORTO et al., 2009). Já o queijo Minas Padrão, classificado como semi-duro, amplamente consumido no país, um queijo tradicional, é preparado a partir de leite de vaca e possui período de maturação de 20 dias sob condições controladas, temperatura superior a 10 °C e inferior a 16°C, e 85% de umidade relativa (BRASIL.,2020).

Assim como o queijo Minas Padrão, o queijo prato, vice-líder do mercado brasileiro, deve possuir um período de maturação de no mínimo 25 dias, tempo necessário para adquirir suas características específicas (Brasil., 1997).

O queijo mais produzido no Brasil é o queijo mussarela, isso se deve à sua ampla utilização na culinária, seu processo de produção envolve além das etapas tradicionais utilizadas na produção do queijo Minas, a acidificação e a filagem da massa (SILVA, 2005) e, portanto, também não é um queijo maturado.

Como vemos, nenhum dos queijos de grande consumo no Brasil sofre maturação. O processo de maturação dos queijos age reduzindo a umidade, aumentando a acidez e a concentração de sais, reduzindo assim o risco da presença de patógenos (MAGALHÃES et al., 2015). As bactérias ácido lácticas contribuem nesse processo, agindo na proteção e sabor desses queijos, produzindo enzimas glicolíticas que aceleram o processo de acidificação dos queijos e também produzem ácidos orgânicos, dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio, além de sintetizarem bacteriocinas (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005). A maturação é tão eficiente na inibição de patógenos, que a maioria dos países do mundo, inclusive a União Europeia e os EUA, permite a confecção de queijos com leite cru, desde que maturados por 60 dias em temperatura superior a 5 °C (UNION, 2018).

Produtos lácteos fermentados, como os queijos, podem ser uma fonte natural de microorganismos produtores de bacteriocina, devido à grande variedade de BAL presente nesses produtos (PRITCHARD; PHILLIPS; KAILASAPATHY, 2010). Utilizar como fermentos, BAL produtoras de bacteriocinas com atividade contra patógenos, seria uma forma natural de promover a segurança dos produtos (BALCIUNAS et al., 2013).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIARI, V. A. et al. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: Investigations in Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 13, p. 2719–2727, 2016.
- AMADEU, J.; LAVORATO, A. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LATICÍNIOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS Evaluation of the microbiological quality of Minas Cheese produced by dairies in the state of Minas Gerais. p. 433–442, 2014.
- ARCHIMBAUD, C. et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 75–80, 2002.
- ASTERI, I. A. et al. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses - A pool of novel species and starters. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 595–604, 2009.
- AUTHORS, A.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão : Aspectos gerais das bacteriocinas Review : General aspects of bacteriocins. p. 267–276, 2016.
- ÁVILA, M. et al. Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 3343–3349, 2020.
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.
- BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 816–819, 2011.
- BARBOSA, M. S. et al. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. **Food Control**, v. 60, p. 103–112, 2016.
- BISCOLA, V. et al. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 564–574, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria de 07 de Março de 1996, Diário Oficial da União, Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento Técnico que fixa a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o queijo minas padrão. Instrução Normativa nº66, de 21 de julho de 2020, Diário Oficial da União, Brasília, 2020.

BURNSIDE, K. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of staphylococcus aureus by a serine/threonine kinase and phosphatase. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

CÁRDENAS, N. et al. Evaluation of technological properties of *Enterococcus faecium* CECT 8849, a strain isolated from human milk, for the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7665–7677, 2016.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2526–2535, abr. 2017.

CHEN, Y. S. et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 3, p. 193–199, 2014.

CYTRYŃSKA, M. et al. Detection of antibacterial polypeptide activity in situ after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 274–276, 2001.

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 in Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 343–346, 1997.

DE CASTRO, V. et al. Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 42, p. 3–5, 2012.

DIOP, M. B. et al. Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, v. 11, n. 4, p. 275–281, 2007.

DU, L. et al. Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. **Food Microbiology**, v. 68, p. 97–103, 2017.

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, out. 2010.

FERNANDES, P. et al. *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 433–442, 2017.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3–11, 2009.

GAMAL, E. et al. Classificação Bal revisão.pdf. **Research Journal of Applied Sciences**, v. 13, n. 12, p. 742–757, 2018.

- GHARSALLAOUI, A. et al. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262–1274, 2016.
- GUERREIRO, J. et al. Lactobacillus pentosus B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 2, p. 95–104, 2014.
- GUITIÁN, M. V. et al. Anti-Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 92–98, 2019.
- GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. et al. Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 383–398, 2018.
- HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162–7168, 2007.
- HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723–736, 2012.
- HASSAN, M. et al. Antimicrobial effect of nisin on *Bacillus cereus* isolated from some meat products. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 37, n. 1, p. 77–80, 2019.
- HEIMAN, K. E. et al. HHS Public Access. v. 144, n. 13, p. 2698–2708, 2019.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 77–84, 2005.
- HONG-XIN, J.; MI-YA, S.; GUANG-YU, G. Influence of *Lactobacillus casei* LC2W on the proteolysis and aroma compounds of Cheddar cheese during ripening period. **CYTA - Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 464–471, 2015.
- HURST, A.; INTRODUCTION, I. **A. hurst**. [s.l: s.n.]. v. 27
- IBARGUREN, C. et al. Anti-Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. v. 97, p. 92–98, 2019.
- JACKSON, K. A. et al. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–2014. v. 24, n. 6, p. 1116–1118, 2018.
- KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in**

**Food Science**, v. 12, p. 1–12, 2016a.

KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 1–12, dez. 2016b.

KAYA, H. I.; SIMSEK, O. Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. **Lwt**, v. 115, n. June, p. 108464, 2019.

KHARKWAL, H. Antimicrobial food packaging : potential and pitfalls. v. 6, n. June, p. 1–9, 2015.

KIELISZEK, M. et al. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. **Molecules**, v. 26, n. 7, 2021.

LAEMMLI, U. K. 227680a0. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

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

MAGALHÃES, R. et al. Cheese-related Listeriosis Outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. n. March 2009, p. 1–6, 2015.

MAKINO, S. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan , during 2001. v. 104, p. 189–196, 2005.

MARTINEZ-RIOS, V.; DALGAARD, P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 84, p. 205–214, 2018.

MOLIMARD, P.; SPINLER, H. E. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 2, p. 169–184, 1996.

MORAES, P. M. et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 318–328, 2012.

MORGAN, F. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1–2, p. 217–221, 2001.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: [s.l: s.n.].

OMAR, K. A. et al. Effects of microbial lipases on hydrolyzed milk fat at different time intervals

in flavour development and oxidative stability. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1035–1046, 2016.

OSBORNE, C. A. et al. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 2, p. 183–187, 2005.

PATTNAIK, P.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 213–218, 2005.

PINTO, M. S. et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 90–96, 2011.

PORTO, E. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas Study of Minas cheese shelf life. v. 2008, n. 002663, p. 262–269, 2009.

PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1545–1548, 2010.

QIAN, M.; NELSON, C.; BLOOMER, S. Evaluation of fat-derived aroma compounds in blue cheese by dynamic headspace GC/olfactometry-MS. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 7, p. 663–667, 2002.

QIAN, M.; REINECCIUS, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1362–1369, 2002.

RAM, C. et al. Development of Active Packaging Based on Agar-Agar Incorporated with Bacteriocin of *Lactobacillus sakei*. p. 1–9, 2021.

RIBEIRO, S. C. et al. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 573–585, 2014.

ROSCA, I. et al. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 949–954, 2016.

RYSER, E. T. Antimicrobial Edible Films and Coatings. v. 67, n. 4, p. 833–848, 2004.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93–106, 1998.

