



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Departamento de Ciências Agrárias**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO  
ÁCIDO LÁCTICO PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS E  
SUA APLICAÇÃO NO FABRICO DE QUEIJO FRESCO**

**Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar**

Márcia Costa Coelho

**Orientadora:** Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

**ANGRA DO HEROÍSMO**

**2013**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos aqueles que, de algum modo contribuíram para a realização desta dissertação, nomeadamente:

À minha orientadora Doutora Célia Silva pela orientação, amizade, paciência, disponibilidade, ensinamentos e dedicação prestada ao longo deste trabalho.

À Doutora Maria de Lurdes Dapkevicius pela disponibilidade, amizade e ajuda.

Ao Doutor Henrique Rosa pela disponibilidade e ajuda no tratamento estatístico dos dados.

À Marina Lopes por ter feito a identificação genética das bactérias e pelo companheirismo.

Ao Senhor Paulo Caetano pela sua disponibilidade de entregar o leite para o fabrico do queijo fresco.

À empresa Chegalvorada (Granja Universitária) pela cedência do leite usado no trabalho.

Às minhas colegas de trabalho Susana Ribeiro, Sandra Câmara e Cristina Riquelme, pelo companheirismo e ajuda.

Às técnicas de laboratório, Berta Borges e Guida Pires, pelo companheirismo, disponibilidade e ajuda.

Aos meus pais e ao meu irmão, por todo o amor, paciência, apoio e incentivo demonstrado ao longo do mestrado.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projecto PTDC/AGR-ALI/104385/2008.

## RESUMO

Actualmente, tem merecido especial atenção a aplicação de compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias do ácido láctico (BAL) como conservantes naturais, impedindo o crescimento de patógenos nos alimentos.

O presente trabalho teve como objectivo a selecção de estirpes BAL previamente isoladas do queijo do Pico (DOP), avaliando a actividade antimicrobiana e a sua eficácia contra a *Listeria monocytogenes* no queijo fresco. As propriedades tecnológicas e segurança das BAL produtoras de bacteriocinas foram igualmente investigadas para avaliar a capacidade para serem utilizadas como culturas de arranque e/ou adjuntas no fabrico do queijo. Os isolados foram caracterizados pelas suas propriedades tecnológicas: produção de diacetilo, actividades enzimáticas, proteólise e lipólise. A sua segurança foi avaliada através do estudo da actividade  $\beta$ -hemolítica, produção de DNase, gelatinase e histamina, e resistência aos antibióticos. Foi testada a produção de bacteriocinas pelas BAL, bem como a cinética de crescimento, pH e produção de ácido láctico no queijo fresco. Nestes queijos inoculados com as BAL produtoras de bacteriocinas, foi ainda realizada uma avaliação sensorial por um painel de provadores não treinados.

As propriedades antimicrobianas de 116 isolados BAL do queijo do Pico foram avaliadas. Oito isolados apresentaram actividade contra a *Listeria monocytogenes*, exibindo valores de concentração mínima inibitória que variaram entre 200 e 3200 UA ml<sup>-1</sup>. Destes isolados, três apresentaram igualmente actividade contra o *Clostridium perfringens*. Os oito isolados produtores de bacteriocinas foram identificados por sequenciação do gene 16S rRNA como *Lactococcus lactis* (1 isolado) e *Enterococcus faecalis* (7 isolados).

Alguns isolados apresentaram actividades enzimáticas promissoras para a formação do aroma no queijo. Apenas um isolado foi capaz de degradar a caseína, testando positivo para a actividade proteolítica e dois isolados demonstraram actividade lipolítica. No entanto, a maioria dos isolados produziu diacetilo a partir do citrato. Nenhum dos isolados produziu histamina ou apresentou actividade  $\beta$ -hemolítica e de DNase, mas alguns isolados testaram positivo para a produção de gelatinase. Não foi também encontrada resistência a antibióticos clinicamente importantes.

