



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Danielle Oliveira Borges

Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55
em creme fermentado

São José do Rio Preto
2017

Danielle Oliveira Borges

Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55
em creme fermentado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna

Co - Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sabrina Neves Casarotti

São José do Rio Preto
2017

Danielle Oliveira Borges

Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55
em creme fermentado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Aline Teodoro de Paula
UNITRI – Uberlândia

São José do Rio Preto
05 de outubro de 2017

Borges, Danielle Oliveira.

Efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado / Danielle Oliveira Borges. -- São José do Rio Preto, 2017

113 f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna.

Co-orientador: Sabrina Neves

Casarotti

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bacteriocinas. 2. Bactérias. 3. Leuconostoc. 4. Laticínios. 5. Fermentados. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 637.146

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Joeni e Edson e à minha avó Jerônima por toda a ajuda e apoio durante esta etapa tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo e me mostrar sua presença dia após dia desde que comecei meu curso de Mestrado, me abençoando e dando força em todos os momentos em que pensei que não conseguiria.

À minha avó Jerônima, meu pai Edson e minha mãe Joeni, pela ajuda financeira no início tão difícil. Muito obrigada por acreditarem em mim.

À Stefany Cruz, pela força e companhia (inclusive nos feriados no laboratório) em grande parte desta jornada, obrigada.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, pela oportunidade, paciência, confiança e incentivo. Obrigada por tudo, sempre!

À Profa. Dra. Sabrina Neves Casarotti, pelos ensinamentos tão importantes no desenvolvimento do meu trabalho e pela co-orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, pela ajuda cedendo espaço no seu laboratório para a execução deste trabalho e ao Ricardo Aurélio pela colaboração e disposição em ajudar sempre.

À Profa. Dra. Cristina Bogdan e sua aluna Mariana Mitiko Matsuo, pela ajuda com a análise de ácidos graxos.

Ao Diego Alves Monteiro, pela ajuda nas análises cromatográficas dos ácidos orgânicos.

Às companheiras do Laboratório de Leite e Derivados, Vivian, Carol Liane, Bruna e Taís, pela enorme ajuda sempre que precisei, e à minha amiga Francesca Lobato pela amizade, companheirismo e força sempre.

À Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio estrutural no desenvolvimento de grande parte deste trabalho e à UNESP pelo apoio institucional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIACÕES.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	16
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
OBJETIVOS	16
CAPÍTULO I	17
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 Produção de creme fermentado.....	18
1.2 Bactérias acidoláticas e produção de biocompostos.....	20
1.2.1 <i>Leuconostoc</i> sp.....	21
1.2.2 Bacteriocinas	23
1.3 Lipídeos no creme e formação de ácido linoleico conjugado (CLA).....	26
1.4 Atividade antioxidante	28
1.5 Metabolismo do citrato e formação de compostos aromáticos.....	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Materiais.....	31
2.1.1 Creme de leite.....	31
2.1.2 Culturas	31
2.2 Métodos	31
2.2.1 Reativação das cepas e desenvolvimento dos experimentos.....	31
2.2.2 Produção do creme fermentado.....	33
2.2.3 Viabilidade das cepas	34

2.2.4 Caracterização físico-química do creme fermentado	35
2.2.5 Capacidade de sequestro de radicais livres	35
2.2.6 Análise de ácidos orgânicos	36
2.2.7 Análise estatística dos resultados.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1 Produção de creme fermentado: tempo de fermentação e curva de pH.....	38
3.2 Viabilidade das culturas	39
3.3 Caracterização físico-química do creme fermentado	42
3.4 Capacidade de sequestro de radicais livres (CSRL)	45
3.5 Produção de ácidos orgânicos	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO II	74
ABSTRACT	75
1 INTRODUCTION.....	76
2 MATERIAL AND METHODS	79
2.1 Dairy cream.....	79
2.2 Cultures.....	79
2.3 Production of fermented cream	80
2.4 Chemical composition of fermented cream	80
2.5 Fatty acids and conjugated linoleic acid (CLA) extraction and analyses	81
2.6 Microbiology analyses.....	82
2.7 Statistical analysis.....	82
3. RESULTS AND DISCUSSION	82
3.1 Chemical composition of fermented cream	82
3.2 Microorganisms viability - bacterial concentrations during storage of sour cream	90
3.3. Fatty acids profile of cream and fermented cream	82

3.4. Bioactive unsaturated fatty acids contents of fermented cream	87
4. Conclusions.....	91
Acknowledgments	92
References.....	93
CONCLUSÃO GERAL	102
ANEXO 1.....	102
ANEXO 2.....	106
ANEXO 3.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas bacteriocinas produzidas por BAL.	24
Tabela 2 - Matriz de ensaios e culturas usadas em cada tratamento.....	34
Tabela 3 - Meios de cultura e condições de cultivo para análise de viabilidade das culturas em creme fermentado.	34
Tabela 4 - Parâmetros de acidificação das amostras de creme fermentado.	38
Tabela 5 - População média (log UFC/mL) dos micro-organismos em amostras de creme fermentado durante a estocagem refrigerada (Temperatura ≤ 5 °C).....	41
Tabela 6 - Caracterização físico-química das amostras de creme de leite fermentado.	43
Tabela 7 - Teor de acidez (°Dornic) e valor de pH das amostras de creme de leite fermentado.	44
Tabela 8 - Capacidade de sequestro de radicais livres (%) de creme de leite fermentado obtidas pelo método DPPH [•] e ABTS ⁺ , durante a estocagem refrigerada.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias catabólicas das bactérias lácticas.	20
Figura 2 - Metabolismo do citrato em <i>Lactococcus</i> sp. e <i>Leuconostoc</i> sp.....	30
Figura 3 - Etapas de execução dos experimentos.	32
Figura 4 - Curvas de acidificação de creme fermentado até pH 4,5.....	39
Figura 5 - Ácidos orgânicos (mg/mL) nas amostras de creme de leite fermentado durante a estocagem refrigerada: A) Pirúvico, B) Láctico, C) Fórmico, D) Acético.	50

LISTA DE ABREVIATÓES

AA: atividade antioxidante

AE: aerobiose

AG: Ácidos graxos

ATP: Adenosina trifosfato

BAL: Bactérias acidoláticas

BHI: Brain Heart Infusion

CLA: Sigla em inglês pra Ácido Linoleico Conjugado (Conjugated Linoleic Acid)

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CSRL: Capacidade de sequestro de radicais livres

LEB: Listeria Enrichment Broth

mL: mililitro

MRS: de Man, Rogosa e Sharpe

PCA: Plate Count Agar

ROS: substâncias reativas de oxigênio

UFC: Unidades formadoras de colônias

UHT: ultra high temperature

RESUMO

As bactérias acidoláticas (BAL) são bastante utilizadas em processos fermentativos na indústria de laticínios, porém algumas delas agem não somente como fermentadoras, com a produção de ácidos orgânicos a partir dos carboidratos presentes, mas também podem produzir substâncias que colaboram para a segurança microbiológica do produto fermentado ou compostos benéficos à saúde. Em estudos *in vitro* anteriores, foi constatado que *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 apresenta potencial probiótico e ação bacteriostática sobre bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Neste trabalho foi avaliado o efeito de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado, em co-cultura com outras BAL, e estudar as características físico-químicas e microbiológicas do creme, além de avaliar a capacidade de bioconservação pela produção de bacteriocinas, ácidos orgânicos e propriedade funcional pela produção de ácido linoleico conjugado (CLA) e pela atividade antioxidante por inibição de radicais livres. Foi utilizado creme de leite UHT homogeneizado padronizado em 20% de gordura e fermentado conforme quatro tratamentos: T1 - cultura mista de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*; T2 - cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; e T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. As BAL foram inoculadas (7 log UFC/mL) no creme e a viabilidade dos microorganismos foi avaliada semanalmente durante um período de 28 dias. O creme fermentado apresentou características físico-químicas típicas para o produto, e o tempo de fermentação foi maior nos tratamentos T3 e T4. Foi observada ação de bacteriocinas sobre *Listeria monocytogenes* quando presente em baixa concentração ($\leq 10^2$ UFC/mL). A atividade antioxidante das amostras contendo *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi significativamente maior que dos demais tratamentos, assim como a quantidade de ácidos láctico e acético. Houve efeito de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 na conversão de CLA. Tais resultados demonstram o potencial promissor de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias acidoláticas; Creme fermentado; *Leuconostoc mesenteroides*; Ácido linoleico conjugado; Bacteriocinas.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in fermentation processes in the dairy industry, however some of them act not only as starters, with the production of organic acids from the carbohydrates, but they can also produce substances that contribute to the microbiological safety of the fermented product or produce health beneficial compounds. In previous *in vitro* studies, it was found that *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 presents probiotic potential and bacteriostatic action on pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. In this study it was evaluated the effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 in fermented cream, in co-cultivation with other BAL, and to study the physicochemical and microbiological characteristics of the cream, besides evaluating the capacity of bioconservation by the production of bacteriocins, organic acids and functional property by the production of conjugated linoleic acid (CLA) and antioxidant activity through the inhibition of free radicals. UHT milk cream standardized at 20% fat was fermented according to four treatments: T1 - Mixed culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, T2 - Mixed culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, T3 - Mixed culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, and T4 - Mixed culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. LAB (7 log CFU/mL) were inoculated into the cream and the viability of the microorganisms was evaluated weekly for a period of 28 days. The fermented cream presented typical physicochemical characteristics for the product, and the fermentation time was higher in T3 and T4 treatments. There was a bacteriocin action against *Listeria monocytogenes* when in low population ($\leq 10^2$ CFU/mL). The antioxidant activity of samples containing *Ln. mesenteroides* was significantly higher than the other treatments, as well as the lactic and acetic acid contents. There was an effect of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 on the CLA conversion. These results demonstrate promising potential of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 for the development of functional food.

KEY-WORDS: Lactic acid bacteria; Fermented cream; *Leuconostoc mesenteroides*;
Conjugated linoleic acid; Bacteriocins.

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi organizado em dois capítulos para a melhor distribuição e entendimento dos assuntos abordados. O Capítulo I consiste da dissertação propriamente dita contendo a Revisão Bibliográfica, Objetivos, Materiais e Métodos e Resultados, contendo dados da produção do creme fermentado, caracterização físico-química, viabilidade das culturas, atividade antioxidante e produção de ácidos orgânicos.