SCHÄGGER, H. Protocol: Tricine-SDS-PAGE. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SCHVARTZMAN, M. S. et al. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. **International Journal of**

**Food Microbiology**, v. 145, n. SUPPL. 1, p. S31–S38, 2011.

SILVA, F. T. **Queijo Mussarela Queijo Mussarela**. [s.l: s.n.].

SOLTANI, S. et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, p. 1–24, 2021.

SONG, D. F.; ZHU, M. Y.; GU, Q. Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2014.

SUMATHI, V.; REETHA, D. Isolation and screening of bacteriocin producing lactic acid bacteria from milk and milk products. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 11, p. 21–23, 2009.

TURCK, D. et al. **Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283** EFSA Journal, 2016.

UNION, E. **Guidance on Cheese As Raw Material**, 2018. Disponível em:  
<[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety\\_fh\\_guidance\\_cheese\\_raw\\_material\\_manufacture\\_products\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_guidance_cheese_raw_material_manufacture_products_en.pdf)>

VALDÉS, A. et al. State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications. **Coatings**, v. 7, n. 4, p. 56, 19 abr. 2017.

VERA PINGITORE, E. et al. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38–47, 2012.

WANG, H. et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus acidophilus* surface-layer protein in combination with nisin against *Staphylococcus aureus*. **Lwt**, v. 124, n. September 2019, p. 109208, 2020.

WANG, Y. et al. Purification and Characterization of Plantaricin LPL-1, a Novel Class IIa Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 Isolated From Fermented Fish. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–12, 2018.

WELLER, D. et al. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 286–292, 2015.

WESSELS, S. et al. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. v. 15, p. 498–505, 2004.

WORSZTYNOWICZ, P. et al. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 61–69, 2019.

YILDIRIM, Z. et al. Enterocin HZ produced by a wild Enterococcus faecium strain isolated from a traditional, starter-free pickled cheese . **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 2, p. 164–172, 2014.

YOUSIF, N. M. K. et al. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385–4389, 2002.

ZHAO, X. et al. Antimicrobial kinetics of nisin and grape seed extract against inoculated *Listeria monocytogenes* on cooked shrimps: Survival and residual effects. **Food Control**, v. 115, n. February, p. 107278, 2020.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar bactérias produtoras de bacteriocina e avaliar sua aplicabilidade no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar cepas com efeito antilisteria
- Identificar cepas produtora de bacteriocina.
- Realizar a caracterização tecnológica e de patogenicidade das cepas produtoras de bacteriocina.
- Caracterizar a bacteriocina.
- Estudar a estabilidade da bacteriocina isolada, quanto ao pH e temperatura.
- Estudar o efeito anti-listéria do *Lactobacillus* spp. produtor de bacteriocina em queijo.
- Produzir a película protetora comestível para queijos, com efeito anti-listéria.

## ARTIGO A

### IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS DE *Lactobacillus* spp. COM ATIVIDADE ANTI-LISTEIRA

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA CEPA BACTERIOCINOGÊNICA NO CONTROLE DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO

#### RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) contribuem naturalmente para a preservação e segurança dos alimentos ao produzir metabólitos com atividade bactericida e/ou bacteriostática, sendo a bacteriocina o mais importante. O objetivo do estudo foi: identificar BALs produtoras de bacteriocina e caracterizar as cepas com atividade anti-listeria; caracterizar a bacteriocina e avaliar in vitro sua eficiência como conservante natural; avaliar o efeito anti-listeria da cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* bacteriocinogênica em queijos e produzir um filme comestível com efeito antilisterial. De 355 cepas de BAL testadas, duas (QS494 e QS530) foram capazes de produzir bacteriocina contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 pelo método spot-on-lawn e foram identificadas como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*. Foi observado efeito bactericida da cepa QS494 (*Lactiplantibacillus plantarum*) nas primeiras 8 horas, com redução de 1,7 log, utilizando o CFS com *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), onde as células viáveis foram contadas no Agar Seletivo de Listeria em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas a 36 °C. Ambas as cepas apresentaram boas características tecnológicas (atividade proteolítica e lipolítica, produção de diacetil) e ausência de produção de fatores de virulência (hemólise e gelatinase). Mudanças no pH do CFS obtido de *Lactiplantibacillus plantarum* não afetou sua atividade antimicrobiana. Além disso sua atividade antimicrobiana permaneceu estável após 10 min a 55, 80 e 100 °C. Nenhuma diminuição na atividade foi relatada após o tratamento por 15 min a 121 °C. E mesmo após submetido a congelamento (-20 °C) sua atividade inibitória foi observada após descongelamento por 12 semanas. Na avaliação do efeito anti-listeria em queijos foi observado uma redução de 3 log na contagem de *Listeria monocytogenes* em 120 horas nos queijos produzidos com a BAL bacteriocinogênica, enquanto nos queijos produzidos com cultura não bacteriocinogênica, observamos um aumento de 2 log na contagem de *Listeria monocytogenes*. Filmes comestíveis produzidos com adição de bacteriocina precipitada nas concentrações de 50 e 25 mg / ml apresentaram efeito antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, com halos de 19 mm e 14 mm, respectivamente. Assim, as duas cepas estudadas possuem potencial tecnológico e de biossegurança, a bacteriocina por elas produzida apresentou bons resultados quando avaliada quanto sua resistência às variações de pH e temperatura, e a cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* apresentou excelente resultados no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos, além disso a película comestível produzida com bacteriocina também apresentou efeito anti-listeria in vitro. O que indica que as cepas apresentam potencial para serem utilizadas na indústria de alimentos para a elaboração de produtos lácteos, principalmente na produção de queijos.

Palavras-chave: BAL, bacteriocina, queijos, películas comestíveis

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) naturally contribute to food preservation and safety by producing metabolites with bactericidal and/or bacteriostatic activity, with bacteriocin being the most important. The study was carried out in 4 steps: identifying bacteriocin-producing BALs and characterizing the strains with anti-listeria activity; characterize bacteriocin and evaluate in vitro its efficiency as a natural preservative; to evaluate the anti-listeria effect of the bacteriocinogenic strain of *Lactiplantibacillus plantarum* in cheese and produce an edible film with antilisterial effect. Of 355 BAL strains tested, two (QS494 and QS530) were able to produce bacteriocin against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 by the spot-on-lawn method and were identified as *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. A bactericidal effect of strain QS494 (*Lactiplantibacillus plantarum*) was observed in the first 8 hours, with a reduction of 1.7 log, using CFS with *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), where viable cells were counted on *Listeria* Selective Agar at 0.2, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours at 36 °C. Both strains showed good technological characteristics (proteolytic and lipolytic activity, diacetyl production) and no production of virulence factors (hemolysis and gelatinase). Changes in the pH of the CFS obtained from *Lactiplantibacillus plantarum* did not affect its antimicrobial activity. Furthermore its antimicrobial activity remained stable after 10 min at 55, 80 and 100 °C. No decrease in activity was reported after treatment for 15 min at 121 °C. And even after freezing (-20 °C) its activity inhibitory was observed after thawing for 12 weeks. In the evaluation of the anti-listeria effect in cheeses, a reduction of 3 log in the count of *Listeria monocytogenes* in 120 hours was observed in cheeses produced with bacteriocinogenic BAL, while in cheeses produced with non-bacteriocinogenic culture, we observed an increase of 2 log in the count of *Listeria monocytogenes*. Edible films produced with the addition of precipitated bacteriocin at concentrations of 50 and 25 mg / ml showed antimicrobial effect against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, with halos of 19 mm and 14 mm, respectively. Thus, the two strains studied have technological and biosafety potential, the bacteriocin produced by them showed good results when evaluated regarding its resistance to pH and temperature variations, and the *Lactiplantibacillus plantarum* strain showed excellent results in the control of *Listeria monocytogenes* in cheeses, in addition, the edible film produced with bacteriocin also showed an anti-listeria effect in vitro. This indicates that the strains have the potential to be used in the food industry for the elaboration of dairy products, mainly in the production of cheese.