No geral, os isolados produtores de bacteriocinas apresentaram um crescimento moderado no queijo fresco a temperaturas de refrigeração (4 °C), aumentando uma

unidade log em 3 dias. Apresentaram baixa capacidade acidificante, apesar do aumento da produção de ácido láctico exibido por alguns isolados após 24 h. A actividade das bacteriocinas foi apenas detectada no soro do queijo fresco inoculado com dois isolados de *Enterococcus* (L2B21K3 e L3A21K6). Contudo, todos os queijos inoculados com os isolados produtores de bacteriocinas inibiram a *L. monocytogenes* no ensaio de difusão em agar. Com excepção de um isolado (L3A21M3), não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na avaliação global dos queijos frescos inoculados com os isolados produtores de bacteriocinas, realizada por um painel não treinado de 50-52 provadores. Na apreciação global, os queijos inoculados com os isolados produtores de bacteriocinas obtiveram uma classificação de intermédio a elevado, semelhante ao queijo fresco sem BAL. Observou-se ainda uma correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre a apreciação global e a firmeza dos queijos.

Para testar o efeito *in situ* da produção de bacteriocinas contra a *L. monocytogenes*, foram elaborados queijos frescos com leite de vaca pasteurizado, inoculados com BAL produtoras de bacteriocinas e contaminados com aproximadamente  $10^6$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  de *L. monocytogenes*. As contagens de *L. monocytogenes* foram monitorizadas durante o armazenamento do queijo fresco a temperaturas de refrigeração (4 °C) durante 15 dias. Todos os isolados controlaram o crescimento da *L. monocytogenes*, apesar de alguns *Enterococcus* terem sido mais eficazes na redução das contagens do patógeno. A redução foi de aproximadamente de 4 unidades log em comparação com o controlo positivo, após 7 dias de incubação. Pelo contrário, no queijo sem BAL observou-se um aumento da listéria em 4 log ufc  $\text{g}^{-1}$ . Duas combinações de isolados *Enterococcus* (L3A21M3 e L3A21M8, ou L3B1K3 e L3A21M3) apresentaram a maior redução nas contagens de *L. monocytogenes* no queijo fresco, reduzindo aproximadamente 5 unidades log em 7 dias. A combinação de dois isolados em particular (L3B1K3 e L3A21M3) poderá ter aplicação prática devido à ausência de factores de virulência.

Em conclusão, a aplicação dos isolados produtores de bacteriocinas na produção de queijo fresco pode contribuir para prevenir o crescimento de bactérias patogénicas indesejáveis como a *L. monocytogenes*. Alguns isolados apresentaram um excelente potencial para serem utilizados como culturas adjuntas/protectoras no fabrico do queijo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias do ácido láctico, bacteriocinas, caracterização tecnológica, critérios de segurança, queijo fresco, *Listeria monocytogenes*.

## ABSTRACT

In recent years, there has been a particular focus on the application of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria (LAB) as natural preservatives to control the growth of spoilage and pathogenic bacteria in foods.

The purpose of this study was to select LAB strains with antimicrobial activity, previously isolated from Pico cheese, and evaluate their efficacy against *Listeria monocytogenes* in fresh cheese. In addition, the technological and safety relevant properties from bacteriocin-producing LAB were investigated in order to determine their ability for the efficient use as starter/adjunct cultures in cheese making. Isolates were characterised in terms of their main technological properties: diacetyl production, enzymatic activities, proteolysis and lipolysis. Their safety was also evaluated by studying their  $\beta$ -haemolytic activity, production of DNase, gelatinase and histamine, and antibiotic resistance. Bacteriocin production by LAB was tested in fresh cheese, including LAB growth kinetics, cheese pH and titratable acidity. Additionally, the sensorial attributes of fresh cheeses made with these LAB as adjunct cultures were evaluated by a non-trained panel.

A total of 116 LAB isolates from an artisanal cheese (Pico cheese) were screened for antimicrobial properties. Eight isolates were found to produce bacteriocins against *Listeria monocytogenes* with minimum inhibitory units ranging from 200 to 3200 AU ml<sup>-1</sup>. Three of the isolates were also active against *Clostridium perfringens*. The bacteriocin-producing isolates were identified by 16S rRNA sequencing analysis as *Lactococcus lactis* (1 isolate) and *Enterococcus faecalis* (7 isolates).