O Capítulo II foi redigido na forma de artigo científico e será submetido à publicação em periódico internacional classificado pelo Qualis da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos da CAPES.

No final do trabalho foram apresentados anexos com dados não mostrados no texto.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A fermentação de produtos lácteos por bactérias acidoláticas (BAL) é uma das formas mais antigas e eficientes de conservação de alimentos por processamento não-térmico (KONGO, 2013). Além da produção de ácidos orgânicos (lático, acético, fórmico, entre outros), as BAL também são utilizadas para a conservação de alimentos pela produção de substâncias antimicrobianas, tais como peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas, e para produção de compostos bioativos que apresentem efeitos benéficos na saúde. A utilização de bacteriocinas como bioconservantes em alimentos é eficaz no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002; REIS et al., 2012).

Diversos estudos têm demonstrado a produção de bacteriocinas por várias espécies de BAL, tal como *Lactobacillus (Lb.) sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Leuconostoc (Ln) lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, entre outras (GONG; MENG; WANG, 2010; MASUDA et al., 2011; JERÔNIMO-CENEVIVA, 2013; KONGO, 2013; ASKOUL; GORRAH; AL-AMIR, 2014; PAULA et al., 2014; FARINHA, 2016; SANTOS, 2016; FANEGAS et al., 2017), no entanto, são poucos os trabalhos que avaliam a produção de bacteriocinas em matrizes alimentícias (NASCIMENTO, 2008; VIEIRA, 2011; ARQUÉS et al., 2015).

Por outro lado, certas bacteriocinas, adicionadas aos alimentos fermentados ou produzidas por alguma cepa de BAL, podem eliminar não apenas as bactérias deteriorantes ou patogênicas, mas também bactérias responsáveis pelo desenvolvimento de características sensoriais próprias dos alimentos, reduzindo a qualidade do produto (MASUDA et al., 2011).

Diversos fatores podem afetar a atividade das bacteriocinas nos alimentos, pode ocorrer interação com os componentes dos alimentos, precipitação, inativação ou distribuição desigual de moléculas de bacteriocina na matriz alimentar (GALVÉZ et al., 2007; DELGADO et al., 2007).

Bromberg et al. (2006) relataram a redução da atividade da nisina (bacteriocina produzida principalmente por *Lactococcus lactis*) por influência da fração gordurosa de carne bovina. Compostos antimicrobianos de origem vegetal,

como o óleo assencial de cravos da Índia também teve sua eficácia afetada pelo alto teor de gordura de alguns alimentos (BARBOSA, 2010). Em vista disso, é de crucial importância testar a produção de bacteriocinas e sua ação bioconservante diretamente na matriz alimentícia.

Em estudos *in vitro* anteriores, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi isolado e identificado a partir do sequenciamento genético (SILVA, 2010) e apresentou ação bacteriostática sobre bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (PAULA et al., 2014), além de potencial probiótico (PAULA et al., 2015a).

Na literatura, existem também estudos sobre o potencial de *Ln. mesenteroides* na conversão de ácido linoleico em ácido linoleico conjugado, um isômero de ácido graxo com propriedades bioativas (EL-SALAM et al., 2010; MACOUZET; LEE; ROBERT, 2010; GUTIÉRREZ, 2016; LASCANO et al., 2016; RENES et al., 2017; VIEIRA et al., 2017), com ação na redução da gordura corporal, na prevenção de doenças cardiovasculares e do câncer, modulando as respostas imunológicas do corpo e melhorando a massa óssea (DILZER; PARK, 2012).

Considerando estes resultados promissores apresentados por *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, e o potencial de sua aplicação em produtos fermentados, este trabalho poderá contribuir com informações sobre sua ação em creme fermentado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em co-cultura com *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* nas características físico-químicas e funcionais de creme fermentado contendo 20% de gordura.

CAPÍTULO I

- i. Produzir e avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do creme fermentado com *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55;
- ii. Avaliar o efeito de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 na bioconservação do produto pela produção de bacteriocinas;
- iii. Avaliar a influência de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 na atividade antioxidante e no perfil de ácidos orgânicos do produto.

CAPÍTULO II

- I. Avaliar o efeito de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 na bioconservação do produto pela produção de bacteriocinas;
- II. Avaliar o perfil de ácidos graxos (AG) e teor de ácido linoleico conjugado nas amostras de creme fermentado.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Produção de creme fermentado

O creme é resultado da concentração de gordura do leite por centrifugação e padronização com leite integral ou desnatado, até que se obtenha a porcentagem desejada de gordura. A tecnologia básica de obtenção é relativamente simples, sendo as etapas de desnate e padronização comum a todos os tipos de creme. A homogeneização e outras operações posteriores ao desnate irão resultar em cremes com diferentes propriedades (VERNAM; SUTHERLAND, 2001).

O creme fermentado ou *sour cream* é produzido pela fermentação de creme de leite padronizado, homogeneizado e termicamente tratado, inoculado com bactérias fermentadoras, resultando em produtos com agradável sabor ácido, aroma amanteigado, com maior rendimento e menor risco de contaminação após o tratamento térmico, quando comparado ao creme de leite tradicional (YILMAZ-ERSAN, 2013). O produto não pode ultrapassar acidez total de 50 °D, e deve apresentar, no mínimo, 10% de gordura (BRASIL, 1996a). A maior parte dos cremes integrais fermentados fabricados industrialmente no Brasil apresenta teor de gordura entre 20 e 25%.

A homogeneização visa reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura, prevenindo a separação de fases do creme. A pressão de homogeneização aplicada é adaptada de acordo com o conteúdo de gordura do creme, onde pressões mais baixas são usadas para maiores teores de gordura. Usa-se 15-20 MPa para cremes com 10-12% de gordura, 12-17 MPa para 18% e 3-5 MPa para cremes com 38% de gordura. Esta homogeneização é frequentemente realizada a 60-70 °C, podendo ser realizada em um ou dois estágios. Após esta etapa, o creme é aquecido a 90 °C durante 5 min. para inativação enzimática e destruição de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, e depois resfriado a aproximadamente 20 °C, temperatura na qual deve ser inoculada a cultura láctica (TAMIME, 2006).

Para a fermentação, geralmente são utilizadas culturas compostas por *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovariante

diacetylactis e *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*. Os dois últimos micro-organismos são os principais formadores do aroma do produto (ROBINSON, 2005).

Usa-se cultura láctea em iguais proporções para cada espécie com contagem inicial de aproximadamente 7,0 log unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (YILMAZ-ERSAN, 2013). O tempo de fermentação varia de 18-20 horas ou até que a acidez atinja 0,8 g de ácido por 100 g de amostra (ROBINSON, 2005).

O desenvolvimento do sabor é controlado pelo valor de pH, não apenas em termos da quantidade de ácido láctico produzido, mas pela influência que este parâmetro exerce na biossíntese de diacetil. Em pH acima de 5,4, a enzima acetolactato sintetase é inibida, inibindo assim a produção de acetolactato, um precursor de diacetil (COGAN; HILL, 1993). Abaixo desse limiar, o citrato é convertido em acetoína, que pode então ser oxidado para diacetil. O pH final do creme pode variar de 5,3 para variedades de cremes mais leves e até 4,5 para sabores mais acentuados. Após atingir o pH final, o produto é resfriado a ≤ 10 °C, ponto no qual o metabolismo das culturas será praticamente paralisado (ROBINSON, 2005).

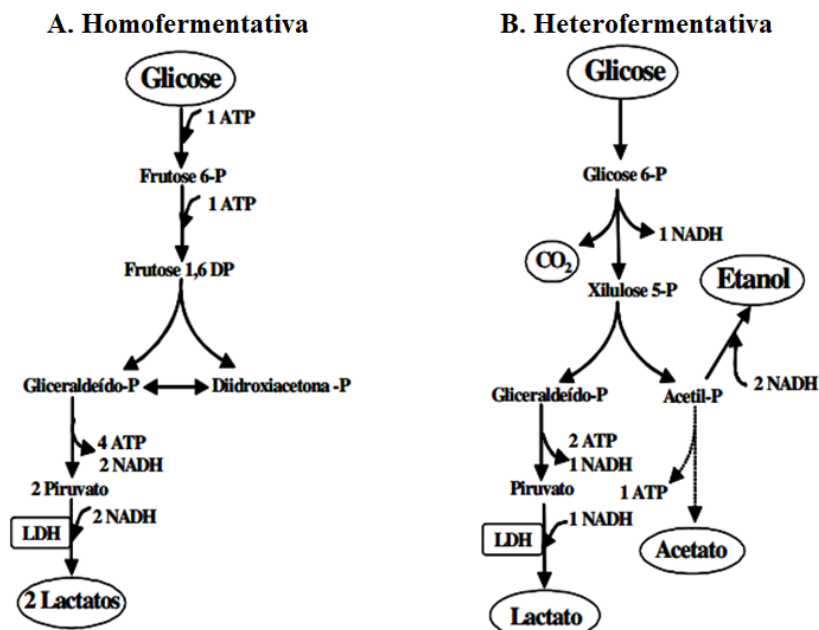
Durante o armazenamento, a viscosidade do creme aumenta, devido à floculação progressiva dos glóbulos de gordura e pela consolidação da estrutura pelo acúmulo gradual das micelas de caseína na superfície desses glóbulos, atuando como ponte de ligação entre eles. Este aumento de viscosidade durante o armazenamento depende da pressão de homogeneização, do conteúdo de gordura e do tratamento térmico aplicado ao creme (VERNAM; SUTHERLAND, 2001).

Diferentes regiões de coleta e produção do creme também afetam sua composição, especialmente quanto à composição de ácidos graxos (AG). Rutkowska et al. (2015) avaliaram a composição de AG de creme de leite de diferentes regiões da Polônia durante dois anos e identificaram diferentes teores de CLA, ácido vacênico, AG de cadeias longas e curtas, dependendo da região de origem das amostras.