Keywords: BAL, bacteriocin, cheeses, edible films

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) pertencem a uma grande família de micro-organismos Gram positivos, não esporulados, microaerófilos, que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose. São encontrados naturalmente em diversos alimentos, inclusive leite e derivados (FRANCIOSI et al., 2009). As BAL podem contribuir como culturas iniciadoras ou adjuvantes para a produção de características desejáveis aos produtos alimentícios. Além de influenciar diretamente em nível sensorial, algumas cepas são capazes de sintetizar substâncias com atividade antimicrobiana frente a patógenos. Os principais componentes com atividade inibitória são os ácidos, diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e as bacteriocinas (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005).

Bacteriocinas, peptídeos produzidos por algumas BAL, são sintetizadas ribossomicamente, possuem atividade antimicrobiana, e são Geralmente Reconhecidas Como Seguras (GRAS) pela FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), podendo ser utilizadas como conservante natural (DIOP et al., 2007). Devido à crescente demanda dos consumidores por produtos mais naturais, as bacteriocinas podem ser consideradas uma alternativa mais adequada do que os conservantes químicos (YILDIRIM et al., 2014).

Algumas bacteriocinas têm sido usadas com o objetivo de inibir patógenos, como a *Listeria monocytogenes* em alimentos, através da adição de culturas microbianas produtoras de bacteriocinas ou da adição deste peptídeo antimicrobiano purificado ou semi-purificado (CÁRDENAS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2014; VERA PINGITORE et al., 2012). A nisina é uma das bacteriocinas mais utilizadas em alimentos com a finalidade de controlar o crescimento de patógenos (BALCIUNAS et al., 2013).

Várias bactérias podem contaminar os queijos, sobretudo os frescos ou pouco maturados, feitos com leite cru ou pasteurizado, que não apresentam as condições adversas ao crescimento de patógenos, diferente dos queijos que passam por uma maturação maior do que 60 dias. Uma das mais importantes bactérias, nesse contexto, é a *Listeria monocytogenes*, que preocupa por sua alta letalidade e por concentrar várias características que favorecem sua contaminação e sobrevivência nos queijos. A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria

ambiental, frequente nas plantas de processamento de leite e derivados, e pode contaminar os produtos após a pasteurização. Também pode sobreviver e multiplicar-se em condições de refrigeração. Assim, o queijo é um forte candidato à contaminação, devido aos vários passos de produção e manipulação (SCHVARTZMAN et al., 2011). Surtos de listeriose relacionados ao consumo de queijos, produzidos com leite cru ou recontaminados após o tratamento térmico, têm sido relatados em muitos países, causando inúmeras mortes (MARTINEZ-RIOS; DALGAARD, 2018).

Nos EUA, em julho de 2012 foi identificada a cepa de *L. monocytogenes* isolada de seis pacientes e duas amostras de diferentes queijos. Devido a isso, uma investigação de surto em vários estados foi iniciada. E identificaram a associação entre comer queijos macios e doenças relacionadas a surtos. Quatorze jurisdições relataram 22 casos de listeriose, de março a outubro de 2012, incluindo quatro mortes e uma perda fetal, onde seis pacientes relataram comer ricota salata; um relatou comer queijo provavelmente cortado com equipamento também usado para salata de ricota contaminada, e mais nove relataram comer outros queijos que também podem ter sido contaminados (HEIMAN et al., 2019).

No ano seguinte, na Espanha, foram detectados 10 casos de listeriose associados ao consumo de queijos frescos, 3 pacientes apresentaram meningoencefalite, outros 3 apresentaram septicemia e os outros 4 demonstraram casos de transmissão vertical (DE CASTRO et al., 2012).

Dessa forma, onde o consumo de queijos frescos ou pouco maturados é frequente, seria desejável, que a segurança do produto pudesse ser melhorada. E, nesse sentido, as bacteriocinas parecem ser uma excelente alternativa, merecendo estudos contínuos para que novas bacteriocinas e novas formas de utilização possam ser propostas. Assim, à já conhecida aspersão de carcaças com nisina, vêm se somando inúmeras possibilidades, uma delas são as películas comestíveis para revestimento e proteção de alimentos (IBARGUREN et al., 2019).

Em nosso trabalho, identificamos bactérias produtoras de bacteriocina e avaliamos sua aplicabilidade no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Identificação das cepas produtoras de bacteriocina

No total, 355 cepas de BAL foram estudadas, incluindo 270 cepas de leite de cabra e 85 de queijo Serrano artesanal. As cepas pertencem ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina (LIPOA / UEL) e foram previamente isoladas em outros estudos (PEREIRA, 2018; SEIXAS, 2018). Todos os isolados foram selecionados de acordo com a atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, utilizando o método *spot-on-lawn* (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991). Para investigar a natureza do composto antimicrobiano, mais especificamente, a presença de bacteriocinas ou substâncias semelhantes à bacteriocina (BLIS). Obteve-se o sobrenadante livre de células anti-*Listeria* (CFS). As células foram removidas do caldo DE MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS), (Acumedia, Baltimore, USA) por centrifugação ( $14.500 \times \text{rpm}$ , 15 min,  $10^\circ \text{C}$ ), neutralizadas a pH 6,0 com NaOH 0,1 N, esterilizadas por filtro usando filtros de membrana de acetato de celulose ( $0,22 \mu\text{m}$ ) e, em seguida, foram aquecidas a  $80^\circ \text{C}$  por 10 min, para excluir o efeito antimicrobiano de ácidos orgânicos ou peroxidase (CAVICCHIOLI et al., 2017). Além disso, os CFS foram tratados com proteinase K, e quando observada a inativação do efeito anti-*Listeria*, confirmava-se a origem proteica da bacteriocina.

### 2.2 Identificação genética das cepas produtoras de bacteriocina

#### 2.2.1 Extração do DNA e amplificação do gene 16 rRNA

Para extração foi utilizada a técnica da fervura de acordo com Ribeiro Júnior et al. (2016), que consistiu em suspender 1 mL do caldo de cultura em tubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase e RNase, pirogênico e centrifugados a  $14.500 \text{ rpm}$  por 5 minutos a  $4^\circ \text{C}$ . Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se  $200 \mu\text{L}$  de TE [Tris-HCl (10MM): EDTA (1mM)] ao precipitado de células bacterianas, e em seguida ressuspendeu-se em vortex. Os tubos permaneceram por 15min em banho de ebulição. Posteriormente, submeteu-se os tubos a banho de gelo pelo mesmo período. Os tubos foram novamente centrifugados a  $14.000 \text{ rpm}$  por 5 min a  $4^\circ \text{C}$  e o sobrenadante recolhido ( $100 \mu\text{L}$ ) e transferido para microtubo estéril e estocado a  $-20^\circ \text{C}$ .

A amplificação parcial do gene 16S rRNA por Polymerase Chain Reaction (PCR) foi realizada utilizando-se os primers 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACCTTGTTACGACTT), descritos por Osborne et al. (2005). A reação foi realizada com 1 µL de amostra (50 ng/mL), 39 µL de água ultrapura esterilizada; 1 µL de dNTPs (10 mmol L<sup>-1</sup> de cada base nitrogenada); 5 µL de tampão 10X; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol L<sup>-1</sup>); 1 µL de cada primer (27 F e 1492 R na concentração de 20 pmol µL<sup>-1</sup>); 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>), com volume final de 50 µL, e realizada em termocilador (Aeris<sup>TM</sup> Thermal Cycler, Esco<sup>®</sup> Micro Pte, Singapore) utilizando-se desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Young et al. (1991) com modificações.

Para visualização do resultado da PCR, as amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e submetidas por 1 hora a uma tensão constante de 5 V/cm<sup>2</sup>. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio a 0,2 µg/mL por 20 minutos e a imagem capturada em transiluminador UV.

