

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE ZOOTECNIA

DANIELI QUADROS DA SILVA

**ESTUDO DO CULTIVO ASSOCIADO DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES*
LB10.4 E *LACTOCOCCUS LACTIS* L4A8: PROSPECÇÃO E APLICAÇÃO EM
PRODUTOS LÁCTEOS**

PORTO ALEGRE

2021

DANIELI QUADROS DA SILVA

**ESTUDO DO CULTIVO ASSOCIADO DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES*
LB10.4 E *LACTOCOCCUS LACTIS* L4A8: PROSPECÇÃO E APLICAÇÃO EM
PRODUTOS LÁCTEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção
do Grau de Zootecnista, Faculdade de
Agronomia, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientador (a): Amanda de Souza da Motta

Coorientador (a): Andréia Monique Lermen

Porto Alegre

2021

DANIELI QUADROS DA SILVA

**ESTUDO DO CULTIVO ASSOCIADO DE *LEUCONOSTOC MESENEROIDES*
LB10.4 E *LACTOCOCCUS LACTIS* L4A8: PROSPECÇÃO E APLICAÇÃO EM
PRODUTOS LÁCTEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do
Grau de Zootecnista, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.

Data de aprovação: ____ / ____ / ____.

Amanda de Souza da Motta, Prof. Dra. - UFRGS

Orientadora

Andréia Monique Lermen, Doutoranda em Microbiologia Agrícola e do Ambiente –
UFRGS

Coorientadora

Elisa Cristina Modesto, Prof. Dra. – UFRRJ

Membro da Banca

Marcia Monks Jantzen, Prof. Dra. – UFRGS

Membro da Banca

RESUMO

O crescente interesse por alimentos funcionais compeliu a indústria a procurar novas linhagens de bactérias com potencial funcional. Neste contexto, o leite de búfala pode ser utilizado para o isolamento de cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) com eventual potencial probiótico ou tecnológico. O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados do leite de búfala e identificar aplicações na indústria de alimentos. Para atingir este objetivo, foram avaliados testes de atividade antimicrobiana, influência das bacteriocinas e avaliação da eficiência das BAL individualmente e associadas frente a espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 aplicadas em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e em matriz láctea. Na avaliação da atividade antimicrobiana, das quatorze bactérias empregadas no estudo, não foram observados presença de halos de inibição causados por *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 frente a todas as bactérias Gram-negativas. Em relação às bactérias Gram positivas, os resultados foram mais eficientes contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 com halos de inibição variando de 8 a 16 mm e 6 a 18 mm, respectivamente. No teste de influência das bacteriocinas, os resultados obtidos neste estudo demonstraram melhor controle inibitório da nisina em relação à pediocina. Em todos os isolados estudados, com as diferentes concentrações de nisina (1% e 2%), apresentaram halos de inibição entre 14 a 24 mm. A avaliação da eficiência das BAL individualmente e associadas frente a espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, demonstrou que os isolados em associação são capazes de inibir com mais efetividade a bactéria patogênica, sendo observada uma redução na contagem de *L. monocytogenes* de $2,67 \times 10^7$ para $1,35 \times 10^4$ após 240 horas de contato. As bactérias lácticas *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 apresentaram características promissoras quanto ao seu potencial probiótico e funcional. Destaca-se com esses resultados, a importância de estudar leite de búfala como fonte de novos candidatos probióticos.

Palavras-chave: leite de búfala; bactérias ácido lácticas; alimentos funcionais; probióticos.

ABSTRACT

The growing interest in functional foods has compelled the industry to search for new strains of bacteria with functional potential. In this context, buffalo milk can be used for the isolation of lactic acid bacteria (LAB) strains with possible probiotic or technological potential. The objective of this work was to explore the functional potential of *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 isolated from buffalo milk and identify applications in the food industry. To achieve this objective, tests of antimicrobial activity, influence of bacteriocins and evaluation of the efficiency of BAL individually and associated against the species of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 applied in Tryptic Soy Broth (TSB) and in dairy matrix were evaluated. In the evaluation of the antimicrobial activity, of the fourteen bacteria used in the study, no inhibition halos caused by *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 were observed against all Gram-negative bacteria. Regarding Gram-positive bacteria, the results were more efficient against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 with inhibition halos ranging from 8 to 16 mm and 6 to 18 mm, respectively. In the bacteriocin influence test, the results obtained in this study showed better inhibitory control of nisin compared to pediocin. In all the isolates studied, with the different concentrations of nisin (1% and 2%), showed inhibition halos between 14 to 24 mm. The evaluation of the efficiency of the LABs individually and in association against the *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 species showed that the isolates in association are able to inhibit the pathogenic bacteria more effectively, with a reduction in the *L. monocytogenes* count from 2.67×10^7 to 1.35×10^4 after 240 hours of contact. The lactic bacteria *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 and *Lactococcus lactis* L4A8 showed promising characteristics regarding their probiotic and functional potential. These results highlight the importance of studying buffalo milk as a source of new probiotic candidates.

Keywords: buffalo milk; lactic acid bacteria; functional foods; probiotics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 10.4 e <i>Lactococcus lactis</i> L4A8 contra culturas bacterianas gram positivas.....	21
Tabela 2: Atividade antimicrobiana com nisina e pediocina sobre crescimento bacteriano.....	22
Tabela 3: Resultados obtidos na contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	24
Tabela 4: Resultados obtidos na contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 em matriz láctea.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactéria ácido láctica
BHI	Brain Heart Infusion
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
g	Grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Plate Count Agar
pH	Potencial hidrogeniônico
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µL	Microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1 Leite de búfala	10
3.2 Bactérias lácticas	11
3.2.1 <i>Lactococcus lactis</i>	12
3.2.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
3.3 Potencial probióticos das bactérias lácticas	14
3.3.1 Produção de bacteriocinas.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Microrganismos estudados e condições de cultivo.....	17
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras	17
4.3 Efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento das bactérias lácticas e indicadoras	18
4.4 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de <i>Listeria</i> selecionada	18
4.5 Preparo da coalhada a partir do leite cru de búfala	19
4.6 Avaliação da qualidade microbiológica da coalhada	19
4.7 Avaliação do efeito das BAL sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em matriz láctea	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras	20
5.2 Efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento bacteriano	21
5.3 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	23
5.4 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 em matriz láctea.....	24
6. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o leite de búfala ocupa o segundo lugar na produção mundial, depois do leite bovino, devido a suas características nutricionais com alto teor de lipídeos, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, sendo mais produtivo na produção de derivados (Godinho et al., 2021). Além disso, a microbiota do leite de búfala é muito rica em algumas cepas de *Lactobacillus*, presentes em concentrações maiores do que as encontradas no leite bovino (Langa et al., 2019). As bactérias deste gênero são geralmente benéficas, levando a utilização em preparações probióticas, projetadas para promover a saúde (Silva et al., 2020).

O uso de cepas de bactérias ácido lácticas (BAL) como probiótico e como cultura bioprotetora em produtos lácteos tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Entretanto é necessário, para conferir benefícios à saúde, que os microrganismos probióticos mantenham-se viáveis no alimento durante sua vida útil, estando presentes em número significativo e estando viável no momento do consumo, na concentração recomendada de 6 a 8 log UFC/mL (Schmidt et al., 2010). Além do mais, nas indústrias alimentares e em diferentes processos, as aplicações de BAL desempenham função determinante, devido a sua capacidade de produzir processos sintéticos, inibidores e biológicos de forma natural, podendo sintetizar produtos como substâncias orgânicas e acelerar os processos bioquímicos nos alimentos (Pignata et al., 2014; Yilmaz-Ersan et al., 2016).