1.2 Bactérias acidoláticas e produção de biocompostos

A inabilidade das BAL em sintetizar componentes da cadeia respiratória, como citocromos e porfirinas, impede a geração de ATP por via aeróbia e, portanto, a obtenção de energia das BAL ocorre por meio de fermentação de carboidratos, que produz como principal produto final o ácido láctico (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Elas fermentam a glicose por vias diferentes e podem ser divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas, de acordo com o produto final obtido. Na homofermentação, o ácido láctico é o único produto final do metabolismo da glicose pela via glicolítica, na qual o ácido pirúvico é convertido em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase (Figura 1). Entretanto, na heterofermentação, quantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono e etanol ou acetato são formados a partir da glicose pela via oxidativa das pentoses (LOPES, 2008).

Figura 1 - Vias catabólicas das bactérias lácticas.



Fonte: Adaptado de Lopes (2008).

Outro aspecto importante da fermentação por BAL é sua contribuição no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos alimentos fermentados. Isto acontece porque as BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, modificando gradativamente a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados (QUEIROZ, 2008).

Muitas BAL também possuem a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos, sendo o mais importante deles as bacteriocinas (BIRRI et al., 2013). Adicionalmente, as BAL podem produzir enzimas que hidrolisam as proteínas do leite em peptídeos. Alguns destes peptídeos são biologicamente ativos e podem ter ação antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (SAH et al., 2015).

1.2.1 *Leuconostoc* sp.

O gênero *Leuconostoc* inclui bactérias Gram-positivas, com células em formato geralmente ovoide, anaeróbica facultativa, com resistência intrínseca à vancomicina, catalase negativa, heterofermentativa e produtora de dextrana. Estas bactérias são encontradas em plantas, a partir de onde são disseminadas a vários outros *habitats*, incluindo o leite cru (JEON et al., 2017).

Atualmente, o gênero *Leuconostoc* tem 19 espécies ou subespécies com identidade validada cientificamente. Entre elas, a espécie *Leuconostoc mesenteroides* com quatro subspécies, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Ln. mesenteroides* subsp. *suionicum*, tem importante papel na produção de vários produtos fermentados (JEON et al., 2017).

O metabolismo da lactose e do citrato por *Leuconostoc* sp. contribui para as propriedades sensoriais do soro de leite, creme de leite e queijos frescos (KOT et al., 2014). Por esse motivo, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. lactis*, e *Ln. pseudomesenteroides* são utilizados principalmente como culturas produtoras de aroma em produtos lácteos fermentados (ALI et al., 2013).

Além da contribuição de espécies de *Leuconostoc* para as características sensoriais dos produtos fermentados, estudos têm demonstrado sua ação bacteriocinogênica.

Parada et al. (2007), Arakawa et al. (2016) e Shi, Wand e Wang (2016) estudaram as propriedades bioconservadoras de *Ln. mesenteroides* na inibição de *Listeria (L.) monocytogenes*. *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi isolado de queijo muçarela de búfala e identificado a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA (SILVA, 2010). Em estudo *in vitro*, Jerônimo-Ceneviva (2013) e Paula et al. (2014) observaram que as cepas *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 e SJRP58 produziram substâncias bacteriostáticas capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *Aeromonas* sp., *Aeromonas sobria*, *Citrobacter* sp., *Citrobacter freudii*, *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli*. Esta característica é de grande interesse para a indústria, pois sua aplicação pode contribuir para a segurança dos alimentos. Ainda, as bacteriocinas produzidas não inibiram cepas dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, demonstrando potencial para aplicação tecnológica em alimentos, pois não inibem micro-organismos normalmente utilizados na fabricação de alimentos fermentados e de produtos lácteos (JERÔNIMO-CENEVIVA, 2013).

Ln. mesenteroides subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi caracterizada quanto à capacidade de produção de CO₂ a partir do uso da glicose, habilidade de crescimento em diferentes temperaturas (15, 30 e 45 °C), pH (4,5; 7,0 e 9,6) e concentração de NaCl (4,5; 6 e 10%), além da capacidade de assimilar citrato. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram potencial para aplicação em produtos fermentados (SILVA, 2010).

Além disso, em testes *in vitro*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi caracterizada como produtora de bacteriocina (PAULA et al., 2014) e com potencial probiótico, pela simulação da sobrevivência ao trato gastrointestinal, bons resultados de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade, além de adesão a células epiteliais (PAULA et al., 2015a).

Além da produção de bacteriocinas, *Ln. mesenteroides* também apresenta a capacidade de produção de CLA. El-Salam et al. (2010) analisaram leite desnatado acrescido de óleo de gergelim lipolisado fermentado por várias BAL e observaram

que o produto fermentado por *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* apresentou a maior produção de CLA em meio contendo 0,6% do óleo de gergelim.

Desta forma, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi considerada uma cepa com bom potencial para desenvolvimento de produtos lácteos fermentados probióticos.

1.2.2 Bacteriocinas

As bacteriocinas são pequenos peptídeos ou proteínas, termoestáveis e biologicamente ativas, com ação inibitória contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILLS; ROSS, 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (restrito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (GÁLVEZ et al., 2008).

Dentre as substâncias produzidas por bactérias lácticas, as bacteriocinas são de grande interesse pela indústria de alimentos por não provocarem alterações sensoriais e possuírem atividade específica contra determinados patógenos (HAJIKHANI; BEYATLI; ASLIM, 2007), porém não são todas as espécies e linhagens de bactérias lácticas que podem produzi-las. Na Tabela 1 estão listados alguns exemplos importantes de bacteriocinas e as linhagens de BAL produtoras.

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas em substituição às tradicionais culturas iniciadoras; pela adição de culturas bacteriocinogênicas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO, 2007).

Bacteriocinas produzidas por BAL podem ser agrupadas em quatro grandes grupos, com base em sua estrutura, como, por exemplo, similaridades entre a sequência primária, propriedades físico-químicas, sequência-líder e número de peptídeos que constituem sua atividade; podem ser também agrupadas, principalmente, com base em seu modo de ação. As bacteriocinas de BAL já foram agrupadas de diversas maneiras, porém ainda há falta de consenso quanto à sua classificação (OGAKI; FURLANETO; FURLANETO-MAIA, 2015).

Tabela 1 - Algumas bacteriocinas produzidas por BAL.

Bacteriocina	Organismo produtor	Organismo alvo	Referência
Nisina A, Lactococina 972	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Listeria innocua</i> 86/26, <i>Staphylococcus aureus</i> CECT 86T	Alegría et al. (2010)
Leucociclicina Q	<i>Ln.</i> <i>mesenteroides</i> TK41401	<i>Bacillus coagulans</i>	Masuda et al. (2011)
Bacteriocina Lp6SH	<i>Lb. plantarum</i> Lp6SH	<i>Listeria</i> sp., <i>Streptococcus</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Pseudomonas</i> e <i>Klebsiella</i> sp.	Marie (2012)
Carnobacteriocina X	<i>Carnobacterium</i> <i>maltaromaticum</i> C2	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Tulini et al. (2014)
Pediocina	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> 213M0	<i>Listeria</i> sp.	Arakawa et al. (2016)
Leucocina K7	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> K7	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Shi et al. (2016)

Ao longo dos anos, as bacteriocinas receberam diversas classificações (KLAENHAMMER, 1993; COTTER; HILL; ROSS, 2005, HENG et al., 2007; ZOUHIR; HAMMAMI; HAMIDA, 2010). Considerando-se as inúmeras divergências com as classificações das bacteriocinas, uma outra classificação foi proposta por Cotter,

Ross e Hill (2013). Essa classificação separa as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas das que são produzidas por Gram-negativas. As bacteriocinas de Gram-positivas são divididas em apenas duas Classes, I e II, em que a designação de bacteriocinas correspondem apenas aos pequenos peptídeos ribossomalmente sintetizados, não incluindo grandes proteínas antimicrobianas. Segundo esta classificação, a Classe I corresponde às bacteriocinas que sofrem extensas modificações pós-traducionais e a Classe II engloba as bacteriocinas que não sofrem tais modificações e também as que sofrem poucas modificações. As bacteriocinas de bactérias Gram-negativas pertencem a dois grupos distintos, um de pequenos peptídeos, como as microcinas, e um segundo de grandes peptídeos, como as colicinas.

Algumas linhagens de bactérias lácticas que produzem substâncias que inibem o crescimento de *Listeria* sp. foram identificadas (ANDRADE et al., 2014; SILVA, 2014; DUARTE et al., 2016), incluindo *Ln. mesenteroides* (XIRAPHI et al., 2008; ARAKAWA et al., 2015; SHI et al., 2016; FANEGAS et al., 2017), sendo que em alguns casos foi possível identificar e determinar diretamente as estruturas primárias das bacteriocinas, como helveticina J (JOERGER; KLAENHAMMER, 1990), lactocina S (MORTVEDT et al., 1991), lactococina A (HOLO; NES, 1991), leucocina A UAL-187 (HASTINGS et al., 1991), leucocina A-TA33a (PAPATHANASOPOULOS et al., 1997), mesentericina B105 e mesentericina Y105 (HÉCHARD et al., 1992; ABRIOUEL et al., 2008; PAULA et al., 2014) e lactacina F (MOON, 2015). Muitas dessas bacteriocinas possuem atividade inibitória contra *L. monocytogenes*.

Diferentes linhagens de *Ln. mesenteroides*, isoladas de diferentes matrizes e ambientes, foram capazes de produzir as mesmas bacteriocinas: mesentericina B105 e mesentericina Y105, leucocina A-TA33a e leucocina A UAL-187, no entanto, a produção de diferentes bacteriocinas também foi observada para diferentes linhagens de *Ln. mesenteroides*. Diferentes bacteriocinas produzidas pelas mesmas linhagens podem ajudar estes micro-organismos a atacar outros alvos e serem usadas em diferentes matrizes alimentares (PAULA et al., 2015b).

Quanto à eficácia das bacteriocinas em alimentos, alguns fatores devem ser considerados, como as condições de desestabilização da atividade biológica dos peptídeos (bacteriocinas), tais como a ação de proteases e processos oxidativos,

ligação aos componentes do alimento, como partículas lipídicas e outras proteínas, inativação pela presença de aditivos, baixa solubilidade e distribuição irregular no alimento, ação do pH na estabilidade e atividade da bacteriocina (VIEIRA, 2011).