### 2.2.2 Sequenciamento de DNA

A purificação do produto da PCR foi realizada utilizando o Kit de purificação PureLink<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e a quantificação de DNA, foi realizada utilizando o Qubit<sup>®</sup> dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante.

Para sequenciamento do gene rRNA das cepas, utilizou-se o kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) em sequenciador automático pelo método de Sanger (ABI 3500. Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) com os primers 27F e 1492R (OSBORNE et al., 2005), com produto de 1400 pb.

As sequências foram comparadas com o banco de dados do GeneBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para busca de similaridades.

## 2.2 Caracterização tecnológica e de segurança alimentar das cepas.

Todas as análises de caracterização tecnológica e de segurança alimentar das cepas foram realizadas em duplicata.

### 2.3.1 Atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica, as BAL foram inoculadas em ágar MRS (Acumedia, Baltimore, USA), e incubadas durante 24 horas a 30 °C. Preparou-se o Ágar Leite (Acumedia, Baltimore, USA) suplementado (9:1) com solução de leite em pó desnatado (10%). Com o auxílio de uma haste de madeira estéril, inoculou-se as cepas na superfície do meio, e em seguida as placas foram incubadas durante 72 horas a 30 °C. Para a leitura dos resultados inundou-se as placas com HCl a 1% durante 1 minuto. A presença de um halo transparente em torno das colônias significa a atividade proteolítica (FRANCIOSI et al., 2009).

### 2.3.2 Atividade lipolítica

Para avaliar a atividade lipolítica, as BAL foram inoculadas em ágar MRS durante 24 horas a 30 °C. Preparou-se o ágar Tributirina (Oxoid®, Inglaterra) suplementado (99:1) com Tributirina para avaliação da atividade lipolítica, e com o auxílio de uma haste de madeira estéril semeou-se a superfície do meio, em seguida as placas foram incubadas durante 72 horas a 30 °C. A presença de um halo transparente em torno das colônias indica que existe atividade lipolítica (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007).

### 2.3.3 Produção de diacetil

A produção de diacetil foi determinada de acordo com Ribeiro et al. (2014). Tubos contendo 10 ml de leite desnatado estéril foram inoculados (1% v/v) com os isolados, e incubados a 30 °C por 24 horas. Em seguida, 1 ml de cada tubo foi homogeneizado com 0,5 ml de uma solução de alpha-naftol (1% p/v) e KOH (16% p/v) e incubado a 30 °C durante 10 minutos. A produção de diacetil foi considerada positiva quando houve a formação de um anel vermelho no topo dos tubos.

### 2.3.4 Atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica, as BAL foram inoculadas em ágar MRS (Acumedia, Baltimore, USA) durante 24 horas a 30 °C. Preparou-se o meio de ágar Sangue a partir de ágar Nutriente (Oxoid®, Inglaterra) com adição de 5% de sangue de ovino e distribui-se por placas de

petri. Com o auxílio de uma alça de platina semeou-se a superfície do meio, e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. A presença de um halo transparente em torno das colónias corresponde a uma hemólise  $\beta$ , quando existe um halo esverdeado em torno das colónias significa que é hemólise  $\alpha$  e por fim se não existe halo em torno das colónias trata-se de uma hemólise  $\gamma$  (ASTERI et al., 2009).

#### 2.3.5 Produção de gelatinase

A pesquisa da produção da enzima gelatinase foi realizada segundo a metodologia de Terzic-Vidojevic et al. (2009). Preparou-se um meio de cultura com 5g de peptona, 3g de extrato de levedura, 30g de gelatina, 17g de ágar e 1000 ml de água destilada e foi feita a esterilização em autoclave (121 °C, 15 minutos), distribuindo-se depois o meio em placas de Petri. As BAL foram inoculadas em ágar MRS (Acumedia, Baltimore, USA) durante 24 horas a 30 °C. Com o auxílio de um palito de madeira semeou-se a superfície do meio com cada BAL e em seguida incubou-se as placas durante 48 horas a 37 °C Após isso as placas foram inundadas com uma solução saturada de sulfato de amónio. A presença de um halo transparente em torno das colónias foi considerado uma reação positiva.

#### 2.4 Avaliação do efeito do CFS da cepa QS494 in-vitro contra *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Para determinar se o CFS da cepa QS494 tem atividade bactericida ou bacteriostática contra *L. monocytogenes*, inicialmente inoculamos *L. monocytogenes* ATCC 7644 em 10 mL de CFS e em 10 mL de MRS (controle) simultaneamente, obtendo assim uma concentração final de  $10^4$  UFC / ml. Os meios foram incubados a 35° C e alíquotas foram coletadas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h. As células viáveis foram enumeradas em ágar *Listeria* seletivo.

#### 2.5 Precipitação e caracterização da bacteriocina

A purificação parcial da bacteriocina foi realizada de acordo com Gutiérrez-Cortés (2018). As cepas foram cultivadas em 1 L de MRS por 18 h a 37 °C, o sobrenadante isento de células (CFS), foi obtido por centrifugação por 15 min a 12000g a 4 °C. As proteínas do CFS foram precipitadas por 80% de saturação com sulfato de amônio a 4 °C (durante a noite), e o precipitado centrifugado por 60 min a 12.000 g a 4 °C.

Os sedimentos foram ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato 25 mM (pH 6,5) e a confirmação da atividade antilisteria do sobrenadante isento de células (CFS) foi avaliada conforme descrito por (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005).

A determinação do peso molecular da bacteriocina foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o CFS neutralizado e precipitado (LAEMMLI, 1970; SCHÄGGER, 2006). A fim de localizar as bandas de proteínas/peptídeos com atividade antibacteriana, uma parte do gel de SDS-PAGE (não corado) foi depositada em uma placa de petri e recoberto com um ágar BHI (1,5%) inoculado com *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (aprox.  $10^5$  UFC / mL). O gel corado foi comparado com a parte do gel inoculado nas placas, para verificar o tamanho da banda com atividade de inibição frente a *Listeria monocytogenes* (CYTRYŃSKA et al., 2001).

## 2.6 Sensibilidade da bacteriocina a diferentes pH e temperaturas

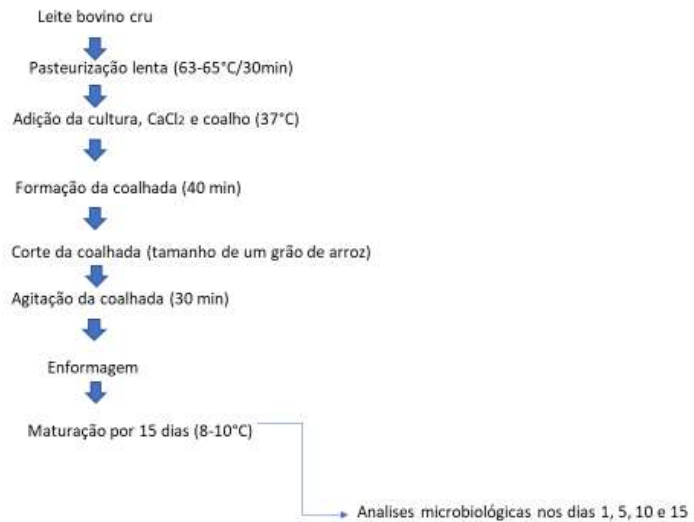
A avaliação da interferência do pH em relação à estabilidade e atividade da bacteriocina foi realizada conforme descrito por Guerreiro et al. (2014), utilizando CFS obtido do *Lactobacillus* spp. submetido a alterações de pH com soluções estéreis de NaOH 0,3 N e HCl 0,3 N para atingir pH de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 6,7, 7,0, 8,0 e 11,0. Após incubação por 1 h nos valores de pH acima mencionados, as amostras foram reajustadas para pH 6,0 e a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* determinada pelo método ágar spot (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005)

O efeito da temperatura na estabilidade da bacteriocina produzida por *Lactobacillus* spp. foi testado por aquecimento do CFS a 55, 80 e 100 °C por 10 min e a 121 °C por 15 min. O CFS foi ainda submetido a congelamento (-20 °C) e sua atividade inibitória verificada após descongelamento por 12 semanas (GUERREIRO et al., 2014). Após cada tratamento, a atividade de inibição contra *L. monocytogenes* foi determinada pelo método ágar spot (HERNÁNDEZ; CARDELL; ZÁRATE, 2005).