Nos últimos anos, foi evidenciado, que o efeito inibitório geral das BAL se deve a um sistema antagonista mais complexo produzido por culturas iniciadoras. As BAL são capazes de produzir e excretar substâncias inibidoras diferentes do ácido láctico e do ácido acético (Cabral et al., 2016). Essas substâncias produzidas e secretadas pelas BAL são antagônicas a um amplo espectro de microrganismos, e portanto, podem trazer contribuições significativas para a ação preservativa de produtos lácteos (Blaya et al., 2018). Possíveis interações microbianas, sejam benéficas (cooperação) ou desfavorável (inibição), podem gerar mudanças importantes na composição da flora bacteriana durante a fermentação do leite (Hamed et al., 2018).

Lactococcus lactis e *Leuconostoc mesenteroides* desempenham um papel essencial como culturas mistas em laticínios, principalmente por causa de sua importância comercial na quebra de caseína, elaboração de textura e formação de

sabor (Özgül et al., 2018). O crescimento associativo entre essas duas espécies foi estudado com respeito ao padrão de crescimento das cepas. Esses cultivos associados são complexos, visto que, podem variar em diversos aspectos as propriedades de produtos lácteos, incluindo taxa de crescimento, produção de ácido, produção de aroma, atividade proteolítica e podem auxiliar na conservação do alimento (Foucaud et al., 2001). Por esta razão, muitos esforços têm sido realizados para utilizar os efeitos desses microrganismos probióticos e/ou seus produtos antimicrobianos como estratégias de controle em laticínios.

No entanto, ainda há poucos estudos sobre estes microrganismos isolados do leite bubalino. Em vista disto, este trabalho foi desenvolvido visando explorar o potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados de leite de búfala, bem como, suas propriedades bioativas. Da mesma maneira, compreender e interpretar a funcionalidade destes isolados em matriz láctea torna-se importante considerando o interesse de aplicação em produtos derivados lácteos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial funcional de *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 isolados de leite de búfala.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a potencial atividade antimicrobiana dos isolados de bactérias lácticas frente a bactérias patogênicas selecionadas.
- Investigar a viabilidade celular dos isolados de bactérias lácticas na presença dos bioconservantes nisina e pediocina.
- Analisar o desempenho dos isolados de bactérias lácticas em matriz alimentar láctea.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite de búfala

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é criado em vários países asiáticos para a produção leiteira. Essa prática vem se difundindo e aumentando para os demais continentes devido à aceitação do consumo desse leite e de seus produtos derivados, tornando-se o segundo leite mais consumido no mundo, ficando somente atrás do leite bovino (Han et al., 2012). No Brasil, tem ocorrido um aumento crescente na criação de búfalos, em decorrência da adaptabilidade e rusticidade e devido às características físico-químicas peculiares do leite bubalino (Embrapa, 2021).

O leite de búfala apresenta características típicas que permitem sua fácil identificação sob o ponto de vista físico-químico e sensorial. Apresenta sabor ligeiramente adocicado, coloração mais branca que do leite bovino, devido à ausência quase total de caroteno em sua gordura (Lamagna et al., 2015). Quando comparado ao leite bovino, apresenta na sua composição, maior teor de constituintes, principalmente, gordura e proteína, os quais conferem maior porcentagem de sólidos totais e são responsáveis pelas características físicas (estrutura, cor, sabor) do leite de búfala e dos seus derivados (Pinto et al., 2016).

O interesse econômico pelo leite bubalino se dá em função de seu rendimento industrial, uma vez que, o alto nível de sólidos totais presentes no leite de búfala o torna ideal para a conversão em produtos lácteos, como queijo, requeijão, iogurte, sorvete, manteiga, mussarela, entre outros (Hamed et al., 2014). No entanto, apesar do alto valor nutricional e importância tecnológica do leite de búfala, seus níveis de produção e consumo, bem como seu uso na indústria de laticínios ainda são muito baixos quando em comparação com o leite bovino (Breyer et al., 2020).

No Brasil, apenas a Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA) do Estado de São Paulo publicou a Resolução SAA 24, a qual dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal, que vale apenas para este estado (São Paulo, 1994). O Estado do Rio Grande do Sul (RS) ainda não possui legislação específica para esse tipo de produto. Atualmente, os dados relativos à qualidade microbiológica e físico-química qualidade do leite de búfala cru, quando usado como matéria-prima para a produção de derivados no RS, ainda são limitados.

Nesse sentido, foram estabelecidos por Godinho (2020) padrões de identidade e qualidade do leite cru de búfala produzido no RS. As médias dos resultados dos parâmetros físico-químicos, onde foram medidos gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, cálcio, densidade, acidez e contagem de células somáticas foram 5,5g/100g, 4,06g/100g, 5,07g/100g, 15,5g/100g, 9,96g/100g, 0,161g/100g, 1,034g/ml, -0,527 °C e 95×10^3 células/ml, respectivamente. Portanto, é possível concluir que o leite de búfala demonstra características físico-químicas satisfatórias, de acordo com a literatura. No entanto, este ainda é um produto pouco explorado quanto a suas propriedades probióticas.

3.2 Bactérias lácticas

As BAL são extensamente usadas na indústria alimentícia por sua capacidade de conferir diferentes características sensoriais, como textura, sabor e odor agradável de alimentos fermentados (O'Bryan et al., 2015). As BAL são um grupo de bactérias classificadas como Gram positivas, não formadoras de esporos, sem motilidade, em forma de cocos ou bacilos, anaeróbios microaerofílicos ou facultativos, e que principalmente sintetizam ácido láctico durante o processo de fermentação (Siamansouri et al., 2013).

Os grupos de BAL mais abundante e difundido na natureza, devido à capacidade de crescer em vários substratos e em várias condições biológicas são pertencentes aos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Monroy, 2009). As espécies mais utilizadas para retardar a deterioração e preservar alimentos naturalmente são aqueles de gênero *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*, isoladas de grãos, plantas verdes, laticínios e produtos à base de carne (Jamie et al., 2013).

Nas décadas recentes, observou-se o potencial das BAL como bioconservantes naturais para laticínios, devido à produção de vários metabólitos, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil, ligação de dióxido de carbono (CO₂) e bacteriocinas (Favaro et al., 2015). Além disso, as BAL também atuam na inibição de organismos patogênicos, sendo amplamente utilizadas como probióticos

(O'Bryan et al., 2015). Por esta razão, as BAL vêm despertando muito interesse, uma vez que, podem contribuir favoravelmente para a preservação de produtos lácteos, permitindo reduzir o uso de conservantes químicos e suavizar tratamentos de alimentos processados, sem afetar sua qualidade e segurança (Mahrous et al., 2013).

3.2.1 *Lactococcus lactis*

Apesar da associação comum de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) com laticínios, na natureza, no entanto, esse microrganismo foi originalmente isolado de plantas em que se acredita que estava dormente, onde somente foi ativado quando ingerido por ruminantes, multiplicando-se após atingir o trato gastrointestinal (Song et al., 2017). Originário do gênero *Streptococcus* e reclassificado no gênero *Lactococcus* em 1985, *L. lactis* é dividido em três subespécies, nomeadamente *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *hordniae* (Liese et al., 2016). Fenotipicamente, *L. lactis* é classificada como uma bactéria intestinal anaeróbia facultativa gram-positiva, esférica, não esporulada e homofermentativa (Papagianni et al., 2010).