Some of the studied isolates displayed enzymatic activities with potential impact on cheese flavour. Only one isolate was able to degrade casein, being positive for proteolytic activity and two isolates showed lipolytic activity. Most of the isolates were found to produce diacetyl from citrate. None of the isolates tested was found to produce histamine or to possess  $\beta$ -haemolytic and DNase activity, but some of the isolates were positive for gelatinase production. No resistance to clinically relevant antibiotics was also encountered.

In general, the bacteriocin-producing isolates presented a moderate growth in fresh cheese at refrigeration temperatures (4 °C), increasing one log count in 3 days. They presented slow acidifier capacity, despite the increasing production of lactic acid displayed by some isolates after 24 h. Bacteriocin activity was only detected in the

whey of fresh cheese inoculated with two *Enterococcus* isolates (L2B21K3 and L3A21K6), but all cheeses made with bacteriocin-producing isolates inhibited *L. monocytogenes* in the agar diffusion bioassay. No significant differences ( $P > 0,05$ ) were found on sensory overall evaluation made by a non-trained panel of 50-52 tasters using the isolates as adjunct culture in fresh cheese, with the exception of one isolate (L3A21M3). Cheeses inoculated with bacteriocin-producing isolates were attributed an overall appreciation of average to high, similar to the fresh cheese without any LAB. A positive correlation ( $P < 0,05$ ) was also observed between overall appreciation and cheese firmness.

To test the effect of *in situ* bacteriocin production against *L. monocytogenes*, fresh cheese was made from pasteurised cow's milk inoculated with bacteriocin-producing BAL and artificially contaminated with approximately  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup> of *L. monocytogenes*. Numbers of *L. monocytogenes* were monitored during storage of fresh cheese at refrigeration temperature (4 °C) for up to 15 days. All isolates controlled the growth of *L. monocytogenes*, although some *Enterococcus* were more effective in reducing the pathogen counts. The reduction was of approximately 4 log units compared to the positive control after 7 days of incubation. In comparison, an increase of 4 log cfu g<sup>-1</sup> in pathogen numbers was detected at the same time point in the absence of bacteriocin-producing LAB. The combination of bacteriocin producing *Enterococcus* sp. L3A21M3 and L3A21M8, or L3B1K3 and L3A21M3, optimized the reduction of *L. monocytogenes* counts in fresh cheese, reducing in approximately 5 log units after 7 days. The combination of two isolates in particular (L3B1K3 and L3A21M3) showed promising results due to the absence of important virulence factors.

In conclusion, the present work demonstrates that using bacteriocin-producing isolates in the manufacture of fresh cheese might contribute to prevent the growth of undesirable pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes*. Some isolates presented excellent potential to be used as adjunct/protective cultures for cheese making.

**KEYWORDS:** Lactic acid bacteria, bacteriocins, technological characterization, safety criteria, fresh cheese, *Listeria monocytogenes*.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
2.1 O queijo	4
2.1.1 Perspectivas históricas	4
2.1.2 Queijo produzido em Portugal	4
2.1.2.1 Queijos Denominação de Origem Protegida (DOP)	5
2.1.3 Queijos DOP Açorianos	6
2.1.3.1 Queijo do Pico artesanal	6
2.1.3.2 Queijo de São Jorge	6
2.1.4 O queijo fresco	7
2.2 Microrganismos do queijo	8
2.2.1 Culturas de arranque	8
2.2.2 Culturas adjuntas	9
2.2.2.1 Culturas adjuntas de bactérias do ácido láctico	10
2.2.2.2 Bolores e leveduras	11
2.3 Caracterização das bactérias do ácido láctico	11
2.3.1 Classificação das BAL	14
2.3.2 Principais BAL presentes no queijo do Pico	16
2.3.2.1 Género <i>Lactococcus</i>	16
2.3.2.2 Género <i>Lactobacillus</i>	17
2.3.2.3 Género <i>Enterococcus</i>	17
2.3.2.4 Género <i>Streptococcus</i>	18
2.3.2.5 Género <i>Leuconostoc</i>	19
2.4 Bacteriocinas	20
2.4.1 Classificação das bacteriocinas das bactérias Gram-Positivas	20
2.4.1.1 Classe I ou Lantibióticos	21
2.4.1.2 Classe II	23
2.4.1.3 Classe III	24
2.4.1.4 Classe IV	24
2.4.2 Mecanismos de acção das bacteriocinas	25
2.4.3 Auto-imunidade	28
2.4.4 Factores que afectam a eficiência das bacteriocinas	28