Outros fatores também podem comprometer a produção de bacteriocinas por cepas, que em outras condições seriam capazes de produzi-las. Alguns desses fatores são: o antagonismo por outros micro-organismos presentes nos alimentos, tal como *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, utilizada em diversos produtos fermentados, a predominância de micro-organismos resistentes, a perda espontânea ou a redução na capacidade de produção de bacteriocinas na matriz alimentícia, a presença de enzimas proteolíticas não específicas, a oxidação, a presença de metais pesados, a agitação excessiva, o congelamento-descongelamento, a interação com componentes apolares e polares, e o efeito do pH do meio (PARADA et al., 2007).

1.3 Lipídeos no creme e formação de ácido linoleico conjugado (CLA)

Os lipídeos do leite representam uma boa fonte de vitaminas lipossolúveis, tais como retinol, α -tocoferol e β -caroteno, bem como os ácidos graxos (AG) essenciais. Sua estabilidade oxidativa e sensorial também contribui com a qualidade de produtos lácteos, além de ter um efeito positivo na saúde humana (YILMAZ-ERSAN, 2013).

Durante o processo de fermentação, além da formação de ácidos e compostos aromáticos, também pode haver alterações nos lipídeos do leite, com a formação de compostos bioativos, derivados dos AG. Os AG de cadeia saturada podem chegar a 60% do total presente nos lipídeos do leite (LOCK; BAUMAN, 2011), característica pouco interessante do ponto de vista nutricional, sendo que os lipídeos mais desejáveis nos alimentos são os do tipo poli-insaturados. Entre os AG poli-insaturados mais importantes do ponto de vista nutricional presentes no leite, destacam-se o ácido linoleico ω -6, o ácido α -linolênico ω -3 e os isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA).

CLA é um termo genérico utilizado para caracterizar os isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico que possuem ligações duplas conjugadas, ou seja, as duas ligações duplas são separadas por uma ligação simples, e abrange 28 isômeros, entre os quais alguns deles possuem comprovada atividade biológica. Estes isômeros exercem numerosos benefícios à saúde, sendo que os principais incluem: (i) capacidade de reduzir a incidência do desenvolvimento de tumores cancerígenos; (ii) reduzir o colesterol plasmático e a gordura corporal; (iii) reduzir a possibilidade de agregar plaquetas; (iv) apresenta efeitos no nível glicêmico; (v) propriedades anti-inflamatórias; e (vi) melhoria do sistema imunológico (ALVES et al., 2011; ARORA; SINGH; SHARMA, 2013; CALDER, 2013; GUARDAMAGNA et al., 2014; PATTERSON et al., 2014). Os benefícios à saúde do CLA têm sido atribuídos principalmente a dois de seus isômeros: *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12* (BHATTACHARYA et al., 2006).

A origem do isômero CLA *cis-9 trans-11* ainda não está bem definida, mas provavelmente, assim como o CLA *trans-10 cis-12*, ele seja originado da bio-hidrogenação incompleta dos AG poli-insaturados presentes na dieta dos ruminantes (RIBEIRO, 2013).

Ainda, diversas pesquisas mostraram que algumas espécies de BAL são capazes de converter eficientemente o ácido linoleico em ácido linoleico conjugado (YILMAZ- ERSAN, 2013). Florence et al. (2012) relataram maior conteúdo de CLA em leite orgânico fermentado com BAL em comparação com leite convencional. Por outro lado, de acordo com Yilmaz-Ersan (2013), não foram detectados elevados níveis de CLA em iogurtes e queijos, possivelmente pelo uso de espécies de bactérias lácticas não produtoras deste isômero. Uma das vias mais acessíveis para aumento dos níveis de CLA do leite e produtos lácteos é a fabricação de produtos fermentados com culturas selecionadas que apresentem um elevado potencial para a conversão a partir do ácido linoleico.

Ekinci et al. (2008) utilizaram cepas de BAL em fermentação de creme de leite para determinar os efeitos de uso de bactérias probióticas e de óleos vegetais sobre o perfil de AG. No estudo foram utilizadas cepas de *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium thoenii (jensenii)*, *Lb. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lb. bulgaricus* e mistura de culturas (*Lb. acidophilus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus* e *Lb.*

bulgaricus). A amostra fermentada por *B. bifidum* sem fortificação com óleo vegetal foi a que resultou em maiores teores de CLA (0,73 mg de CLA/g de lipídeo).

Yilmaz-Ersan (2013) caracterizou os tipos de AG presentes em creme fermentado pelas BAL probióticas, *B. lactis* HN019, *Lb. acidophilus* NCFM e *Lb. rhamnosus* HN001, resultando na formação de lipídeos biologicamente ativos durante a fermentação. No entanto, o teor de CLA não foi significativamente aumentado pela adição das culturas probióticas.

El-Salam et al. (2010) testaram algumas linhagens probióticas quanto à capacidade de converter ácido linoleico (LA) em CLA em leite fermentado e obtiveram as maiores taxas de conversão para as amostras fermentadas com *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

1.4 Atividade antioxidante

A formação de radicais livres, como o radical superóxido e o ânion hidroxila, é uma consequência inevitável em organismos aeróbios durante a respiração. Estes radicais são muito instáveis e reagem rapidamente com outros grupos ou substâncias no corpo, levando a prejuízos na célula ou tecido. Há fortes evidências de que as substâncias reativas de oxigênio (ROS) e os radicais livres desempenham um papel importante no aparecimento de muitas doenças degenerativas como câncer, aterosclerose e diabetes (RAMESH et al., 2012).

O corpo tem seu próprio sistema de defesa contra ROS baseado em enzimas antioxidantes e compostos antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular. Porém, estes sistemas de defesa não são suficientemente eficazes para prevenir totalmente os danos causados pelos radicais livres. Portanto, alimentos contendo antioxidantes podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (VIRTANEN et al., 2007). Assim, é desejável o desenvolvimento de alimentos que possam contribuir para reduzir este dano oxidativo, pela oferta de produtos com atividade antioxidante, tais como os produtos lácteos fermentados.

De acordo com Virtanen et al. (2007), as BAL são capazes de degradar o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, além de contribuírem para a formação de peptídeos com atividade antioxidante a partir da proteólise. As propriedades antioxidantes dos peptídeos derivados da fermentação do leite, auxiliam na

eliminação de ROS e na inibição da oxidação induzida por radicais livres de macromoléculas biológicas, como lípideos, proteínas e ácidos desoxirribonucleicos (DNA). Tais peptídeos atuam doando elétrons aos radicais livres ou sequestrando metais, que participariam do processo de oxidação (CRAFT et al., 2012).

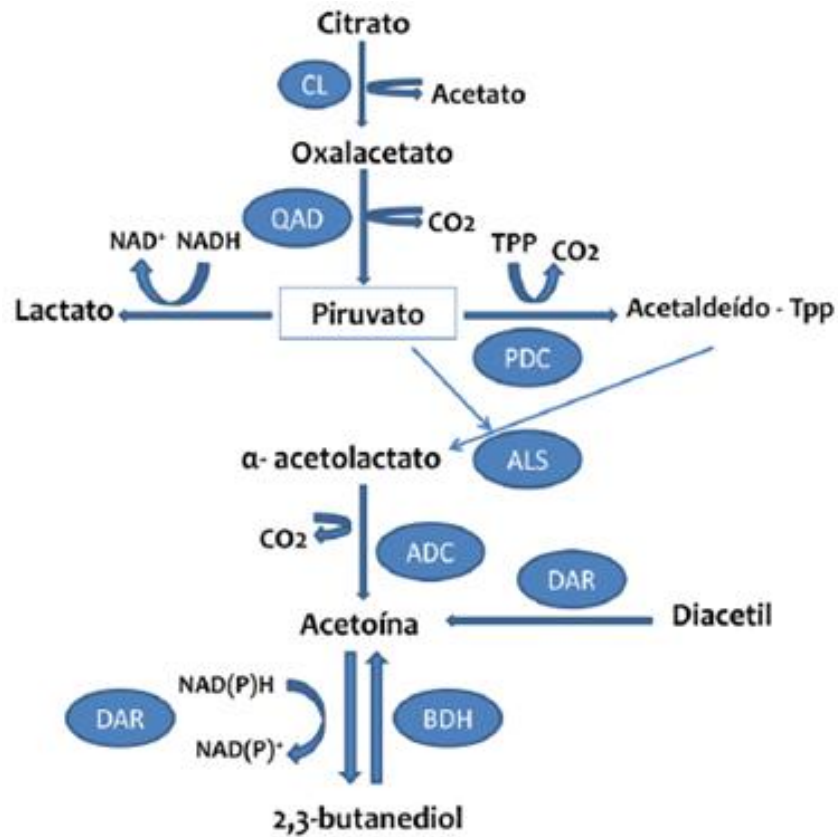
1.5 Metabolismo do citrato e formação de compostos aromáticos

Uma cultura contendo bactérias produtoras de aroma, como *Ln. mesenteroides* e *Lc. lactis*, irá produzir substâncias, tais como diacetil, ácidos acético e propiônico, cetonas, aldeídos, álcoois, ésteres de ácidos, bem como o dióxido de carbono. No leite há uma quantidade considerável de citrato (130-160 mg/100 mL), sendo que tais culturas têm a capacidade de metabolizá-lo. Este processo requer o seu transporte, a sua conversão a oxaloacetato, e depois a piruvato e a liberação de CO₂, (Figura 2) (MAYO; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK; FERNÁNDEZ, 2010).

A fermentação do citrato pelas BAL leva à produção de compostos de quatro carbonos (C4), como diacetil, acetoína e butanodiol, que possuem propriedades aromáticas e são importantes para o aroma típico de muitos produtos lácteos. As culturas *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (*Lc. diacetylactis*), *Leuconostoc* spp. e *Weissella* spp. são usadas na fermentação industrial como produtores de diacetil em produtos lácteos (MAYO; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK; FERNÁNDEZ, 2010).

Uma vez no interior da célula, o citrato é convertido em acetato e oxaloacetato, em uma reação catalisada pela enzima citrato liase (CL). Esta é um complexo enzimático, que catalisa a conversão do citrato em um processo de multi-reação. A produção e purificação desta enzima por *Ln. mesenteroides* (BEKAL et al., 1998) e *Lc. diacetylactis* CRL264 (MARTÍN et al., 2004) estão disponíveis na literatura.

Figura 2 - Metabolismo do citrato em *Lactococcus* sp. e *Leuconostoc* sp.