As cepas de *L. lactis* foram mantidas por muito tempo no leite e, portanto, se adaptaram à sobrevivência neste ambiente. Com o estabelecimento da indústria de laticínios, o uso de culturas selecionadas e definidas como culturas iniciadoras em processos fermentativos tornou-se prática. Culturas iniciadoras como *L. lactis* são de grande importância econômica na produção constante de produtos lácteos (Lee et al., 2017). Este microrganismo desempenha um papel fundamental na formação do sabor, textura e na sua preservação do produto final. Além disso, esta cepa foi selecionada por sua rápida acidificação, atividade proteolítica e resistência contra bacteriófagos e bacteriocinas (Mokoena et al., 2017).

Do ponto de vista industrial, é importante selecionar cepas que tenham um bom desempenho na fermentação e que resistam às condições adversas que ocorrem durante o processo de fermentação (Korcz et al., 2018). Além do mais, as cepas de *L. lactis* são capazes de sobreviver a procedimentos de armazenamento de menor qualidade e convenientes. Vários parâmetros (físicos) podem ser manipulados para controlar os *L. lactis* sem alterar a segurança e o valor nutritivo do produto final (Mokoena et al., 2017). Portanto, é relevante saber quais condições são favoráveis e quais são prejudiciais à vida desse microrganismo e quais mecanismos são essenciais para sua sobrevivência nessas condições.

3.2.2 *Leuconostoc mesenteroides*

O gênero *Leuconostoc* é uma bactéria Gram-positiva composta por 24 espécies diferentes (Yilmaz-Ersan et al., 2017). Atualmente, a espécie *Leuconostoc mesenteroides* consiste em três subespécies: *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Kaur et al., 2017). A notável capacidade fermentativa deste gênero tem sido utilizada no enriquecimento de nutrientes, segurança alimentar e benefícios para a saúde humana (Renes et al., 2017). *L. mesenteroides* é uma bactéria anaeróbia facultativa, não móvel e não formador de esporos na natureza e está presente em alimentos, produtos lácteos, produtos cárneos, vinho e vegetação verde. Estes microrganismos são cocos heterofermentativos obrigatórios, frequentemente elipsoidais e geralmente ocorrem em pares e cadeias (Shi et al., 2016).

Apesar de seu crescimento relativamente pobre em leite, *L. mesenteroides* desempenha um importante papel na indústria de laticínios (Yilmaz-Ersan et al., 2017). Culturas de *L. mesenteroides* são frequentemente usadas como utilizadores de citrato e produtores de sabor em fermentações lácticas. O papel dessas bactérias como um produtor de aroma em culturas iniciadoras mesofílicas para fermentações de leite podem ser qualificadas como complementares, uma vez que, os *Leuconostoc* lácteos precisam ser combinados com *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para realizar sua função (Maillard et al., 2016; Kaur et al., 2017).

Além disso, o metabolismo de lactose e citrato por *Leuconostoc* contribui para as propriedades organolépticas do leite, creme de leite e queijos frescos (Mastrigt et al., 2019). Inclusive, *L. mesenteroides* são desejáveis em fermentações lácticas por sua antibiose e sua relativa insensibilidade a ataque de bacteriófago. À vista disso, *L. mesenteroides* tem um futuro promissor para aplicação em alimentos lácteos como microrganismos bacteriocinogênicos e/ou probióticos por meio do aprimoramento das características físico-químicas desses produtos, principalmente devido à produção de ácidos orgânicos, CO₂ e compostos voláteis, que contribuem para o sabor e textura de derivados lácteos (Muller et al., 2018).

3.3 Potencial probióticos das bactérias lácticas

A utilização de bactérias ácido-lácticas e outros microrganismos em alimentos lácteos fermentados está difundida ao longo da história. Muitos são os benefícios que esses microrganismos podem conferir aos alimentos, como a conservação de suas propriedades nutricionais, o incremento no sabor e a capacidade de conferir maior segurança alimentar ao produto. Alimentos que propõem melhorias à saúde do consumidor, principalmente contendo microrganismos ditos probióticos, são amplamente comercializados. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (Schneider et al., 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2008) determina parâmetros para o enquadramento de um produto como probiótico, como concentração mínima de microrganismos probióticos no produto na faixa de 10^8 a 10^9 UFC (100 milhões a 1 bilhão Unidades Formadoras de Colônias) comprovada até o final da validade do produto, resistência a sais biliares e acidez gástrica da cultura comprovada por testes laboratoriais, utilização de uma das espécies recomendadas ou de uma espécie fora da lista de recomendação que seja comprovadamente probiótica, além de outros. Além disso, a sobrevivência do microrganismo nas condições gastrointestinais são fatores cruciais para que cheguem aos seus sítios de ação, possibilitando a manifestação de seus efeitos benéficos (Margalho et al., 2020).

Atualmente, as BAL são cada vez mais empregadas como probióticos para humanos e animais, visto que acarretam variados benefícios ao hospedeiro (Bachtarzi et al., 2019), inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos pela competição por substratos, impedindo a aderência de bactérias patogênicas nas células hospedeiras do intestino, reforçando o efeito de barreira da mucosa intestinal, liberando metabólitos que protegem o intestino (arginina, glutamina, ácidos graxos de cadeia curta e ácidos linolêicos conjugados) e, por fim, secretando compostos antimicrobianos, como bacteriocinas e substâncias, tais como ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido butírico) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Carafa et al. 2016).

Esses microrganismos probióticos podem ser veiculados à dieta humana através de diversas matrizes alimentícias. No entanto, sabe-se que produtos lácteos, e principalmente os queijos, são produtos alimentares amplamente disponíveis,

atraentes para muitos paladares e apropriados para todas as faixas etárias (Margalho et al., 2020). Além do mais, produtos alimentícios de origem láctea possuem efeito imunomodulador e são capazes de permanecer viáveis no trato gastrointestinal, desta forma, são excelentes matrizes para veiculação dos probióticos (Tagliazucchi et al., 2019). Entretanto, a aplicação das BAL como probióticos na indústria alimentícia requer uma avaliação de segurança para garantir a inocuidade das cepas. Inclusive, estudos que buscam analisar novas cepas com potenciais probióticas são fundamentais na contribuição e garantia de suas atividades probióticas e efeitos funcionais, para que possam ser aplicados na indústria de alimentos no futuro (Breyer et al., 2020).

3.3.1 *Produção de bacteriocinas*

As BAL produzem uma variedade de fatores antagônicos que incluem a excreção metabólica de produtos, substâncias semelhantes a antibióticos e proteínas bactericidas, denominadas bacteriocinas (Silva et al., 2018). As bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelas BAL nos ribossomos e apresentam atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias Gram-positivas, mas algumas também atuam contra bactérias Gram-negativas (Chikindas et al., 2018). A classificação das bacteriocinas mais conhecida foi feita por Klaenhammer em 1993, e desde então muitas formas de classificação foram sugeridas, sendo que a mais recente agrupa as bacteriocinas em grupos I, II e III (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

As bacteriocinas pertencentes à classe I possuem de 19 a mais de 50 aminoácidos e são caracterizadas por aminoácidos incomuns como a lantionina e metil-lantionina, que formam estruturas de anéis múltiplos tornando os lantibióticos diferentes dos outros peptídeos antimicrobianos e contribuindo para a estabilidade contra o calor, alterações de pH e melhora na tolerância à oxidação (Chanos et al., 2016). A classe II contém peptídeos não-modificados, pequenos e estáveis ao calor, com atividade conhecida contra *Listeria* (Yang et al., 2018). Os peptídeos pertencentes à classe III são maiores e sensíveis a tratamento térmico (60-100 °C por 15 minutos) e seu mecanismo de ação é diferente das demais classes pois se baseia na lise da parede celular do microrganismo alvo (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Para que seu uso seja liberado para utilização em alimentos, a bacteriocina deve atender a alguns requisitos, como amplo espectro de inibição sobre os principais

patógenos alimentares ou ser específica a algum deles, ser termoestável, não implicar em risco ao consumidor, aumentar a segurança do produto sem afetar sua qualidade nutricional e sensorial, e possuir status GRAS (Generally Recognized as Safe) (Abdulkarim et al., 2020). Apesar das BAL produtoras de bacteriocinas serem consideradas seguras e serem tema de várias pesquisas, apenas a nisina e a pediocina PA-1 são bacteriocinas autorizadas para uso na indústria alimentícia (Nebbia et al., 2021).