2.4.5 Aplicações das bacteriocinas na indústria alimentar	29
2.4.6 Aplicações das bacteriocinas nos lacticínios	31
2.4.6.1 Nisina	31
2.4.6.2 Lacticina 3147	32
2.4.6.3 Pediocina PA-1	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1 Isolados em estudo	34
3.2 <i>Screening</i> das BAL produtoras de bacteriocinas	34
3.2.1 Actividade antimicrobiana	34
3.2.2 Concentração mínima inibitória	35
3.3 Identificação das BAL produtoras de bacteriocinas	35
3.3.1 Identificação fenotípica	35
3.3.2 Identificação genética	36
3.4 Caracterização tecnológica das BAL produtoras de bacteriocinas	36
3.4.1 Actividades enzimáticas	36
3.4.2 Produção de diacetilo a partir do citrato	38
3.4.3 Actividade proteolítica	38
3.4.4 Actividade lipolítica	38
3.5 Avaliação da segurança	39
3.5.1 Produção de histamina	39
3.5.2 Actividade hemolítica	39
3.5.3 DNase	40
3.5.4 Gelatinase	40
3.5.5 Resistência a antibióticos	40
3.6 Avaliação da produção de bacteriocinas em queijo fresco	43
3.6.1 Elaboração do queijo fresco com as BAL	43
3.6.2 Determinação do pH do queijo	43
3.6.3 Acidez titulável	43
3.6.4 Determinação da humidade	44
3.6.5 Contagens das BAL no queijo	44
3.6.6 Determinação da actividade antimicrobiana no queijo	44
3.6.7 Provas organolépticas	45
3.7 Avaliação do efeito das BAL no crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em queijo fresco	45
3.7.1 Elaboração do queijo fresco com BAL e <i>L. monocytogenes</i>	45
3.7.2 Avaliação do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> no queijo fresco	46
3.8 Análise estatística	46

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
4.1 Actividade antimicrobiana	47
4.2 Identificação das BAL produtoras de bacteriocinas	49
4.3 Caracterização tecnológica das BAL produtoras de bacteriocinas	51
4.3.1 Actividades enzimáticas	51
4.3.2 Propriedades tecnológicas	53
4.4 Avaliação da segurança das BAL	55
4.4.1 Histamina, Hemólise, DNase e Gelatinase	55
4.4.2 Resistência a antibióticos	57
4.5 Aplicação das BAL como culturas de arranque/adjuntas no queijo fresco	59
4.5.1 Avaliação de parâmetros químicos, crescimento e actividade antimicrobiana	59
4.5.2 Avaliação organoléptica	66
4.6 Efeito das BAL no crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo fresco	69
4.6.1 Adição individual dos isolados	69
4.6.2 Efeito de culturas mistas	72
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>76</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Actualmente, os consumidores estão cada vez mais atentos ao risco que constitui a presença de microrganismos patogénicos e aditivos químicos nos alimentos, o que conduz à pesquisa de conservantes naturais e eficazes para controlo microbiológico. A descoberta que certos péptidos bacterianos possuem actividade inibitória contra outras bactérias, fez despertar o interesse na descoberta e aplicação destes péptidos como conservantes naturais. Estes péptidos designados por bacteriocinas, podem exibir um espectro de actividade contra as espécies homólogas ou apresentar um amplo espectro de acção contra uma variedade de microrganismos Gram-positivos e em particular, contra certos patógenos. Alimentos tradicionais, como o queijo do Pico (DOP) produzido com leite cru, possuem uma microflora própria que poderá ser explorada na pesquisa de novas estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) produtoras de bacteriocinas, e que podem apresentar elevada actividade contra bactérias indesejáveis como a *Listeria monocytogenes*.