## 2.7 Estudo do efeito anti-listeria do *lactobacillus* spp. produtor de bacteriocina em queijo

Todos os queijos foram elaborados segundo o procedimento tradicional descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento conforme demonstrado na figura 1 (BRASIL,1996).

Figura 1. Fluxograma da produção de queijo.



Foram realizados três estudos, onde os queijos foram inoculados com diferentes concentrações de *Listeria monocytogenes* ( $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^2$ ).

Em cada estudo, foi produzido 5 lotes de queijos minas frescal com 5 queijos cada, sendo que os lotes 3, 4 e 5 foram inoculados com *Listeria monocytogenes*. O lote 1, foi fabricado com uma cultura comercial e não houve a inoculação de patógeno neste lote. O lote 2 foi produzido com a cepa a ser testada de *Lactiplantibacillus plantarum* produtor de bacteriocina e também era livre de patógenos. O lote 3 foi produzido com a cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* e inoculado com *Listeria monocytogenes* (O lote 3 foi feito em triplicata). O lote 4 foi produzido com a cultura comercial e inoculado com *Listeria monocytogenes* e o lote 5 não foi inoculado com BAL, foi inoculado apenas com *Listeria monocytogenes*. Os lotes 1 e 2 foram utilizados como controles negativos para listeria. Na sequência os queijos foram maturados durante 15 dias em temperatura de 8 a 12°C e umidade relativa de 85%. E a cada 96 horas foi realizada em duplicata a contagem de BAL (ISO 11290, 1998b) e *Listeria monocytogenes* (ISO 15214, 1998a).

## 2.8 Produção da película comestível com efeito anti-listeria

Para preparar os filmes comestíveis com a bacteriocina produzida pela cepa QS494, foi usada uma solução de bacteriocina (200 mg / ml). Filmes de gelatina a 3% (p / v), 1% de ágar (p / v) e 1% de glicerol (v / v) foram preparados. Primeiro, as soluções de gelatina, ágar e glicerol foram dissolvidas em água destilada e esterilizadas a 115 °C por 15 min. Após resfriamento em banho-maria a 40 °C, foi adicionada a solução de bacteriocina, atingindo as concentrações finais de 50 e 25 mg/mL. A partir daí, 12 ml do fluido foram depositados em placas de Petri; após a solidificação, as amostras foram incubadas a 37 °C por 24 h, após o que os filmes ficaram prontos para uso e tiveram uma espessura final entre 0,15–0,18 mm (RAM et al., 2021).

O efeito antimicrobiano, contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, dos filmes comestíveis foi avaliado pela técnica de difusão em ágar (EMIROĞLU et al., 2010), utilizando pedaços de filmes de 10 × 10 mm. As placas de ágar Brain Heart Infusion (BHI) foram inoculadas com *L. monocytogenes* e os fragmentos de filme comestível foram sobrepostos no ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e a atividade antibacteriana foi quantificada pela medição do halo de inibição ao redor dos filmes comestíveis. Além disso, foram incluídos controles negativos, utilizando filmes comestíveis sem adição da substância antimicrobiana testada (EMIROĞLU et al., 2010)

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 355 cepas de BAL estudadas com efeito anti-*Listeria*, duas cepas (QS494 e QS530), isoladas de queijo Serrano apresentaram efeito quando eliminamos os fatores como presença de peróxido de hidrogênio e ácidos.

Ao investigar a natureza do composto antimicrobiano, quando os CFS foram tratados com proteinase K, foi observada a inativação do efeito anti-*Listeria*, confirmando a origem proteica da substância inibidora, indicando assim que se tratava de uma bacteriocina.

Outros autores encontraram cepas produtoras de bacteriocinas a partir do isolamento em queijos. Sumathi (2009) relatou encontrar 11,11% em queijos e 6,25% em leite. Isso pode ser explicado pela influência do ambiente na produção de bacteriocinas, pois sabe-se que o ambiente age influenciando a produção de bacteriocina para superar cepas competitivas e no queijo a concentração de microorganismos, sobretudo BAL, é muito maior do que no leite (PATTNAIK; GROVER; BATISH, 2005).

As duas cepas bacteriocinogênicas LAB (QS494 e QS530) eram bacilos Gram-positivos e foram identificadas com similaridade > 99% pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactiplantibacillus pentosus*, respectivamente

Como resultado das características tecnológicas, além da produção de bacteriocina, as duas cepas estudadas exibiram atividades proteolíticas e lipolíticas, bem como produção de diacetil. Os resultados indicaram que as duas linhagens apresentam boas características tecnológicas.

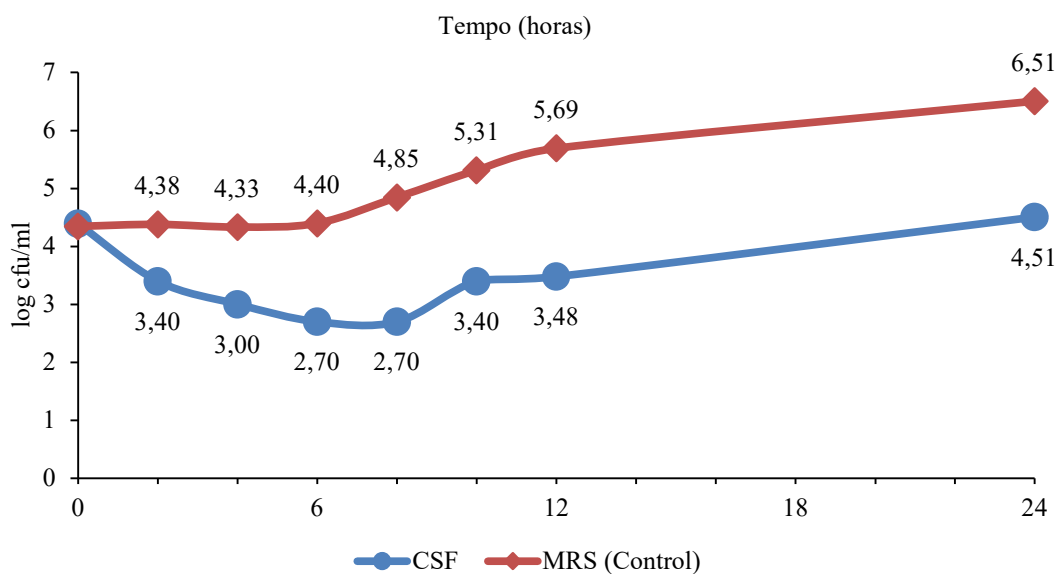
A produção de proteases é uma característica muito importante para o perfil tecnológico das BAL, porque o catabolismo da caseína e peptídeos tem grande influência no desenvolvimento da textura dos queijos, além de produzir compostos aromáticos voláteis que colaboram para o desenvolvimento de sabor e aroma de queijos durante a maturação (EL-GHAISH et al., 2010). Assim como a hidrólise dos triglicerídeos, que também contribuem para o aroma e sabor dos queijos (FADDA et al., 2004). As enzimas lipolíticas juntamente com as glicolíticas e proteolíticas agem na transformação dos nutrientes fundamentais do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (LIMA et al., 2009). Além disso, o diacetil, que é um produto final do metabolismo do citrato, é um componente essencial em muitos produtos lácteos, pois fornece um aroma típico (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010). Quando adicionados no processo de produção de queijos os *Lactobacillus* spp. influenciam os padrões de proteólise, contribuindo para uma maior produção de compostos aromáticos e redução do período de maturação (HONG-XIN; MI-YA; GUANG-YU, 2015).