A nisina é uma bacteriocina classificada como um lantibiótico, produzida por um grupo de bactérias Gram-positivas, o qual inclui espécies de *Lactococcus* e *Streptococcus*. Nas últimas décadas, a nisina foi amplamente utilizada como um biopreservativo alimentar. Ela foi aprovada pela Organização Conjunta das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) em 1969 como um aditivo alimentar seguro, e pela Food and Drug Administration (FDA) em 1988, recebendo uma designação de GRAS para uso em queijos processados (Strack et al., 2021). No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg, além disso, o Brasil é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida sua utilização na superfície externa de salsichas de diferentes tipos (Shin et al., 2016).

No entanto, o potencial da pediocina PA-1 já foi explorado comercialmente utilizando suas cepas produtoras e/ou seus fermentados contendo a pediocina PA-1. Tendo em vista sua associação típica com a fermentação de alimentos e sua longa tradição como bactérias de qualidade alimentar, as BAL produtoras de pediocina PA-1 são designadas como GRAS e, portanto, os benefícios desta bacteriocina já vêm sendo utilizados dessa maneira (Copetti et al., 2021). Embora a pediocina PA-1 não tenha um espectro antimicrobiano tão amplo quanto o da nisina, ela apresenta uma atividade particularmente forte contra *Listeria monocytogenes*, uma bactéria patogênica de preocupação significativa na indústria alimentícia (Turner et al., 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos estudados e condições de cultivo

Para o desenvolvimento do estudo, foram selecionadas duas BAL isoladas de leite de búfala, previamente identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8, em trabalho anterior (Breyer et al., 2020). As culturas foram cultivadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 30 °C por 24 horas e depois semeadas por esgotamento em placas de Ágar MRS para avaliação da pureza dos isolados.

Como culturas indicadoras foram empregadas quatorze bactérias de importância na área de alimentos: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* (alimento), *Serratia marcescens* ATCC 43861, *Enterobacter cloacae* (alimento), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* 17D78 (alimento), *Listeria monocytogenes* 4C (alimento), *Listeria monocytogenes* QF Oxford (alimento), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria seeligeri* (alimento), *Listeria innocua* L13 (alimento), *Listeria seeligeri* PB Palcam (alimento) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Essas culturas foram cultivadas em placas de Ágar Brain Heart Infusion (BHI) a 37 °C por 24 horas, para a execução dos experimentos.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras

As bactérias lácticas previamente selecionadas foram cultivadas em caldo MRS a 30 °C por 72 horas constituindo diferentes grupos: Grupo 1 - *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4, Grupo 2 - *Lactococcus lactis* L4A8 e Grupo 3 - *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + *Lactococcus lactis* L4A8 (1:1). Após o período de incubação, uma alíquota de 1 mL de cada cultivo foi colocada em tubos Eppendorfs, em duplicata e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Após esta etapa foi realizada a avaliação do pH do cultivo e 800 µL do sobrenadante livre de células foi transferido para outro tubo.

Para a realização do teste de atividade antimicrobiana, foi realizada uma suspensão das culturas indicadoras em solução salina 0,85%, conforme a Escala de

McFarland de 0.5 (10^8 UFC/ml). Cada suspensão foi espalhada com suabe sobre a superfície do meio de cultivo microbiano Ágar leite. Após, os grupos preparados de bactérias lácticas foram aplicados pelo método da gota (10 μ L) e pelo método da picada com cada um dos 2 isolados, em triplicata. Posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A avaliação da presença dos halos de inibição foi verificada e procedeu-se a medição dos halos que foi expressa em milímetros (mm).

4.3 Efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento das bactérias lácticas e indicadoras

Para a verificação do efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento das culturas *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 e das indicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, seguiu-se a mesma metodologia empregada para a técnica descrita no item 4.2. Cada suspensão foi inoculada em placas de ágar leite com o uso do método de espalhamento com auxílio de suabes. As soluções de nisina e pediocina foram preparadas à 1 e 2%. Para a realização da filtração das soluções foi utilizada a técnica de esterilização por filtração em Filtros Millipore (0,22 μ m). O método de difusão em ágar foi realizado com a inoculação em forma de gotas de 20 μ L das soluções das bacteriocinas em triplicatas, sobre as placas de ágar leite previamente inoculadas com os isolados. Incubou-se por 24 horas à 30° e 37 °C para leitura dos resultados.

4.4 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria* selecionada

As culturas de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 foram incubadas em caldo MRS enquanto a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 foi incubada em caldo Tryptic Soy Broth (TSB), ambas por 24 horas a 30 °C. Após este período distribuiu-se as culturas em Erlenmeyer contendo 100 mL de TSB, da seguinte forma: A) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 μ L); B) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 μ L) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (1 mL) e C) *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 μ L) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (500 μ L) + *Lactococcus lactis* L4A8 (500 μ L). Este experimento foi incubado à 30 °C por 48 horas, realizando-se coletas nos tempos de 16, 24 e 48 horas. Para a avaliação das

unidades formadoras de colônias por mililitro UFC/mL foi empregado o método da microdiluição (Milles et al., 1938).

4.5 Preparo da coalhada a partir do leite cru de búfala

Foram devidamente coletadas amostras de leite das búfalas criadas na Estação Experimental Agronômica da UFRGS e aquecido 1 litro desse leite até 40 °C, quando foi adicionado coagulante líquido HA-LA (5 mL diluído em 25 mL de água) e cloreto de cálcio (0,5 g). Após 30 min de repouso foi feito o corte na massa e depois de 10 min a coalhada foi coada, obtendo-se aproximadamente 740 L de soro e 198,33 g de massa coalhada.

4.6 Avaliação da qualidade microbiológica da coalhada

As amostras da massa coalhada foram separadas assepticamente, as quais foram avaliadas quanto ao pH. Para a avaliação microbiológica foi transferido 1 g para Eppendorfs contendo 900 µL de solução salina 0,85% e a partir disto, foram realizadas diluições seriadas. Em seguida, 20 µL de cada diluição da coalhada foram aplicadas em uma placa com meio Plate Count Ágar (PCA) e uma placa com meio Agar *Listeria* Oxford, ambas incubadas a 37 °C por 24 horas para verificação de crescimento microbiano.