A *Listeria monocytogenes* apresenta-se como um dos patógenos com maior impacto na indústria dos lacticínios e o seu controlo é muito importante, em particular, nos queijos produzidos com leite cru (Wan *et al.*, 1997; Gandhi e Chikindas, 2007). Este microrganismo psicrotrófico está largamente distribuído no ambiente, é capaz de crescer a temperaturas que variam desde 1 a 45 °C, em valores de pH relativamente baixos e é altamente tolerante ao sal, o que torna difícil o seu controlo nos alimentos (Bizani *et al.*, 2008; Sip *et al.*, 2012). A *L. monocytogenes* provoca assim uma grave infecção alimentar que afecta essencialmente as mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e adultos com o sistema imunitário comprometido (Gandhi e Chikindas, 2007). Leite e queijos são considerados os alimentos de maior risco, embora possam ocorrer surtos com outros tipos de alimentos como as saladas e vegetais prontos para o consumo (Bello *et al.*, 2012). O controlo ou mesmo a eliminação deste patógeno utilizando meios naturais em substituição dos conservantes químicos, constitui uma tendência actual imposta pelas preferências dos consumidores. Dessa forma, a aplicação de BAL produtoras de bacteriocinas na indústria alimentar, nomeadamente no controlo da *L. monocytogenes* no queijo, pode constituir uma vantagem a ser explorada pela indústria de lacticínios.

Desta forma, o presente trabalho teve como objectivo pesquisar a presença de bactérias produtoras de bacteriocinas em BAL isoladas no queijo do Pico e avaliar a eficácia destas BAL produtoras de bacteriocinas no controlo da *L. monocytogenes* em queijo fresco. Foi ainda objectivo do trabalho o estudo das características tecnológicas e de segurança destas BAL, de modo a avaliar a sua aplicação potencial como culturas de arranque e/ou adjuntas no fabrico de queijo. Finalmente pretendeu-se avaliar também o efeito destas BAL na qualidade organoléptica do queijo fresco, realizando-se uma prova com um painel de avaliadores não treinado.

A estrutura global da tese divide-se em 5 capítulos. No primeiro capítulo - Introdução, é feito um enquadramento do estudo, apresentação dos objectivos e explicação da estrutura da tese.

O segundo capítulo é constituído pela Revisão Bibliográfica, onde é feita uma discussão actual da temática escolhida, com apresentação de bibliografia relacionada com o estudo. É feita uma abordagem ao queijo produzido em Portugal e aos microrganismos que funcionam como culturas de arranque e/ou adjuntas. As BAL são caracterizadas, dando-se especial destaque à produção e actuação das bacteriocinas. Finalmente é descrita a aplicação das bacteriocinas na indústria alimentar, com especial destaque nos lacticínios.

O terceiro capítulo é constituído pelos Materiais e Métodos, onde são descritas as metodologias aplicadas ao longo do trabalho experimental, nomeadamente para o *screening* das BAL produtoras de bacteriocinas, sua identificação, caracterização tecnológica e avaliação da segurança; avaliação da produção de bacteriocinas em queijo fresco e avaliação do efeito destas BAL no crescimento de *L. monocytogenes* nos mesmos queijos. Apresentam-se ainda as ferramentas estatísticas utilizadas no tratamento de dados.

Os Resultados e Discussão são apresentados no quarto capítulo. Aqui são apresentados os resultados obtidos na aplicação das metodologias, fazendo-se a sua análise e discussão para cada um dos parâmetros estudados, face a outros estudos publicados no âmbito deste tema.

No quinto capítulo - Conclusão, são expostas as conclusões gerais do trabalho e apresentadas sugestões para futuros estudos, envolvendo a aplicação das bacteriocinas na melhoria da qualidade dos produtos lácteos regionais.