Os isolados estudados apresentaram resultados negativos, por métodos fenotípicos, para a expressão dos fatores de virulência estudados (gelatinase e hemólise). A gelatinase desempenha um papel importante na patogenicidade pois é uma protease que está envolvida na quebra do colágeno, caseína, hemoglobina e pequenas proteínas bioativas, em particular feromônios sexuais (MORAES et al., 2012). As hemolisinas também possuem papel importante na virulência, pois provocam a lise dos eritrócitos podendo, desta forma, aumentar a severidade da infecção (YOUSIF et al., 2002). Este resultado é importante, porque a ausência destes fatores de virulência é considerada com um bom indicador para selecionar potenciais cepas probióticas.

Como as duas cepas de BAL citadas anteriormente apresentavam características tecnológicas e atividade antimicrobiana semelhantes, a continuidade do estudo se deu com a cepa QS494.

Quando avaliamos se o efeito do CSF da cepa (QS494) *in vitro* contra *Listeria monocytogenes*. Observamos um efeito bactericida nas primeiras 8 h, com uma redução de 1,7 log cfu/ml (Figura 1).

Figura 2. Viabilidade da *Listeria monocytogenes* ATCC 7664 em sobrenadante inoculado com a cepa QS494 e ajustado a pH 6.0 e aquecido a 80 °C durante 10 minutos (SAA) e MRS (controle do crescimento).



Na precipitação da bacteriocina foi obtida uma solução com 200 mg/ml de bacteriocina QS494. Esta solução submetida à uma diluição decimal seriada em solução salina, e o efeito foi testado pelo método spot-on-law. Uma atividade anti-listeria foi observada com até 20 mg/ml.

Com base na análise de géis SDS-PAGE, o efeito antimicrobiano da bacteriocina foi atribuído a uma banda < 10 kDa. Este valor está de acordo com a maioria das bacteriocinas conhecidas e caracterizadas, com massa molecular <10 KDa (CHEN et al., 2014; DU et al., 2017; SONG; ZHU; GU, 2014).

Mudanças no pH do CFS obtido de *Lactiplantibacillus plantarum* não afetou sua atividade antimicrobiana. Além disso sua atividade antimicrobiana permaneceu estável após 10 min a 55, 80 e 100 °C. Nenhuma diminuição na atividade foi relatada após o tratamento por 15 min a 121 °C. E mesmo após submetido a congelamento (-20 °C) sua atividade inibitória foi observada após descongelamento por 12 semanas.

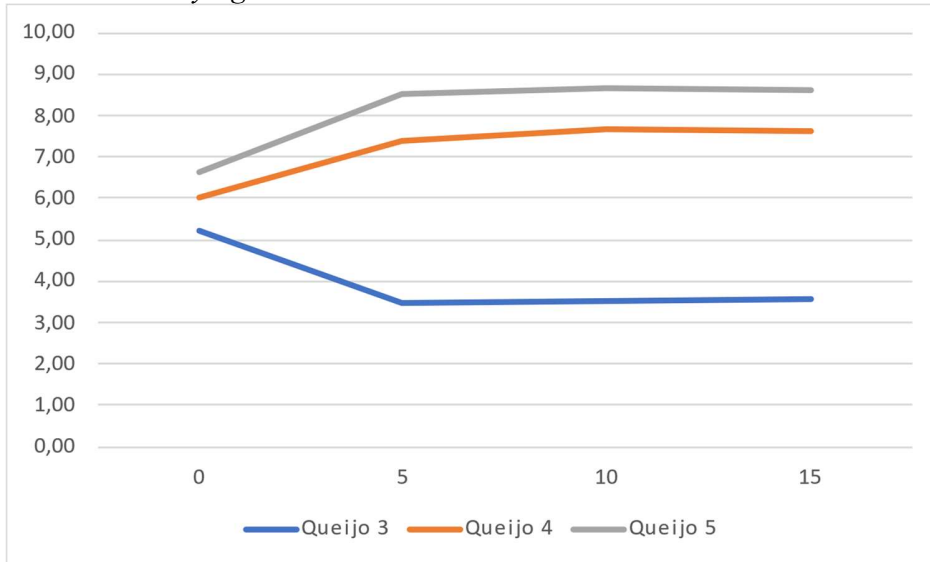
Outros autores relataram resultados semelhantes aos nossos quanto à termo estabilidade da bacteriocinas. WANG et al., (2018) demonstrou que a plantaricina LPL-1 permaneceu estável após o tratamento a 60, 80 e 100 °C por 15 e 30 min. E mesmo após o tratamento a 120 °C por 20 min a atividade inibitória foi observada. Um outro estudo que corrobora com nossos resultados é o de BARBOSA et al., (2016) no qual a atividade da bacteriocina não foi afetada pela temperatura de 4° C a 100 °C, permanecendo ativa mesmo após tratamento a 121 °C por 15 min.

As informações de estabilidade de pH, obtidas em nossas pesquisas sugerem que a bacteriocina produzida por *Lactiplantibacillus plantarum* possui potencial antagonista em alimentos com pH ácido, neutro e alcalino. E a avaliação da estabilidade térmica demonstrou que ela pode ser usada na produção de derivados lácteos pasteurizados e alimentos processados termicamente. Com isso, podemos dizer que a bacteriocina avaliada é um promissor preservativo biológico natural e seguro para os alimentos industriais.

Na avaliação do efeito antilisteria em queijos, observamos que, nos queijos inoculados com a BAL bacteriocinogênica houve uma redução na contagem de *Listeria monocytogenes*, já nos queijos inoculados com a cultura de BAL comercial, houve um aumento na população de *Listeria monocytogenes* ao longo do tempo. (Gráfico 1, Gráfico 2 e Gráfico 3)

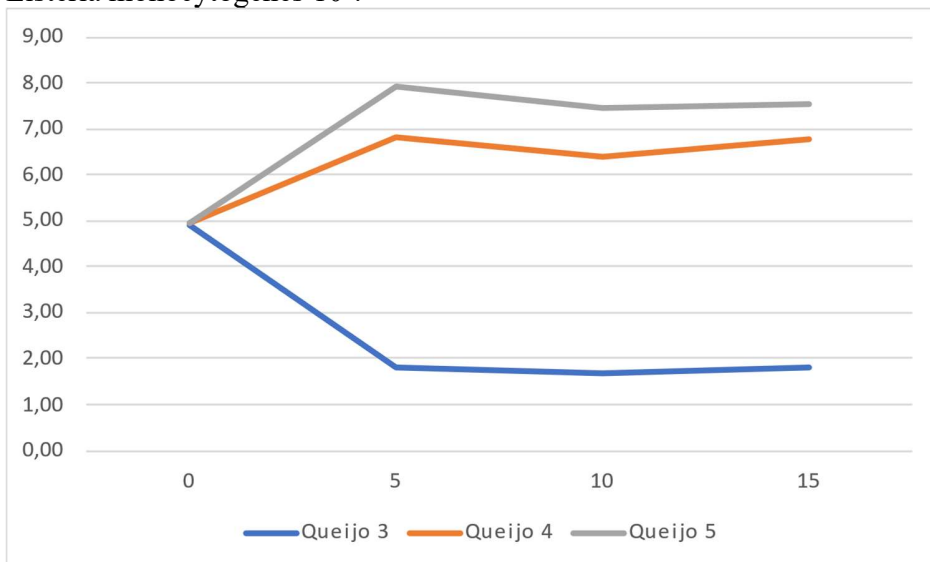
No primeiro estudo, onde inoculamos uma concentração de  $10^6$  de *Listeria monocytogenes*. observamos a redução de 3 log em 120 horas nos queijos produzidos com a BAL bacteriocinogênica, enquanto nos queijos produzidos com a BAL comercial houve um aumento de 1 log, conforme demonstrado no gráfico 1. E, no segundo estudo, onde inoculamos  $10^4$  de *Listeria monocytogenes*, também observamos uma redução de 3 log na contagem de *Listeria monocytogenes*, nos queijos produzidos com a BAL bacteriocinogênica (Gráfico 2). Por fim, no terceiro estudo, quando inoculamos  $10^2$  de *Listeria monocytogenes*, tivemos uma redução na contagem de *Listeria monocytogenes*, chegando a não detectá-la nas contagens (Gráfico 3).