4.7 Avaliação do efeito das BAL sobre *Listeria monocytogenes* em matriz láctea

Foram retiradas alíquotas de 20 g da colhada e colocadas em falcons estéreis. Em seguida foi adicionado 7 µL de um cultivo de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e procedeu-se com uma homogeneização. Após, dividiu-se em três tratamentos diferentes: T1 somente com a *Listeria monocytogenes* selecionada, o T2: com adição de 200 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e T3: 100 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + 100 µL *Lactococcus lactis* L4A8. Os falcons foram mantidos sob refrigeração a uma temperatura média de 5°C realizando-se coletas nos tempos de 48, 120, 168 e 216 horas. Para a avaliação da manutenção da viabilidade de *Listeria* foi empregado o método da microdiluição em duplicata (Milles et al., 1938).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das BAL frente às culturas indicadoras

Das quatorze bactérias indicadoras empregadas no estudo, não foram observados presença de halos de inibição causados por *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 frente a todas as bactérias Gram-negativas. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Leon et al. (2004), onde foram testados o potencial antimicrobiano de bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* e nenhuma atividade foi registrada contra as bactérias Gram-negativas incluídas no estudo. Outros trabalhos também relatam resistência à atividade antimicrobiana das BAL frente os organismos Gram-negativos, os quais constataram ser devido a essas bactérias apresentarem uma membrana externa, dificultando a permeabilidade dos compostos antimicrobianos (Majolo et al., 2014; Santos et al., 2017; Trentin et al., 2020).

A Tabela 1 mostra o resultado da atividade antimicrobiana de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 contra as culturas bacterianas Gram-positivas do estudo, onde observa-se que tanto os sobrenadantes quanto a inoculação pelo método de picada de ambas as BAL foram capazes de inibir *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 com halos de inibição variando de 8 a 16 mm e 9 a 10 mm, respectivamente. Resultados que corroboram com Marques et al. (2015), que isolaram BAL de queijos artesanais com o objetivo de caracterizá-las quanto ao potencial tecnológico e a atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus* resultando no antagonismo de 85% das BAL isoladas frente a *S. aureus* ATCC 25923. Os inóculos contendo células viáveis dos isolados testados apresentaram antagonismo frente a *S. aureus*, com halos de inibição entre 10 a 13 mm de diâmetro. Os sobrenadantes (livre de células) de cada isolado promoveram halos de inibição que variaram de 7 a 14 mm indicando que o mecanismo de ação antagonista está relacionado a moléculas secretadas no meio de cultura.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 contra culturas bacterianas Gram positivas.

Bactérias Gram Positivas	Alíquotas (mm)				
	L	Leuco	L+L	PL	PLeuco
<i>L. monocytogenes</i> 17D78	0	0	0	0	0
<i>L. monocytogenes</i> 4C	0	0	0	0	16
<i>L. monocytogenes</i> QF Oxford	0	0	0	0	16
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0	0	0	6	18
<i>L. innocua</i> L13	0	0	0	0	0
<i>L. seeligeri</i> PB Palcam	0	0	0	0	19
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9	10	9	8	16

L: *Lactococcus lactis* L4A8; Leuco: *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4; L+L: *Lactococcus lactis* L4A8 + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4; PL: picada *Lactococcus lactis* L4A8 e PLeuco: picada *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4.

A inibição de *S. aureus* nos alimentos é de extrema importância, uma vez que este microrganismo é potencialmente patogênico e pode produzir exotoxinas (enterotoxinas) responsáveis por causar intoxicação alimentar nos consumidores (Otto et al., 2014; Silva et al., 2017). Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana, cerca de 45% destas no mundo estão relacionadas com *S. aureus* (Andrade et al., 2019). Satisfatoriamente, os resultados encontrados neste estudo indicam que a aplicação de BAL como uma alternativa em produtos alimentares pode ser sugerido, a fim de evitar a contaminação com essa bactéria.

5.2 Efeito da nisina e pediocina sobre o crescimento bacteriano

Nesta avaliação pode-se observar que em todos os isolados estudados, com as diferentes concentrações de nisina (1% e 2%), foram constatados halos de inibição que variaram de 14 mm a 24 mm (Tabela 2). Resultados semelhantes com nisina foram descritos por Bordignon-Junior et al. (2012), onde avaliou-se a ação antimicrobiana da nisina sobre as bactérias de importância alimentar (incluindo *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), empregando somente concentrações crescentes da bacteriocina e, todas as bactérias estudadas se mostraram susceptíveis, nas diferentes concentrações. Estudos anteriores nos quais foram analisados o potencial da nisina com diferentes grupos de bactérias de

importância alimentícia, reportaram a alta atividade inibidora da nisina sobre bactérias Gram-positivas em relação às Gram-negativas. De maneira geral, isso se deve ao modo de ação da nisina diretamente na membrana plasmática e na parede celular da bactéria, o que é dificultado pela membrana externa presente na parede nas Gram-negativas e que atua como uma barreira impermeável à molécula da nisina (Rishi et al., 2014; Field et al., 2016; Alves et al., 2018).

Tabela 2: Atividade antimicrobiana com nisina e pediocina sobre crescimento bacteriano.

Microrganismos	Alíquotas (mm)			
	P1	P2	N1	N2
<i>Lactococcus lactis</i> L4A8	0	5	18	24
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LB 10.4	0	0	14	18
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	17	17	20	24
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0	0	14	15

P1: pediocina a 1%; P2: pediocina a 2%; N1: nisina a 1%; N2: nisina a 2%.

Muitas bacteriocinas são eficazes contra bactérias patogênicas Gram-positivas e o efeito da nisina em *L. monocytogenes*, é descrito por vários autores (Chen et al., 2014; Miyamoto et al., 2015; Alves et al., 2018). As medidas dos halos de inibição, formados pelas diferentes concentrações de nisina e pediocina sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644, os quais variam de 17 a 24 mm (Tabela 2), mostram serem bacteriocinas eficazes contra esta bactéria. Fato este confirmado por Vitola et al. (2018), onde foi avaliado a atividade antimicrobiana das bacteriocinas sobre *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes* ATCC 7644, no qual observou-se que com ambas as bacteriocinas testadas, a bactéria *L. monocytogenes* mostrou-se sensível. Além disso, os resultados sobre o isolado de *Staphylococcus aureus* também foram semelhantes ao obtido neste estudo, uma vez que apresentou atividade antimicrobiana apenas nos testes com a nisina e em relação a pediocina não foram observadas nenhuma atividade antimicrobiana nas diferentes concentrações testadas (1%, 5% e 10%). Importante observar também que, à medida em que se aumenta as concentrações dos peptídeos antimicrobianos, maiores são os diâmetros dos halos formados.

Ao contrário de Kaur et al. (2013) e Verma et al. (2017), que também avaliaram ambas as bacteriocinas sobre o crescimento bacteriano de espécies do gênero de

Listeria, os resultados obtidos neste estudo demonstraram melhor controle inibitório da nisina em relação à pediocina. Além disso, para a seleção de bacteriocinas, o ideal seria que elas não interferissem na atividade de BAL desejáveis, embora tenha ocorrido antagonismo das BAL testadas no presente estudo com a nisina em ambas as concentrações, não houve este efeito em relação a pediocina considerando as médias dos níveis de interferência obtidos (Tabela 2). Dessa forma, a pediocina é um potencial aditivo de produtos lácteos, uma vez que não afeta as bactérias benéficas *Lactococcus lactis* L4A8 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 podendo ser utilizadas em conjunto com a finalidade de melhorar a qualidade microbiológica do produto (Amado et al., 2016; Porto et al., 2017).