CL, citrato liase; QAD, oxaloacetato descarboxilase; PDC, piruvato descarboxilase; ALS, α-acetolactato sintase; ADC, α-acetolactato decarboxilase; DAR, acetoína diacetilo reductase; BDH, 2,3-butanediol desidrogenase, TPP, tiamina pirofosfato (Adaptado de MAYO; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK; FERNÁNDEZ, 2010).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Creme de leite

Foi utilizado creme de leite homogenizado UHT (tratado a ultra alta temperatura) com 20% de gordura (Camponesa, Lagoa da Prata, MG) de um mesmo lote, disponível no comércio local.

2.1.2 Culturas

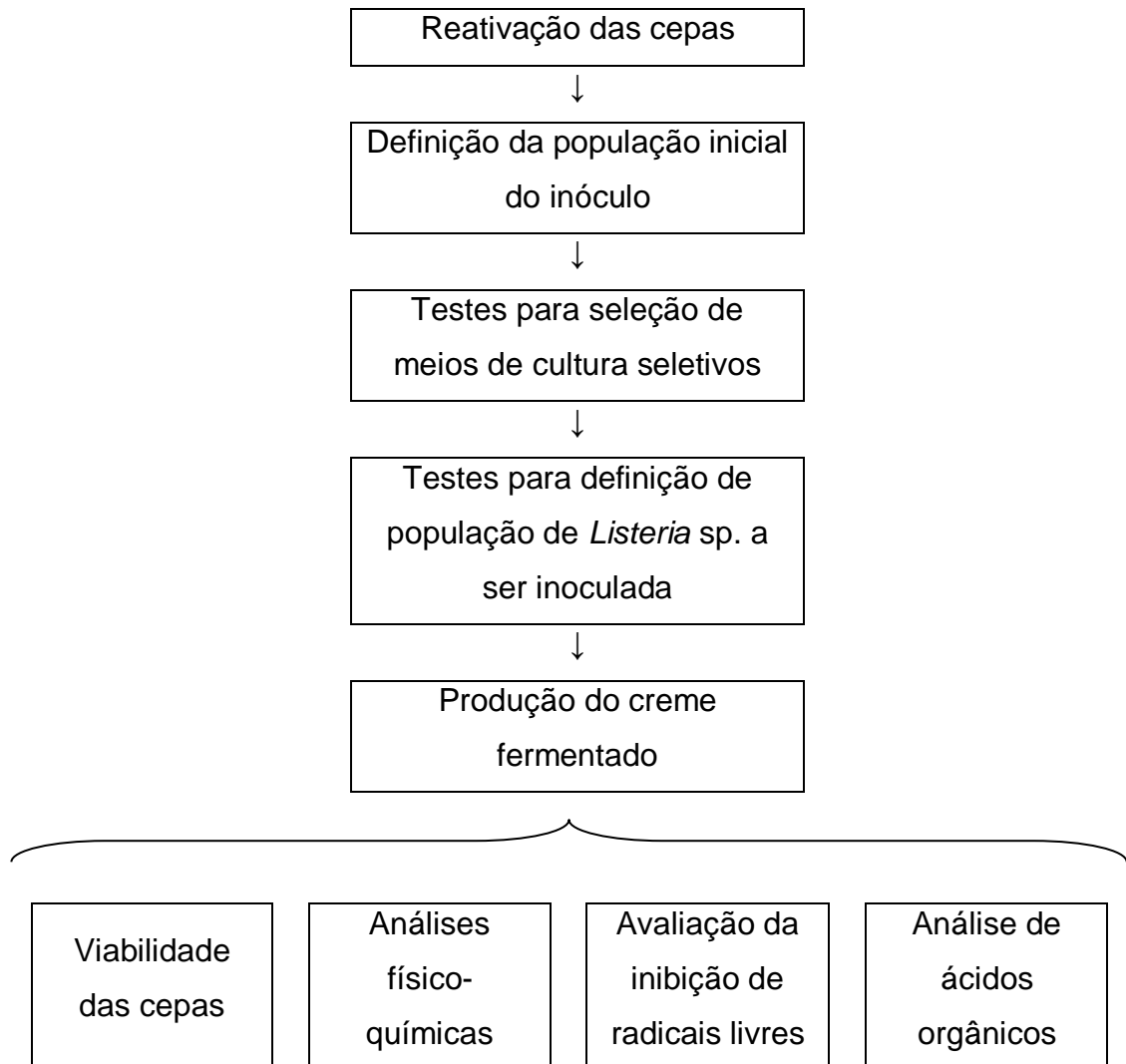
- ✓ Cultura de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 pertencente ao banco de culturas do Laboratório de Leite e Derivados do IBILCE/UNESP, previamente isolada do processamento de muçarela de búfala, criopreservada em glicerol a - 80 °C e previamente caracterizada
- ✓ Cultura comercial liofilizada mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50 A (DSM Food Specialities, New South Wales, Austrália) refrigerada a - 4 °C
- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (American Type Culture Collection, Manassas, EUA) criopreservada em glicerol a - 80 °C.

2.2 Métodos

2.2.1 Reativação das cepas e desenvolvimento dos experimentos

Em testes preliminares foram realizados: definição da população inicial do inóculo (Anexo 1), seleção de meios de cultura seletivos (Anexo 2), e definição da população de *Listeria* sp. a ser inoculada (Anexo 3). As etapas envolvidas na execução dos experimentos, incluindo os testes preliminares, estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Etapas de execução dos experimentos.



As culturas de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 e de *Lc. lactis* foram reativadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, 25 °C/48 h) e *L. monocytogenes* em caldo Brain Heart Infusion (BHI, 37 °C/48 h). Foi feita a diluição seriada e determinação da população de micro-organismos de cada cultura pura presente no inóculo usando ágar MRS (25 °C/48 h) para *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 e *Lc. lactis* e ágar BHI (37 °C/48 h) para *L. monocytogenes*.

Para contagem isolada da população de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e de *L. monocytogenes* no creme fermentado, em co-cultura com *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, em cada tratamento foram utilizados os meios MRS + 30 µg/mL de vancomicina (MRSV) para contagem de *Leuconostoc*;

Listeria Enrichment Broth (LEB) + 1,5% Plate Count Agar (PCA) para enumeração de *Listeria monocytogenes* e MRS Agar para contagem total de micro-organismos. A estimativa de *Lactococcus* sp. foi dada pela diferença entre a contagem total em MRS – contagem em MRSV – contagem em LEB+PCA. A contagem indireta (por diferença) foi executada conforme Leroi, Joffraud e Chevalier (2000).

Para testar o efeito bacteriogênico de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado foi estabelecida a população de 10^2 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* como agente contaminante.

2.2.2 Produção do creme fermentado

Os tratamentos e as culturas usadas na fermentação estão apresentados na Tabela 2. O tratamento T1 foi fermentado somente com a cultura comercial mista de *Lactococcus* spp. (controle) e os tratamentos T2 e T3 foram usados para avaliar o comportamento de *L. monocytogenes* ATCC 15313 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em co-cultura com *Lactococcus* sp. O tratamento T4 foi usado para avaliar a produção de bactericinas por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em co-cultura com *Lactococcus* sp. na presença de 10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313 (bactéria indicadora de contaminação) em creme fermentado. Em cada tratamento foram inoculadas $7,0 \log$ UFC/mL de bactérias lácticas em dois litros de creme de leite UHT para a fermentação.

As amostras foram mantidas em temperatura controlada de 25 °C, considerada ideal para melhor desenvolvimento de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 e produção de bacteriocinas (Paula et al., 2015b), até atingir pH aproximado de 4,5.

Uma amostra de 100 mL de cada tratamento foi separada para a medição aséptica do pH em intervalos de 30 em 30 min., utilizando um pHmêtro (HANNA modelo HI 3220, São Paulo, Brasil), introduzido na amostra.

Tabela 2 - Matriz de ensaios e culturas usadas em cada tratamento.

Culturas	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	+	+	+	+
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> SJRP55			+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313		+		+

Após a fermentação, o creme de leite foi resfriado em banho de água e gelo para que cessasse a atividade metabólica das BAL, seguido do acondicionamento em potes plásticos estéreis. Após a fermentação, todas as amostras foram armazenadas a ≤ 5 °C para simular a estocagem refrigerada.

2.2.3 Viabilidade das cepas

As culturas utilizadas para fermentação do creme em todos os tratamentos foram quantificadas logo no final da fermentação e semanalmente no produto (Tabela 3), durante 28 dias de estocagem refrigerada, conforme utilizado para avaliação de viabilidade de micro-organismos de teste (RAMOS, 2010; HIRAI, 2017).

Tabela 3 - Meios de cultura e condições de cultivo para análise de viabilidade das culturas em creme fermentado.

Micro-organismo	Meios de cultura	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação (h)	Atmosfera
<i>Listeria sp.</i>	Ágar PCA + LEB	37	72	AE
<i>Lactococcus sp.</i>	MRS	25	72	AE
<i>Leuconostoc sp.</i>	MRS + VA	25	72	AE

PCA – Plate Count Agar; LEB – Listeria Enrichment Broth; MRS – De Man, Rogosa e Sharp; VA – 30 µg/mL de vancomicina; AE – aerobiose

O tempo de incubação de 72 horas para as três culturas, inclusive as BAL, baseou-se em testes executados anteriormente e referências da literatura (PEREIRA e GOMÉZ, 2007; RODRIGUES, et al., 2014).

2.2.4 Caracterização físico-química do creme fermentado

As análises físico-químicas foram realizadas aos 28 dias de armazenamento refrigerada e incluíram: lipídeos pelo método Gerber (AOAC, 2005 - método 2000.18), teor de proteína pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005 - método 991.20), teor de umidade por secagem em estufa a vácuo (IAL, 2008 - método 012/IV), e teor de cinzas por incineração em mufla a 550 °C (AOAC, 2005 - método 935.42). O cálculo de carboidratos totais foi estimado pela diferença entre 100% e as frações em porcentagem de umidade, lipídeos, proteínas e cinzas.