Gráfico 1. Contagens de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes* de  $10^6$ .



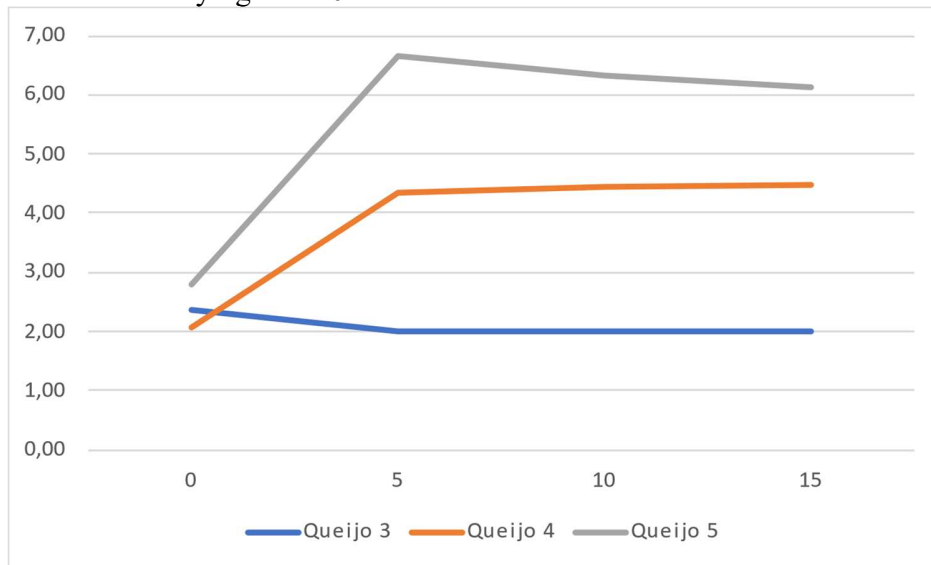
Queijos 3.1, 3.2 e 3.3 (produzidos com a cepa de BAL bacteriocinogênica e inoculados com *Listeria monocytogenes*), Queijo 4 (produzido com a cepa comercial e inoculados com *Listeria monocytogenes*) e Queijo 5 produzido sem a adição de BAL e inoculado com *Listeria monocytogenes*.

Gráfico 2. Contagens de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes*  $10^4$ .



Queijos 3.1, 3.2 e 3.3 (produzidos com a cepa de BAL bacteriocinogênica e inoculados com *Listeria monocytogenes*), Queijo 4 (produzido com a cepa comercial e inoculados com *Listeria monocytogenes*) e Queijo 5 produzido sem a adição de BAL e inoculado com *Listeria monocytogenes*.

Gráfico 3. Contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos inoculados com uma concentração de *Listeria monocytogenes*  $10^2$ .



Queijos 3.1, 3.2 e 3.3 (produzidos com a cepa de BAL bacteriocinogênica e inoculados com *Listeria monocytogenes*), Queijo 4 (produzido com a cepa comercial e inoculados com *Listeria monocytogenes*) e Queijo 5 produzido sem a adição de BAL e inoculado com *Listeria monocytogenes*.

Considerando que a *Listeria monocytogenes*, representa um problema de contaminação em alimentos, e que podem sobreviver em queijos durante a fabricação, maturação e armazenamento sob refrigeração, representando um grande desafio para produtores e consumidores (MORGAN et al., 2001), os resultados deste estudo, indicam que a BAL bacteriocinogênica, poderia contribuir para a segurança microbiológica de queijos, através do controle do crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Na avaliação da atividade antagonista da película, contendo diferentes concentrações de bacteriocina, 50 e 25 mg/ml, frente a *Listeria monocytogenes*, observou-se halos de 19 mm e 14 mm, respectivamente. Sistemas de embalagem contendo bacteriocina são eficazes na inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (BALCIUNAS et al., 2013). Sendo assim o uso de películas comestíveis contendo substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, é uma alternativa para a conservação de alimentos, satisfazendo a crescente demanda do consumidor por alimentos frescos, minimamente processados e livres de conservantes químicos (VALDÉS et al., 2017).

#### 4 CONCLUSÃO

Embora, apenas duas cepas tenham sido produtoras de bacteriocina, essas cepas, classificadas como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*, apresentaram ótimas características tecnológicas e sem a presença de característica fenotípica de virulência (hemólise e produção de gelatinase). Assim, são duas cepas com potencial tecnológico e de biossegurança para utilização na indústria alimentícia, sobretudo na elaboração de derivados lácteos, e principalmente em queijos. Além disso, a cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* bacteriocinogênica demonstrou ser eficaz no controle de *Listeria monocytogenes* em queijos. E a bacteriocina por ela produzida apresentou ótimos resultados de termoestabilidade e estabilidade às variações de pH, o que sugere que pode ser utilizada como uma alternativa aos conservantes em produtos alimentícios com diferentes pH e processados termicamente.

Outro ponto importante, é a incorporação da bacteriocina em películas comestíveis, que demonstrou ser eficaz no controle de *Listeria monocytogenes* nos testes *in vitro*. Essa tecnologia é uma alternativa simples, de baixo custo, natural e biodegradável. Atende os interesses dos consumidores, que hoje buscam cada vez mais alimentos naturais e minimamente processados. São desejáveis testes em larga escala utilizando a cepa testada como componente de um fermento industrial e também da película em queijos produzidos no ambiente industrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIARI, V. A. et al. Tracing sources of *Listeria* contamination in traditional Italian cheese associated with a US outbreak: Investigations in Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 13, p. 2719–2727, 2016.

AMADEU, J.; LAVORATO, A. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LATICÍNIOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS Evaluation of the microbiological quality of Minas Cheese produced by dairies in the state of Minas Gerais. p. 433–442, 2014.

ARCHIMBAUD, C. et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 75–80, 2002.

ASTERI, I. A. et al. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses - A pool of novel species and starters. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 595–604, 2009.

AUTHORS, A.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão : Aspectos gerais das bacteriocinas Review : General aspects of bacteriocins. p. 267–276, 2016.

ÁVILA, M. et al. Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 10, p. 3343–3349, 2020.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.

BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 5, p. 816–819, 2011.

BARBOSA, M. S. et al. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. **Food Control**, v. 60, p. 103–112, 2016.

BISCOLA, V. et al. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 564–574, 2018.

BURNSIDE, K. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

CÁRDENAS, N. et al. Evaluation of technological properties of *Enterococcus faecium* CECT 8849,

- a strain isolated from human milk, for the dairy industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7665–7677, 2016.
- CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2526–2535, abr. 2017.
- CHEN, Y. S. et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 3, p. 193–199, 2014.
- CYTRYŃSKA, M. et al. Detection of antibacterial polypeptide activity in situ after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 274–276, 2001.
- 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 in Applied Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 343–346, 1997.
- DE CASTRO, V. et al. Listeriosis outbreak caused by Latin-style fresh cheese, Bizkaia, Spain, August 2012. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 42, p. 3–5, 2012.
- DIOP, M. B. et al. Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, v. 11, n. 4, p. 275–281, 2007.
- DU, L. et al. Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. **Food Microbiology**, v. 68, p. 97–103, 2017.
- EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 283–288, out. 2010.
- FADDA, M. E. et al. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 2004.
- FERNANDES, P. et al. *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 433–442, 2017.
- FOX, P. F. et al. **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017.
- FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3–11, 2009.
- GAMAL, E. et al. Classificação Bal revisão.pdf. **Research Journal of Applied Sciences**, v. 13, n. 12, p. 742–757, 2018.