5.3 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Os resultados deste estudo demonstram o controle inibitório de *Lactococcus lactis* L4A8 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 no processo de desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, bem como uma diminuição deste microrganismo ao longo das 48 horas experimentais quanto aos três grupos estabelecidos (Tabela 3). Vários estudos têm mostrado que a inoculação de alimentos com cepas de BAL podem inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (Dominguez et al., 2013; Khan et al., 2017; Turner et al 2018). Estudos anteriores ainda mostram que o antagonismo microbiano das BAL (*L. mesenteroides* e *L. lactis*) é atribuído à produção de produtos finais metabólicos, como peróxido de hidrogênio, diacetil e ácidos orgânicos e bacteriocina (Reis et al., 2012; Shao et al., 2017; Borges et al. 2019).

Pode-se observar ainda na Tabela 3 que as diferenças nas contagens em ambos os grupos experimentais (Grupos B e C) ao longo do armazenamento foram distintos no tempo de 48 horas, visto que houve maior diminuição do cultivo da *Listeria* no grupo C, onde há associação de *Lactococcus lactis* L4A8 e *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4, o qual apresentou ao final do tempo experimental a contagem de $7,88 \times 10^5$ UFC/mL. Já no grupo controle (Grupo A), no mesmo período, pode-se perceber que também obteve um decréscimo da bactéria patogênica, embora tenha ocorrido um aumento do microrganismo no período de 16 horas. Dentre os três grupos testados, foi constatado maior redução de crescimento da *Listeria monocytogenes*

ATCC 7644 no período de 48 horas no grupo C, o qual demonstra ser capaz de inibir com mais eficiência a bactéria patogênica.

Tabela 3: Resultados obtidos na contagem de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Tempo (horas)	Grupo		
	A	B	C
0	1,02 x 10 ⁶	-	-
16	8,12 x 10 ⁸	3,35 x 10 ⁷	5,76 x 10 ⁷
24	2,52 x 10 ⁷	4,03 x 10 ⁷	5,73 x 10 ⁷
48	3,35 x 10 ⁷	8,5 x 10 ⁶	7,88 x 10 ⁵

Grupo A: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL); Grupo B: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (1 mL); Grupo C: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (400 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (500 mL) + *Lactococcus lactis* L4A8 (500 mL).

Estes resultados trazem interessantes perspectivas, uma vez que, muitos produtos lácteos requerem estratégias adicionais para controlar o crescimento e a sobrevivência de *L. monocytogenes*. A inibição desta bactéria nos alimentos é de extrema importância, uma vez que este microrganismo é o agente causador da listeriose, uma das doenças de origem alimentar mais significativas nos países industrializados (Turner et al., 2018). A inclusão de obstáculos adicionais para controlar este patógeno nos alimentos é particularmente desejável dada sua ampla distribuição no meio ambiente, sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e o fato de que pode sobreviver durante a fabricação de queijos (Furtado et al., 2015). Portanto, é fundamental estudos que identifiquem possíveis isolados que poderão ser utilizados como mais uma alternativa de uso para prevenir o crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos.

5.4 Avaliação do efeito das BAL sobre espécie de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em matriz láctea

Para dar seguimento ao experimento, primeiramente foi analisada a qualidade da coalhada produzida. Após a coalhada pronta, verificou-se o valor de pH 6 na massa e em sequência foram realizadas as diluições nas placas (PCA e Agar *Listeria* Oxford) e incubadas na estufa a 37 °C por 24 horas. Decorridas as 24 horas, observou-se ausência de crescimento microbiano nas diluições realizadas em ambas as placas de teste. Esse resultado pode ser explicado devido a manipulação adequada do leite,

principalmente na ordenha, a qual é a etapa mais comprometedor. Em outras palavras, a qualidade do leite obtido nos estabelecimentos produtores, assim como os produtos de origem láctea, é sujeita a diversos fatores, como a limpeza ou cuidado com os equipamentos, muitos diretamente controlados por seus proprietários ou funcionários. Logo, devido a este resultado da qualidade da coalhada, a mesma foi empregada no experimento seguinte.

Considerando que bactérias psicotróficas podem sobreviver em queijos durante a fabricação, maturação e armazenamento sob refrigeração, o controle do crescimento de *L. monocytogenes* é de forte relevância e um grande desafio para produtores e consumidores. Conforme evidenciado no primeiro tratamento (T1), a *L. monocytogenes* ATCC 7644 se desenvolveu rapidamente na coalhada durante o armazenamento sob refrigeração (Tabela 4). Na amostra, incorporado experimentalmente com 200 µL de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (T2), as contagens de UFC da *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentaram uma redução de $3,35 \times 10^8$ para $2,65 \times 10^5$ no período de 240 horas. Na pesquisa de Borges et al. (2019), o qual foi avaliado a bactéria *L. mesenteroides* na inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e na viabilidade bacteriana em creme fermentado, mostrou-se resultados promissores para a preservação de alimentos devido a sua resposta antimicrobiana, pois o crescimento da *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi menor na presença de substâncias antimicrobianas produzidas por *L. mesenteroides* ao longo de um período de 9 horas.

Tabela 4: Resultados obtidos na contagem de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em matriz láctea.

Tempo (horas)	Grupo		
	T1	T2	T3
0	$2,87 \times 10^6$	-	-
48	$1,42 \times 10^9$	$3,35 \times 10^8$	$2,67 \times 10^7$
120	$3,57 \times 10^9$	$2,57 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$
168	$3,45 \times 10^8$	$1,50 \times 10^6$	$6,00 \times 10^4$
240	$1,67 \times 10^8$	$2,65 \times 10^5$	$1,35 \times 10^4$

T1, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL); T2, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (200 mL); T3, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (7 µL) + *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 (100 µL) + *Lactococcus lactis* L4A8 (100 µL).

Resultados do presente estudo também estão de acordo com Najera-Dominguez et al. (2013), onde foi observado que as cepas de *L. lactis* inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patógenos de origem alimentar, melhorando a qualidade microbiana e a segurança dos produtos lácteos, assim como mostra na Tabela 4, na qual o T2 no tempo de 240 horas apresentou redução de UFC, obtendo uma contagem final de $2,65 \times 10^5$. No entanto, o resultado observado no grupo contendo o crescimento associativo de 100 μ L de *Leuconostoc mesenteroides* LB 10.4 + 100 μ L de *Lactococcus lactis* L4A8 (T3) apontou uma diminuição maior em relação aos demais grupos. As diferenças nas contagens em ambos tratamentos (T2 e T3) ao longo do armazenamento mostraram que a inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644 demonstrou mais efetivo com a associação de ambas as BAL, visto que a contagem microbiana decresceu de $2,67 \times 10^7$ para $1,35 \times 10^4$ longo de todo o experimento. Desta forma, tornam-se uma excelente alternativa para a produção de produtos lácteos, uma vez que a contaminação desse patógeno é frequentemente relatado e costuma ser uma grande preocupação, principalmente por ser uma bactéria difícil de erradicar devido à sua capacidade de sobreviver em condições extremas, incluindo uma ampla faixa de pH, temperaturas de refrigeração e altas concentrações de sal (Zocche et al., 2010; Furtado et al., 2015; Khan et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Em geral, as BAL apresentam grande potencial de aplicação na indústria de alimentos e, atualmente, inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos a elas. A busca e caracterização de BAL com potencial probiótico, oriundas de fontes ainda pouco pesquisadas como o leite bubalino, foi o principal foco deste estudo. As bactérias lácticas *Leuconostoc mesenteroides* LB10.4 e *Lactococcus lactis* L4A8 demonstraram serem tolerantes a matriz alimentar, possibilitando a utilização de ambos os microrganismos como bacteriocinas, principalmente em associação pois atestaram potencial de inibição mais eficaz contra a bactéria patogênica estudada.