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) com medidor de pH digital de bancada HI 3220 (HANNA) e da acidez titulável por titulação utilizando solução de NaOH 0,1 N e indicador fenolftaleína (AOAC, 2005 - método 947.05) foram realizadas, semanalmente, durante o período de armazenamento refrigerado a ≤ 5 °C até 28 dias. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.2.5 Capacidade de sequestro de radicais livres

A avaliação da capacidade de sequestro do radical DPPH[•] foi realizada em triplicata, semanalmente, utilizando método espectrofotométrico descrito por Farvin et al. (2010), com modificações. Uma alíquota de 2 mL da amostra diluída em água destilada até concentração final de 1 mg/mL foi misturada com 2 mL de solução alcoólica de DPPH[•] 0,1 mM. A mistura foi deixada em repouso, no escuro, por 30 minutos e logo após foi feita a leitura da absorbância a 517 nm. Para o branco, utilizou-se 2 mL de água destilada com 2 mL de solução DPPH[•]. A capacidade antioxidante foi calculada de acordo com a equação 1:

$$AA(\%) = \frac{(A_b - A_{am})}{A_b} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que AA (%) é a atividade antioxidante ou capacidade de eliminar radicais livres, Ab é a absorbância do branco e Aam é a absorbância da amostra.

A avaliação da capacidade de sequestro do radical ABTS⁺ foi avaliada pelo método de descoloração descrito por Li et al. (2013), com modificações.

Quantidades iguais de solução ABTS⁺ (14 mM) e persulfato de potássio (4,88 mM) foram homogeneizadas e posteriormente deixadas em repouso à temperatura ambiente e no escuro por 12 horas. Após este período, 10 µL de amostra foram adicionados a 200 µL de solução ABTS⁺, homogeneizados e deixados em repouso por 5 minutos para posterior leitura de absorbância a 734 nm. A capacidade de absorção de radicais foi calculada utilizando a equação 1.

2.2.6 Análise de ácidos orgânicos

As análises de ácidos orgânicos (pirúvico, láctico, fórmico e acético) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia descrita por Donkor et al. (2007). Para esta análise, as amostras de creme de leite foram diluídas até concentração final de 3% de lipídeos em água destilada. Três mililitros foram adicionados de 80 µL de ácido nítrico 15,5 M, e 1,0 mL de ácido sulfúrico 0,01 M, e centrifugados a 15.000 × g por 20 min a 4 °C usando uma centrífuga Eppendorf 5415R (Eppendorff, Hamburg, Germany) para a remoção das proteínas e fração gordurosa. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,20 µm (Millipore, Billerica, USA), e congelado para posterior análise de composição de ácidos orgânicos por HPLC.

A separação de ácidos orgânicos foi realizada utilizando cromatógrafo Perkin Elmer modelo Flexar, com bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. Foi utilizada coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,1 mm) (Biorad Life Science Group, Hercules, CA, EUA) mantida a temperatura de 65 °C. A eluição foi isocrática, com fluxo de 0,8 mL/min de ácido sulfúrico 0,01 M com detector ajustado em 210 nm de comprimento de onda. A quantificação de ácidos orgânicos foi realizada a partir das curvas-padrão obtidas utilizando soluções de concentrações pré-determinadas (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Foram realizadas extrações e injeções em triplicada para cada amostra.

2.2.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e a comparação destes resultados analisados estatisticamente, utilizando Análise de Variância (ANOVA) de fator único, separadamente, para verificar o efeito dos tratamentos (tipo de cultura inoculada) e do tempo de armazenamento do produto. Foi executado um delineamento inteiramente casualizado, e teste de comparação múltipla de Tukey, considerando um nível de significância de 5%. Não foi realizada análise de interação entre os resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de creme fermentado: tempo de fermentação e curva de pH

Os menores e os maiores tempos de fermentação ocorreram nos tratamentos T1 e T3, respectivamente (Tabela 4, Figura 4). Nos tratamentos T2 e T4 em que o creme de leite foi inoculado com *L. monocytogenes* ATCC 15313, o tempo de fermentação foi intermediário aos demais para atingir o pH final.

Tabela 4 - Parâmetros de acidificação das amostras de creme fermentado.

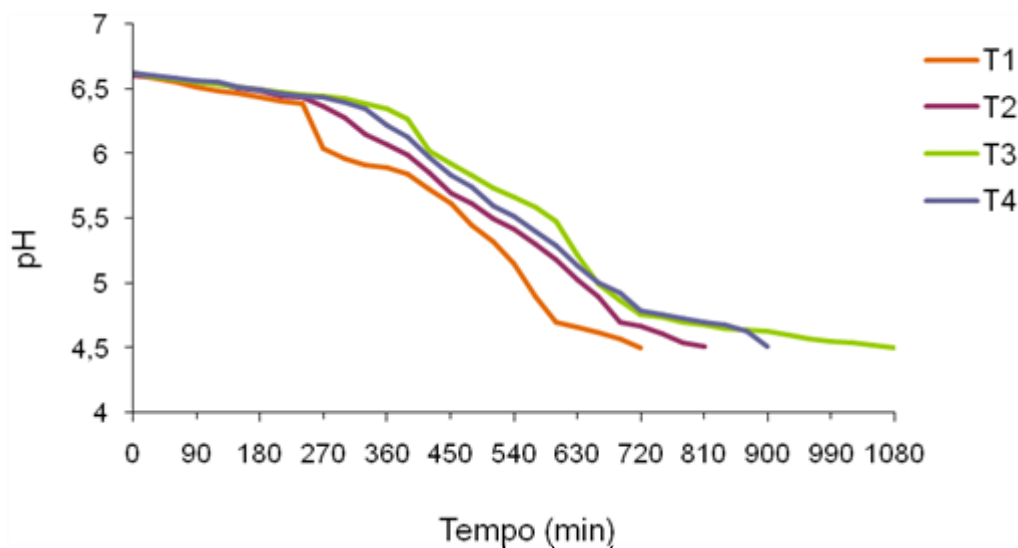
Tratamentos	Culturas	pH inicial	T _{pH 4,5} (min)
T1	Lc	6,61	720
T2	Lc + Lm	6,60	810
T3	Lc + Ln	6,62	1050
T4	Lc + Ln + Lm	6,62	900

T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. T_{pH4,5} : Tempo (min) necessário para atingir pH 4,5.

Linhagens de *Leuconostoc* sp. crescem de forma sinérgica com *Lactococcus* sp., pois para a metabolização do citrato, o *Leuconostoc* necessita de um pH entre 4,5 - 5,3, produzindo diacetil e acetoína apenas em pH ácido, o que torna necessário, em primeiro momento, a produção de ácido por *Lc. lactis* (HEMME, 2004). Porém, estudos mostram que a competição por nutrientes proteicos neste tipo de cultura mista pode prejudicar ligeiramente o crescimento da população de *Leuconostoc* sp., deixando-o em desvantagem (FOUCAUD; HEMME; DESMAZEAUD, 2001; GENDROT et al., 2002).

O tempo de fermentação foi maior para os tratamentos T3 e T4, nos quais *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foi utilizado, provavelmente devido à competição por nutrientes entre os micro-organismos fermentadores. Kihal et al. (2007) estudaram a cinética de fermentação de *Lc. lactis* e *Leuconostoc* sp. em leite desnatado isoladamente e em co-cultura, e verificaram que, em cultura mista, a acidificação final pode ser substancialmente reduzida devido à conversão parcial da lactose em etanol e CO₂ pela cultura de *Leuconostoc* sp.

Figura 4 - Curvas de acidificação de creme fermentado até pH 4,5.



T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313.

3.2 Viabilidade das culturas

A população de *Lactococcus* spp. reduziu durante a estocagem em todos os tratamentos, porém a maior redução ocorreu em T2 (3,6 log UFC/mL), tratamento com *Lactococcus* spp. e *Listeria monocytogenes*. Nesta mesma amostra, a população de *Listeria* aumentou 0,3 log UFC/mL entre o primeiro e o 28º dia de armazenagem (Tabela 5).

O creme fermentado ficou estocado em temperatura de 4-5 °C, que favorece o desenvolvimento de *Listeria* sp. em detrimento das BAL mesofílicas, como *Leuconostoc mesenteroides*. Em função disso, é necessário um cuidado maior relacionado à manipulação de alimentos para evitar a contaminação e desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

A população de *Ln. mesenteroides* também foi reduzida durante a estocagem nos tratamentos em que foi inoculada (T3 e T4), porém, mesmo com uma redução de 2,5 log UFC/mL em T4, *Ln. mesenteroides* ainda conseguiu exercer ação bacteriogênica sobre *L. monocytogenes*, reduzindo a população do patógenos de $2,1 \pm 0,01$ para $1,4 \pm 0,05$ log UFC/mL, ou seja, a cepa de *Ln. mesenteroides* subsp *mesenteroides* SJRP55 reduziu em 33,33% a população de *L. monocytogenes* em 28 dias. Este resultado confirma que a atividade das bacteriocinas é favorecida em baixo pH (PAULA, 2015). Baixos valores de pH baixo podem facilitar a permeabilidade através da parede celular e aumentar a solubilidade da bacteriocina, facilitando a sua difusão (SILVA, 2011).

Em estudo realizado por Shi, Wand e Wang (2016), *Ln. mesenteroides* K7 produtora da bacteriocina leucocina K7 exibiu atividade contra *L. monocytogenes*. Oitenta UA/mL da bacteriocina inibiu o crescimento de *L. monocytogenes* em populações iniciais aproximadas de 2,3-3,9 UFC/mL em leite, e quando esta bacteriocina foi combinada com glicina (5 mg/mL), eliminou completamente as células viáveis do patógeno ao longo de 7 dias a 4 °C.

Os compostos antimicrobianos produzidos por *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 foram caracterizados e purificados por Paula et al. (2014). Os autores observaram que o sobrenadante livre de células produzido pela cepa inibiu o crescimento de *Listeria* spp. *in vitro*, porém não inibiu *Lactobacillus* spp. Além disso, atestaram que a substância antimicrobiana é estável em altas temperaturas (100 °C/2 h e 121 °C/20 min) e baixos valores de pH (2 - 4). A temperatura ideal para a produção de peptídeos ativos foi de 25 °C. A espectrometria de massa e análise de aminoácidos mostraram que as bacteriocinas produzidas por *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 eram idênticas às mesentericina Y105 e B105.