- GHARSALLAOUI, A. et al. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1262–1274, 2016.
- GUERREIRO, J. et al. Lactobacillus pentosus B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 2, p. 95–104, 2014.
- GUITIÁN, M. V. et al. Anti-Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 92–98, 2019.
- GUTIÉRREZ-CORTÉS, C. et al. Characterization of bacteriocins produced by strains of Pediococcus pentosaceus isolated from Minas cheese. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 383–398, 2018.
- HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162–7168, 2007.
- HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723–736, 2012.
- HASSAN, M. et al. Antimicrobial effect of nisin on Bacillus cereus isolated from some meat products. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 37, n. 1, p. 77–80, 2019.
- HEIMAN, K. E. et al. HHS Public Access. v. 144, n. 13, p. 2698–2708, 2019.
- HERNÁNDEZ, D.; CARDELL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: Initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by Lactobacillus plantarum TF711. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 77–84, 2005.
- HONG-XIN, J.; MI-YA, S.; GUANG-YU, G. Influence of Lactobacillus casei LC2W on the proteolysis and aroma compounds of Cheddar cheese during ripening period. **CYTA - Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 464–471, 2015.
- HURST, A.; INTRODUCTION, I. **A. hurst**. [s.l: s.n.]. v. 27
- IBARGUREN, C. et al. Anti- Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. v. 97, p. 92–98, 2019.
- JACKSON, K. A. et al. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–2014. v. 24, n. 6, p. 1116–1118, 2018.

KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: Natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 1–12, 2016a.

KAPETANAKOU, A. E.; SKANDAMIS, P. N. Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 12, p. 1–12, dez. 2016b.

KAYA, H. I.; SIMSEK, O. Characterization of pathogen-specific bacteriocins from lactic acid bacteria and their application within cocktail against pathogens in milk. **Lwt**, v. 115, n. June, p. 108464, 2019.

KHARKWAL, H. Antimicrobial food packaging : potential and pitfalls. v. 6, n. June, p. 1–9, 2015.

KIELISZEK, M. et al. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. **Molecules**, v. 26, n. 7, 2021.

LAEMMLI, U. K. 227680a0. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

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

LIMA, C. D. L. C. et al. Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 266–272, 2009.

MAGALHÃES, R. et al. Cheese-related Listeriosis Outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012. n. March 2009, p. 1–6, 2015.

MAKINO, S. et al. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan , during 2001. v. 104, p. 189–196, 2005.

MARTINEZ-RIOS, V.; DALGAARD, P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, v. 84, p. 205–214, 2018.

MOLIMARD, P.; SPINLER, H. E. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 2, p. 169–184, 1996.

MORAES, P. M. et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 318–328, 2012.

- MORGAN, F. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1–2, p. 217–221, 2001.
- MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: [s.l: s.n.], 2010.
- OMAR, K. A. et al. Effects of microbial lipases on hydrolyzed milk fat at different time intervals in flavour development and oxidative stability. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 1035–1046, 2016.
- OSBORNE, C. A. et al. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 2, p. 183–187, 2005.
- PATTNAIK, P.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Effect of environmental factors on production of lichenin, a chromosomally encoded bacteriocin-like compound produced by *Bacillus licheniformis* 26L-10/3RA. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 213–218, 2005.
- PINTO, M. S. et al. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 90–96, 2011.
- PORTO, E. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas Study of Minas cheese shelf life. v. 2008, n. 002663, p. 262–269, 2009.
- PRITCHARD, S. R.; PHILLIPS, M.; KAILASAPATHY, K. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1545–1548, 2010.
- QIAN, M.; NELSON, C.; BLOOMER, S. Evaluation of fat-derived aroma compounds in blue cheese by dynamic headspace GC/olfactometry-MS. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 7, p. 663–667, 2002.
- QIAN, M.; REINECCIUS, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1362–1369, 2002.
- RAM, C. et al. Development of Active Packaging Based on Agar-Agar Incorporated with Bacteriocin of *Lactobacillus sakei*. p. 1–9, 2021.
- RIBEIRO, S. C. et al. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 573–585, 2014.
- RIOS, E. A. et al. Quality of goat 's milk produced on farms in the Paraná State - Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 6, p. 2425–2436, 2018.

ROSCA, I. et al. An original method for producing acetaldehyde and diacetyl by yeast fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 949–954, 2016.

RYSER, E. T. Antimicrobial Edible Films and Coatings. v. 67, n. 4, p. 833–848, 2004.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 93–106, 1998.

SCHÄGGER, H. Protocol: Tricine-SDS-PAGE. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SCHVARTZMAN, M. S. et al. Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. SUPPL. 1, p. S31–S38, 2011.

SEIXAS, F. N. et al. Selection of *Leuconostoc* strains isolated from artisanal Serrano Catarinense cheese for use as adjuncts in cheese manufacture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 10, p. 3899–3906, 2018.

SILVA, F. T. **Queijo Mussarela Queijo Mussarela**. [s.l.: s.n.].

SOLTANI, S. et al. Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, p. 1–24, 2021.

SONG, D. F.; ZHU, M. Y.; GU, Q. Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2014.

SUMATHI, V.; REETHA, D. Isolation and screening of bacteriocin producing lactic acid bacteria from milk and milk products. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 11, p. 21–23, 2009.

TERZIC-VIDOJEVIC, A. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheeses produced at two different geographical location. **Genetika**, v. 41, n. 1, p. 117–136, 2009.

TERZIC-VIDOJEVIC, A. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheeses produced at two different geographical location. *Genetika*, v. 41, n. 1, p. 117–136, 2009.

TURCK, D. et al. **Guidance on the preparation and presentation of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283** *EFSA Journal*, 2016.

UNION, E. **Guidance on Cheese As Raw Material**, 2018. Disponível em:  
<[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety\\_fh\\_guidance\\_cheese\\_raw\\_material\\_manufacture\\_products\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_guidance_cheese_raw_material_manufacture_products_en.pdf)>

VALDÉS, A. et al. State of the Art of Antimicrobial Edible Coatings for Food Packaging Applications. **Coatings**, v. 7, n. 4, p. 56, 19 abr. 2017.

VERA PINGITORE, E. et al. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and

*Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38–47, 2012.

WANG, H. et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus acidophilus* surface-layer protein in combination with nisin against *Staphylococcus aureus*. **Lwt**, v. 124, n. September 2019, p. 109208, 2020.

WANG, Y. et al. Purification and Characterization of Plantaricin LPL-1, a Novel Class IIa Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 Isolated From Fermented Fish. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–12, 2018.

WELLER, D. et al. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 286–292, 2015.

WESSELS, S. et al. The lactic acid bacteria , the food chain , and their regulation. v. 15, p. 498–505, 2004.

WORSZTYNOWICZ, P. et al. Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 66, n. 1, p. 61–69, 2019.

YILDIRIM, Z. et al. Enterocin HZ produced by a wild *Enterococcus faecium* strain isolated from a traditional, starter-free pickled cheese . **Journal of Dairy Research**, v. 81, n. 2, p. 164–172, 2014.

YOUSIF, N. M. K. et al. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Enterococci* Isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385–4389, 2002.

ZHAO, X. et al. Antimicrobial kinetics of nisin and grape seed extract against inoculated *Listeria monocytogenes* on cooked shrimps: Survival and residual effects. **Food Control**, v. 115, n. February, p. 107278, 2020.