REFERÊNCIAS

- Abdulkarim, I. H., Mohammed, S. S. D., & Orukotan, A. A. Gene Identification for Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Selected Fermented Foods. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**. Vol. 3, p. 1-12, 2020.
- Prado T. A., Brazil. C. J., Svetoslav D. T., Lima, A. B. P. The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. **Food Reviews International**. Vol. 31, p. 147-171, 2015.
- Alvarez, S. P., Montalbán, L. M., MU, D., Kuipers, O. P. Bacteriocins off lactic acid bacteria: extending the family. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 100, p. 2939-295, 2016.
- Alves, F. C. B. **Mecanismos de Ação da Atividade Antimicrobiana da Nisina e em Combinações com Antimicrobianos Tradicionais Sobre *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação, Universidade Estadual Paulista em Franca, 2018.
- Amado, I. R., Fuciños, C., Fajardo, P., Pastrana, L. Pediocin SA-1: a selective bacteriocin for controlling *Listeria monocytogenes* in maize silages. **Journal Dairy Science**. p. 99, 2016.
- Andrade, J., F. P. de, Lima, B. T. de M., Alves, T. W. B., Menezes, M. E. da S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista De Ciências Médicas E Biológicas**. Vol. 18, p. 89–93, 2019.
- Araújo, M. M. P., Cunha, A. F., Castilho, N. P. A. Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista in vitro de duas bactérias ácido lácticas. **Digital Library of Journals**. Vol. 31, p. 2, 2013.
- Bachtarzi, N., Kharroub, K., Ruas-Madiedo, P. *Exopolysaccharide*-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim milk fermentations. **LWT-Food Science and Technology**. Vol. 107, p. 117–124, 2019.

Blaya, J., Barzideh, Z., LaPointe, G. Symposium review: interaction of starter cultures and non starter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**. Vol.101, p. 3611–3629, 2018.

Bordignon-Junior, S. E., Miyaoka, M. F., Costa, J. L., César, A., Benavente, T. Couto, G. H., Soccol, C. R. Inhibiting Gram-negative bacteria growth in microdilution by Nisin and EDTA treatment. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, p. 127-135, 2012.

Borges, D. O., Matsuo, M. M., Bogsan, B. B., Silva, T. F., Penna, A. L. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 reduces *Listeria monocytogenes* growth and impacts on fatty acids profile and conjugated linoleic acid content in fermented cream. **LWT-Food Science and Technology**. Vol. 107, p. 264-271, 2019.

Botelho, L. G., Cunha, A. F., Alves, R. G., Fernandes, N. E., Cartilho, N. P. A. Lelis, V. G. Enumeração e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros. **Anais**. VIII SIMPAC - Volume 8 - n. 1, 2016.

Breyer G, Arechavaleta N, Siqueira F, Motta A. **Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stres. Probiotics Antimicrob Proteins**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

Brito, J. R. F, Santos E. M. P, Arcuri, E. F. Retail Survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy factory to establish prevalence, kinship and sources of isolates of *Listeria monocytogenes*. **Applied Microbiology Biotechnology**. Vol. 111, p. 4954-4961, 2008.

Cabral, M. L. B; Lima, M.S.F.; Fernandes, G.A.A.; Costa, E.F.; Porto, A.L.F.; Cavalcanti, M.T.H. Artisancheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal of Bioenergy and Food Science**. Vol.3, p. 207-215, 2016.

Carafa, I. Microbial evolution of traditional mountain cheese and characterization of early fermentation cocci for selection of autochthonous dairy starter strains. **Food Microbiology**. Vol. 53, p. 94–103, 2016.

Catozzi, C.; Sanchez Bonastre, A.; Francino, O.; Lecchi, C.; de Carlo, E.; Vecchio, D.; Martucciello, A.; Fraulo, P.; Bronzo, V.; Cuscó, A.; D'Andreano, S.; Cecilian, F. **The microbiota of water buffalo milk during mastitis.** PLoS ONE. Vol. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.

Chanos, P., Mygind, T. Co-culture inducible bacterium production in lactic and acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology.** Vol. 100, p. 4297-4308, 2016.

Chen H., Davidson P. M., Zhong Q. Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. **International Journal of Food Microbiology.** Vol. 191, p. 75–81, 2014.

Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opin in Biotechnology.** Vol. 49, p. 23-28, 2018.

Copetti, I. **Bacteriocinas: uma revisão bibliográfica sobre potenciais aplicações terapêuticas e os desafios em torno de seu emprego.** Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.

Cunha, A. F., Acurcio, L. B., Assis, B. S., Oliveira, D. L. S., Leite, M. O., Cerqueira, M. M. O. P., Souza, M. R. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* ssp. isolated from fermented milks. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** Vol. 65, p. 1876-1882, 2013.

Dominguez, N. Gutierrez, M. Autolytic and proteolytic properties of strains of *Lactococcus lactis* isolated from different vegetables, raw-milk cheeses and commercial starter cultures. **Food and Nutrition Sciences.** Vol. 4, p. 21-26, 2013.

Duarte, M. C. K. H., Cortez, N. M. S., Cortez, A. S., Franco, R. M. **Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia. Vol. 9, n.16, 2013.

Erkus, O., de Jager, V.C.L., Spus, M., van Alen-Boerrigter, I.J., van Rijswijk, I.M.H., Hazelwood, L., Janssen, P.W.M., van Hijum, S.A.F.T., Kleerebezem, M., Smid, E.J. **Multifactorial diversity sustains microbial community stability.** ISME J. Vol. 7, p. 2126–2136, 2013.

Nebbia, S., Lamberti, C., Lo Bianco, G., Cirrincione, S., Laroute, V., Coccagn-Bousquet, M., Cavallarin, L., Giuffrida, M. G., Pessione, E. Antimicrobial Potential of Food Lactic Acid Bacteria: Bioactive Peptide Decrypting from Caseins and Bacteriocin Production. **Microorganisms**. Vol. 9, p. 65, 2021.

Miles A. A., Mirsa S. S., Irwin, J. O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Hygiene**. Vol. 38, p. 49, 1938.

Muller, A., Rosch, N., Cho, G. S., Meinhard, A. K., Kabisch, J. Habermann, D., Franz, C. M. A. P. Influence of iodized table salt on fermentation characteristics and bacterial diversity during sauerkraut fermentation. **Food Microbiology**. Vol. 76, p. 473-480, 2018.

Mastrigt, O. V., Egas, R. A., Abee, T., Smid, E. J. Aroma formation in retentostat co-cultures of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Food Microbiology**. Vol. 82, p. 151-159, 2019.

Favaro L., Barretto Penna A. L., Todorov S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation?. **Trends Food Science Tech**. Vol. 41, p. 37-48, 2015.

Field, D. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**. Vol. 7, p. 1713, 2016.

Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Right-handed, M. T., Franco, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. DF04Mi *lactis* isolated from goat milk: application in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas goat cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 46, p. 201-206, 2015.

Ga'ívez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. **Microbial antagonists to foodborne pathogens and biocontrol**. Current Biotechnology. Vol, 21, p. 1–7, 2010.

Hamed, M. I.; Zaitoun, A. M. A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis in dairy buffaloes farms. **International Journal of Livestock Research**. Vol. 4, p. 3, 2014.