Os peptídeos antimicrobianos geralmente são pequenos, com carga positiva e molécula anfipática. Sua composição de aminoácidos, e o comprimento da cadeia

variam de 6 a 100 resíduos de aminoácidos. O mecanismo molecular e a via de permeabilidade da membrana podem variar para diferentes peptídeos de acordo com diferentes parâmetros, tais como: a sequência de aminoácidos, a composição da membrana lipídica, e a concentração de peptídeo (SILVA, 2014).

Tabela 5 - População média (log UFC/mL) dos micro-organismos em amostras de creme fermentado durante a estocagem refrigerada (Temperatura ≤ 5 °C).

Trat.	Dias	<i>Lactococcus</i> sp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
T1	1	9,4 \pm 0,02 ^{Aa}	-	-
	7	9,1 \pm 0,07 ^{Ba}	-	-
	14	6,9 \pm 0,04 ^{Cb}	-	-
	21	6,4 \pm 0,10 ^{Db}	-	-
	28	6,2 \pm 0,08 ^{Da}	-	-
T2	1	9,2 \pm 0,05 ^{Aab}	-	2,2 \pm 0,03 ^{Ba}
	7	8,9 \pm 0,04 ^{Bab}	-	2,5 \pm 0,03 ^{Aa}
	14	6,3 \pm 0,08 ^{Cc}	-	2,3 \pm 0,04 ^{Ba}
	21	6,3 \pm 0,06 ^{Cb}	-	2,5 \pm 0,03 ^{Aa}
	28	5,6 \pm 0,04 ^{Dc}	-	2,5 \pm 0,03 ^{Aa}
T3	1	9,1 \pm 0,06 ^{Ab}	8,8 \pm 0,03 ^{Aa}	-
	7	8,7 \pm 0,07 ^{Ab}	8,7 \pm 0,12 ^{Aa}	-
	14	7,6 \pm 0,05 ^{Ba}	7,3 \pm 0,06 ^{Bb}	-
	21	7,1 \pm 0,26 ^{Ca}	6,8 \pm 0,06 ^{Cb}	-
	28	6,0 \pm 0,06 ^{Dab}	6,4 \pm 0,11 ^{Da}	-
T4	1	9,0 \pm 0,05 ^{Ab}	8,7 \pm 0,03 ^{Aa}	2,1 \pm 0,01 ^{Aa}
	7	7,8 \pm 0,10 ^{Bc}	8,4 \pm 0,06 ^{Ba}	1,9 \pm 0,02 ^{ABb}
	14	7,4 \pm 0,10 ^{Ca}	7,6 \pm 0,05 ^{Ca}	1,7 \pm 0,16 ^{Bb}
	21	6,4 \pm 0,17 ^{Db}	7,5 \pm 0,03 ^{Ca}	1,7 \pm 0,02 ^{Bb}
	28	5,8 \pm 0,05 ^{Ebc}	6,2 \pm 0,12 ^{Da}	1,4 \pm 0,05 ^{Cb}

Resultados expressam as médias seguidas de desvio padrão (n = 2). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais no mesmo tratameto não diferem entre si durante os 28 dias de armazenagem. Médias seguidas de letras minúsculas no mesmo tempo de estocagem, não diferem com relação ao tratamento (cultura inoculada) pelo teste de Tuckey a 5%.

Avaliando a ação de substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* isoladas de kefir, Auad (2014) selecionou 12 cepas destes gêneros com capacidade inibitória frente à *L. monocytogenes* e constatou que *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 foi a cepa mais eficaz contra o desenvolvimento do patógeno testado.

Quanto ao nível de contaminação do alimento pelo micro-organismo alvo, se a contaminação inicial for muito elevada, a atividade da bacteriocina é restrita, não impedindo o desenvolvimento do micro-organismo (ANEXO 2). Porém há outras barreiras utilizadas para inibir o crescimento ou destruir os micro-organismos patógenos em alimentos, como o uso de tratamentos térmicos de pasteurização ou esterilização, adição de sais, controle do pH, controle higiênico-sanitário da matéria-prima e de todo o processo, assim como o uso de embalagens adequadas (COSTA, 2016).

Sabe-se que *Lactococcus lactis* produz nisina, uma bacteriocina bastante eficaz na inibição de *Listeria* spp. (BENKERROUM et al., 2000; ALEGRÍA et al., 2010; ARQUÉS et al., 2011; BALCIUNAS et al., 2013; ARQUÉS et al., 2015), porém existem características a serem observadas com relação à eficiência da ação desta bacteriocina, como ambiente inadequado para crescimento e/ou produção de bacteriocina, perda da habilidade da cepa em produzir bacteriocinas, antagonismo pela microbiota, desenvolvimento de organismos resistentes a bacteriocinas e formação de complexos não ativos entre as bacteriocinas e macromoléculas do alimento (FERREIRA, 2005).

No presente trabalho, não foi observado efeito inibitório de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* sobre *L. monocytogenes* ATCC 15313.

3.3 Caracterização físico-química do creme fermentado

O teor de umidade e lipídeos das amostras de creme fermentado não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$), entretanto houve diferença nos teores de proteínas, cinzas e carboidratos (Tabela 6).

A Portaria 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996b), que estabelece os padrões de qualidade e identidade para o

creme de leite, classifica o produto como creme de baixo teor ou leve ou semi creme quando atender a faixa de no mínimo 10,0% (m/m) e máximo 19,9% (m/m) de matéria gorda; quando o produto apresentar entre 20% e 49,9% de matéria gorda denomina-se apenas creme, e acima de 50,0% passa a ser considerado creme de alto teor de gordura. Portanto, o produto obtido nesta pesquisa é denominado de creme por conter 20,77 a 21,05 % de gordura.

Tabela 6 - Caracterização físico-química das amostras de creme de leite fermentado.

%	Tratamentos			
	T1	T2	T3	T4
Umidade	72,08 ± 0,30 ^a	70,66 ± 0,99 ^a	70,16 ± 1,01 ^a	70,90 ± 0,68 ^a
Lipídeos	21,05 ± 0,33 ^a	20,92 ± 0,13 ^a	21,00 ± 0,35 ^a	20,77 ± 0,15 ^a
Proteínas	3,41 ± 0,19 ^a	3,20 ± 0,08 ^{ab}	3,24 ± 0,08 ^{ab}	3,11 ± 0,01 ^b
Cinzas	0,89 ± 0,01 ^a	0,78 ± 0,01 ^c	0,86 ± 0,01 ^b	0,76 ± 0,01 ^c
Carboidratos	2,57 ± 0,15 ^b	4,44 ± 1,11 ^a	4,75 ± 0,76 ^a	4,46 ± 0,66 ^a

Carboidratos determinados por diferença. T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. Resultados expressam as médias seguidas de desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Apesar das diferenças no teor de proteínas, cinzas e carboidratos entre os tratamentos, estas variações são consideradas normais em processos industriais.

A produção de produtos lácteos fermentados depende da escolha correta de culturas iniciais com propriedades de acidificação específicas. As mudanças no pH como resultado do crescimento de BAL têm papel essencial para as características sensoriais e desempenham um papel importante na biosegurança do produto final (SILVA, 2015).

Tabela 7 - Teor de acidez (°Dornic) e valor de pH das amostras de creme de leite fermentado.

	Tempo de estocagem (dias)				
	1	7	14	21	28
Acidez					
T1	70,0 ± 0,04 ^{Ce}	72,3 ± 0,6 ^{Cd}	76,0 ± 1,0 ^{Dc}	85,8 ± 1,0 ^{Db}	94,7 ± 0,6 ^{Da}
T2	72,0 ± 0,03 ^{Be}	75,8 ± 1,0 ^{Bd}	78,5 ± 0,5 ^{Cc}	91,3 ± 1,2 ^{Cb}	102,7 ± 0,6 ^{Ca}
T3	73,0 ± 0,01 ^{Ad}	82,2 ± 0,3 ^{Ac}	83,3 ± 0,6 ^{Bc}	99,7 ± 0,6 ^{Bb}	112,5 ± 0,5 ^{Ba}
T4	73,0 ± 0,01 ^{Ae}	83,3 ± 1,2 ^{Ad}	89,3 ± 1,2 ^{Ac}	106,4 ± 1,9 ^{Ab}	116,3 ± 1,2 ^{Aa}
pH					
T1	4,50 ± 0,02 ^{Aa}	4,37 ± 0,01 ^{Cb}	4,30 ± 0,01 ^{Bc}	4,17 ± 0,01 ^{Cd}	4,04 ± 0,02 ^{Be}
T2	4,51 ± 0,01 ^{Aa}	4,45 ± 0,01 ^{Bb}	4,42 ± 0,01 ^{Ab}	4,33 ± 0,01 ^{Ac}	4,24 ± 0,02 ^{Ad}
T3	4,52 ± 0,02 ^{Aa}	4,50 ± 0,01 ^{Aa}	4,40 ± 0,03 ^{Ab}	4,25 ± 0,02 ^{Bc}	3,92 ± 0,02 ^{Cd}
T4	4,51 ± 0,03 ^{Aa}	4,46 ± 0,01 ^{Bb}	4,42 ± 0,02 ^{Ab}	4,34 ± 0,01 ^{Ac}	3,95 ± 0,03 ^{Cd}

T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. Resultados expressam as médias seguidas de desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey a 5%.

Os valores de acidez foram maiores nos tratamentos T3 e T4, nos quais *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 heterofermentativo foi utilizado. Estes resultados mostram que o teor de acidez do creme fermentado não é diretamente proporcional à velocidade de acidificação durante a fermentação. Embora esta grandeza não tenha sido calculada, o tempo para atingir pH 4,5 foi menor nos tratamentos T1 e T2, o que não significou maiores quantidades de ácido láctico no produto final. Durante a estocagem refrigerada, houve aumento dos teores de acidez e redução do valor de pH para todas as amostras (Tabela 7). Tais resultados são normais para produtos fermentados, uma vez que pode haver atividade das BAL sobre os carboidratos residuais, mesmo que em velocidade reduzida pela baixa temperatura.