Han X, Lee FL, Zhang L, Guo MR. Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development. **Function Food Health**. Vol. 2, p. 86-106, 2012.

Kaur, G. Singh, T. P., Malik, R. K. Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin

resistant variants to common food preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**. Vol. 44, p. 63-71, 2013.

Korcz, E.; Kerényi, Z.; Varga, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Function**, 2018.

Kos B, Suskovic J, Beganovic J, Gjuracic K, Frece J, Iannaccone C, Canganella F. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. **World J Microbiol Biotechnol**. Vol. 24, p. 699–707, 2008.

Langa, S., van den Bulck, E., Peiroten, A., Gaya, P., Schols, H. A., & Arqués, J. L. Application of lactobacilli and prebiotic oligosaccharides for the development of a synbiotic semi-hard cheese. **LWT-Food Science and Technology**. Vol. 114, Article 108361, 2019.

Lee, H. Y. et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived *Lactobacillus* B. *Guide to Advanced Empirical Software Engineering*. Vol. 7, n. 1, p. 125301, 2017.

Liese, A. **Fermentation of Lactic Acid Bacteria: State of the Art and New**. [s. l.], 2016.

Linares, D. M., E. R. Geertsma, and B. Poolman. Evolved *Lactococcus lactis* strains for enhanced expression of recombinant membrane proteins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 401, p. 45-55, 2010.

Mahrous, H., Mohamed, A., El-Mongy, M., El-Batal, A., Hamza, H. Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of *Lactobacillus* spp. Isolated from Some Dairy Products under Different Culture Conditions. **Food and Nutrition Sciences**. Vol. 4, p. 342-356, 2013.

Marques, J. D. L., Hoffmann, J. F., Chaves, F. C., Silva, W. P., Maria, Â. **Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo artesanal: potencial tecnológico e atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus***. XVII Encontro de pós-graduação (ENPOS), Universidade Federal de Pelotas, 2015.

Mokoena, M. P. **Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review.** *Molecules*. Vol. 22, p. 8, 2017.

Monroy D. M. C., Castro B. T., Fernández P. F. J., Mayorga R. L. **Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas.** *ContactoS*. Vol. 73, p. 63-72, 2009.

Oloketuyi, S. F., Khan, F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms-current knowledge and future outlooks. **Journal of Basic Microbiology**. Vol 57, p. 728–743, 2017.

Otto, M. **Toxinas de *Staphylococcus aureus*.** *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 17, p. 32-37, 2014.

Özogul, F.; Hamed, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amine formation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Vol. 58, n. 10, p. 1660-1670, 2018.

O'Bryan C. A., Crandall P. G., Ricke S. C., Ndahetuye J. B. Lactic Acid Bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. En *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Woodhead. Oxford, RU. Vol. 54, p. 117-136, 2015.

Papagianni, M.; Avramidis, N. *Lactococcus lactis* as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 49, n. 2, p. 197–202, 2011.

Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Arch Biol Technol**. Vol. 50, p. 521–542, 2007.

Pignata, M. C. A. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfalas e vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró. Vol. 4, n 27, p. 226-233, 2014.

- Pogacic, T. Maillard, M. B., Leclerc, A., Hervé, C. Chuat, V., Valence, F. Thierry, A. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 100, p. 2335-2346, 2016.
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., Oliveira, R. P. S. *Pediococcus spp.*: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**. Vol. 35, p. 361–374, 2017.
- Reis J. A., Paula A. T., Casarotti S. N., Penna A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering**. Vol. 124, p. 40, 2012.
- Reyes, E. Linares, D. M., González, L., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. Stanton, C. Production of conjugated linoleic acid and gamma-aminobutyric acid by autochthonous lactic acid bacteria and detection of the genes involved. **Journal of Functional Foods**. Vol. 34, p. 340-346, 2017.
- Rishi, P. Evaluation of nisin-beta-lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **The Journal of Antibiotics** (Tokyo). Vol. 67, n. 12, p. 807-811, 2014.
- Santos, C. H. S; Piccoli, R. H.; Tebaldi, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos incluídos frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 76, p. 1719, 2017.
- Schneider, K. **Aplicação de Bactérias Lácticas com ação antimicrobiana em queijo minas frescal**. Dissertação, Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2016.
- Shao, X., Fang, K., Medina, D., Wan, J., Lee, J. L., Hong, S. H. The probiotic, *Leuconostoc mesenteroides*, inhibits *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Safety**, 2017.
- Shi, F., Wang, Y., Li, X. Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. **Biotechnology Letters**. Vol. 38, p. 1551-1557, 2016.
- Siamansouri M, Mozaffari S, Alikhani F. **Bacteriocins and lactic acid bacteria**. **Journal Biotechnology Today's World 2**: p. 227-234, 2013.

Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., Ribeiro, S. C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**. Vol. 9, p. 1-15, 2018.

Silva, T. M. S.; Piazzentin, A. C. M.; Mendonça, C. M. N.; Converti, A.; Bogsan, C. S. B.; Mora, D.; Oliveira, R. P. S. Buffalo milk increases viability and resistance of probiotic bacteria in dairy beverages under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Dairy Science**. Vol.103, n.9, 2020.

Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. desafios - Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins. Vol. 4, p. 15-31, 2017.

Silva, J. G. **Identificação molecular de Bactérias Ácido Láticas e propriedades probióticas in vitro de Lactbacillus spp. Isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2016.

Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E. et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbiology Cell Fact**. Vol. 16, p. 55, 2017.

Strack, L. **Atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por bactérias ácido láticas vis fermentação submersa usando subprodutos da agroindústria**. Dissertação Universidade de Passo Fundo, 2021.

Svetoslav D. T., Leon M. T. D. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Vol. 31, p. 323-329, 2004.

Tagliazucchi, D., Martini, S. and Solieri, L. **Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food**. Fermentation 5. Vol. 96, p. 1-34, 2019.

Trentin, M. M., Malfatti, L. H., Becker, A. F., Monteiro, L. K., Canonica, L. R., Marco, I., Schittler, L. The essential oil of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and peptide synthesized by *Lactococcus lactis* as antimicrobial agents against *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Health Review**. Vol 3, p. 3, 2020.

Turner, M. S., Bansal, N., Lo, R., Ho, T. T. V. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Control**. Vol. 85, p. 472-483, 2018.

Verma, S. K., Sood, S. K. Saini, K. S. Pediocin PA-1 containing fermented cheese whey reduces total viable count of raw buffalo (*Bubalis bubalus*) milk. **LWT - Food Science and Technology**, Vol. 83, p. 193-200, 2017.

Vieira, C. P., Cabral, B. R. C. C., Lima, V. M. F., Paschoalin, K. C., Leandro, C. A. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MRS47, a potential probiotic strain isolated from kefir grains, increases cis-9, trans-11-CLA and PUFA contents in fermented milk. **Journal of Functional Foods**. Vol. 31, p. 172-178, 2017.

Vitola, H. R. S., Gandra, E. Á., Frazzon, A. P. G., Dannenberg, G. S., Motta, A. S. Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango. **Revista Brasileira de Biociências**. Vol. 16, p. 1, 2018.

Yang, E., Fan, L., Yan, J. **Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria**. *AMB Express*. Vol. 8, p. 10, 2018.

Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., & Sahin, S. **The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk**. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. Vol. 7, p. 22–25, 2016.

Zocche F., Bastos, C. P., France, R. C. Comparison between of the methods for extracting DNA from *Staphylococcus aureus* in fresh mine type cheese. *Alimentaria*. Vol. 43, p. 110-116, 2010.