Apesar de terem necessitado de mais tempo para atingir o pH final durante a fermentação, os tratamentos T3 e T4, que contêm *Ln. mesenteroides*, apresentaram maior acidez e menor pH na pós-acidificação, independentemente do tempo de estocagem. De acordo com Ardo, Pedersen e Vogensen (2016), os *Leuconostoc* não crescem tão bem quanto *Lactococcus* em leite, mas continuam a crescer em pH baixo e se desenvolver posteriormente à acidificação, principalmente. Além disso, as características fisiológicas de *L. monocytogenes* permitem sua colonização, sobrevivência nas condições de armazenamento e proliferação em alimentos, sustentando seu crescimento inclusive em baixas temperaturas (BUCHANAN et al., 2017), com produção de ácidos, contribuindo para o aumento de acidez das amostras.

A acidez de produtos refrigerados pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial de acidez, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas (DUALDO et al., 2010). Sabe-se que *L. monocytogenes* pode se multiplicar inclusive em temperatura de refrigeração (0 °C - 4 °C), dependendo da cepa e do meio em que ela se encontra, porém a temperatura ótima para seu desenvolvimento está entre 30 - 37°C (BILLE; ROCOURT, 2003; BORTOLUSSI, 2008).

3.4 Capacidade de sequestro de radicais livres (CSRL)

A capacidade de sequestro de radicais livres pode ser demonstrada por vários mecanismos e reações, por isso é necessário avaliá-la por diferentes métodos. Neste estudo, avaliou-se a capacidade do creme fermentado em eliminar os radicais livres DPPH[•] e ABTS⁺.

O método do DPPH[•] vem sendo utilizado para avaliar a atividade sequestradora de compostos específicos pela rapidez e facilidade. A redução do radical estável DPPH[•] (2,2-difenil -1- picrilhidrazil) é monitorada pela diminuição da absorvância desse radical em 515 nm. O mecanismo DPPH[•] mede a capacidade do produto antioxidante em ceder elétrons ou hidrogênio ao radical livre. Seu sistema de reação envolve somente o radical e o antioxidante. Os ensaios utilizando-se o radical ABTS⁺ são baseados na habilidade dos antioxidantes em reduzir o ABTS⁺ a

ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional. Esta reação é monitorada pela diminuição da absorvância desse radical em 734 nm (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

Em geral, houve um aumento da CSRL até 14 ou 21 dias de estocagem, para ABTS⁺ e DPPH[•], respectivamente, seguida de declínio em todos os tratamentos, sendo que os tratamentos T3 e T4 tiveram as maiores médias de atividade antioxidante (AA) no final do período de estocagem em ambos os métodos realizados (Tabela 8). Como a metodologia ABTS utiliza a capacidade do antioxidante (neste caso, o creme fermentado) em quelar

A variação na capacidade de sequestro de radicais livres está relacionada com a composição de micro-organismos nas amostras. O tratamento T2 teve a maior redução na CSRL no final do período de estocagem, enquanto em T4 ocorreu a menor redução. Tais resultados demonstram que no tratamento T4, com a presença de *Ln. mesenteroides*, a produção de compostos (antioxidantes e antimicrobianos) além de evitar o crescimento de *Listeria*, também minimiza a redução da CSRL.

Listeria monocytogenes oxida a glicose pela via das pentoses-fosfato, convertendo glucose-6-fosfato em ribose-5-fosfato, com perda de uma molécula de CO₂ e geração de duas moléculas de NADPH que, por sua vez, é um forte agente antioxidante (EISENREICH et al., 2005; KILANCZYK et al., 2016).

Por outro lado, como já citado anteriormente, *Leuconostoc mesenteroides* possui atividade proteolítica, lipolítica, bem como a produção de exopolissacarídeos (polímeros que são produzidos como mecanismo de sobrevivência em condições de baixas temperaturas e variações de pH). Estas características são interessantes, pois a ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas, extra ou intracelular, pode gerar peptídeos e radicais peróxidos com atividade antioxidante (ASPRI et al., 2017).

O aumento da AA ao longo da estocagem se deve à liberação de enzimas pelos micro-organismos na matriz do alimento durante o armazenamento (LIMA et al., 2014). Além disso, os compostos bioativos produzidos durante a fermentação melhoram a qualidade sensorial e ajudam na conservação do produto (ALMEIDA, 2014). Esta AA em produtos lácteos fermentados por BAL foi mencionada no estudo de Balakrishnan e Agrawal (2014) e expressa de várias formas, dificultando a comparação de dados.

Embora a população de BAL tenha diminuído a cada semana, a CSRL aumentou até 14 ou 21 dias para ABTS⁺ e DPPH^{*}, respectivamente. Este fato pode ser devido à atividade proteolítica de endopeptidases que podem ser liberadas no processo natural de morte celular. Tais proteases liberam peptídeos bioativos que dependendo da estrutura, apresentam propriedades imunomodulatória, anti-hipertensiva, anti-carcinogênica, antialérgica, antioxidante, entre outras funções benéficas à saúde (CHOI et al., 2012; JOSHI; KOIJAM, 2014).

Como a cepa de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 apresentou capacidade de produzir protease extracelular em ágar leite, com formação de halo de hidrólise em torno da cepa inoculada (SILVA, 2015), pode ter havido aumento da AA por liberação de peptídeos antioxidantes.

Várias BAL são capazes de liberar peptídeos antioxidativos no processo de fermentação através da ação de uma série de peptidases distintas incluindo aminopeptidases, di-peptidases e tri-peptidases. Os peptídeos antioxidantes derivados do leite são compostos de cinco a onze aminoácidos hidrofóbicos, incluindo prolina, histidina, tirosina ou triptofano em sequência, que são obtidos da hidrólise das caseínas por enzimas proteolíticas. Eles podem funcionar eliminando ou impedindo a formação de radicais e também inibindo a peroxidação lipídica enzimática e não enzimática (MOHANTY et al., 2016).

A AA em creme de leite, além do efeito da fermentação, também pode ser devida à presença de vitamina E e carotenoides nos glóbulos de gordura, conhecidos agentes antioxidantes (LINDMARK-MANSSON, AKESSON, 2000; SEN; KHANNA; ROY, 2006; DEWETTINCK, 2008). Considerando os maiores valores de AA aos 21 dias a partir da fermentação, este seria o período ideal para consumo do produto.

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por BAL também pode resultar em aumento da atividade antioxidante (ZHANG et al., 2013; LI et al., 2014a; SHAO et al., 2014), apesar de não ter sido objeto do presente estudo. Entre as EPS produzidas por BAL estão as α -glucanas, compostas por resíduos de α -1,6 e α -1,3- ligados à molécula de glicose, produzidos por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (PHAM et al., 2000). O mecanismo da atividade sequestradora dos EPS pode ser devido à ligação de íons ao radical superóxido, terminando assim a reação em cadeia (LIN et al.,

2009). Moléculas de EPS podem quelar íons metálicos, tais como Fe^{2+} e Cu^{2+} , e inativá-los (LI; SHAH, 2014).

Tabela 8 - Capacidade de sequestro de radicais livres (%) de creme de leite fermentado obtidas pelo método DPPH[•] e ABTS⁺, durante a estocagem refrigerada.

Tratamento	Tempo de estocagem (dias)				
	1	7	14	21	28
DPPH[•]					
T1	28,33 ± 0,83 ^{Ec}	31,7 ± 0,5 ^{Dd}	50,31 ± 0,5 ^{Cd}	65,75 ± 0,42 ^{Ad}	57,36 ± 0,31 ^{Bc}
T2	33,19 ± 0,43 ^{Eb}	43,66 ± 0,4 ^{Cc}	59,20 ± 0,23 ^{Bc}	72,50 ± 0,31 ^{Ac}	39,11 ± 0,40 ^{Dd}
T3	72,85 ± 0,32 ^{Ea}	80,01 ± 0,3 ^{Ca}	82,43 ± 0,43 ^{Ba}	87,46 ± 0,42 ^{Aa}	74,26 ± 0,31 ^{Db}
T4	71,94 ± 0,32 ^{Ea}	75,31 ± 0,3 ^{Db}	79,11 ± 0,32 ^{Bb}	84,28 ± 0,23 ^{Ab}	76,14 ± 0,31 ^{Ca}
ABTS⁺					
T1	63,33 ± 1,03 ^{Dd}	110,53 ± 0,74 ^{Bd}	130,39 ± 0,89 ^{Ad}	80,31 ± 0,76 ^{Cd}	50,68 ± 1,06 ^{Ed}
T2	69,92 ± 1,75 ^{Dc}	160,21 ± 0,74 ^{Cc}	217,11 ± 1,00 ^{Ac}	190,03 ± 1,01 ^{Bc}	69,69 ± 0,45 ^{Dc}
T3	180,69 ± 1,15 ^{Da}	252,70 ± 2,06 ^{Ca}	281,13 ± 1,31 ^{Aa}	270,09 ± 0,73 ^{Ba}	181,52 ± 1,06 ^{Da}
T4	150,44 ± 0,87 ^{Db}	190,73 ± 1,48 ^{Cb}	231,11 ± 0,73 ^{Ab}	199,71 ± 0,76 ^{Bb}	120,80 ± 0,90 ^{Eb}

T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. Resultados expressam as médias seguidas de desvio padrão (n = 3). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna não se diferenciam pelo teste de Tuckey a 5% de significância.

Além dos EPS, peptídeos com várias atividades bioativas podem ser gerados durante a fermentação de leite com BAL, como peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE). De acordo com Pihlanto, Virtanen e Korhonen (2010), em experimentos com fermentação de leite, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. jensenii* e *Ln. mesenteroides* produziram intensa atividade inibitória de ACE, enquanto que cepas de *Lc. lactis* foram menos eficientes nesta inibição.

3.5 Produção de ácidos orgânicos

A produção dos ácidos orgânicos pirúvico, láctico, fórmico e acético foi avaliada nas amostras de creme de leite fermentado, durante o armazenamento (1 e 28 dias) (Figura 5 e ANEXO 3).

Durante o processo de fermentação e de estocagem do creme, os valores de pH foram progressivamente reduzidos, como consequência da produção de alguns ácidos orgânicos.

O teor de ácido pirúvico permaneceu praticamente contante em todos os tratamentos durante a armazenagem, porém com médias superiores no tratamento T3. Como o gênero *Lactococcus* é homofermentativo, usa a via glicolítica na conversão do ácido pirúvico em ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase (Figura 1). Com isso, tratamentos que possuem somente *Lactococcus* spp. como cepa fermentadora, possuem teores mais baixos de ácidos pirúvico e acético (Figura 5 A e D).

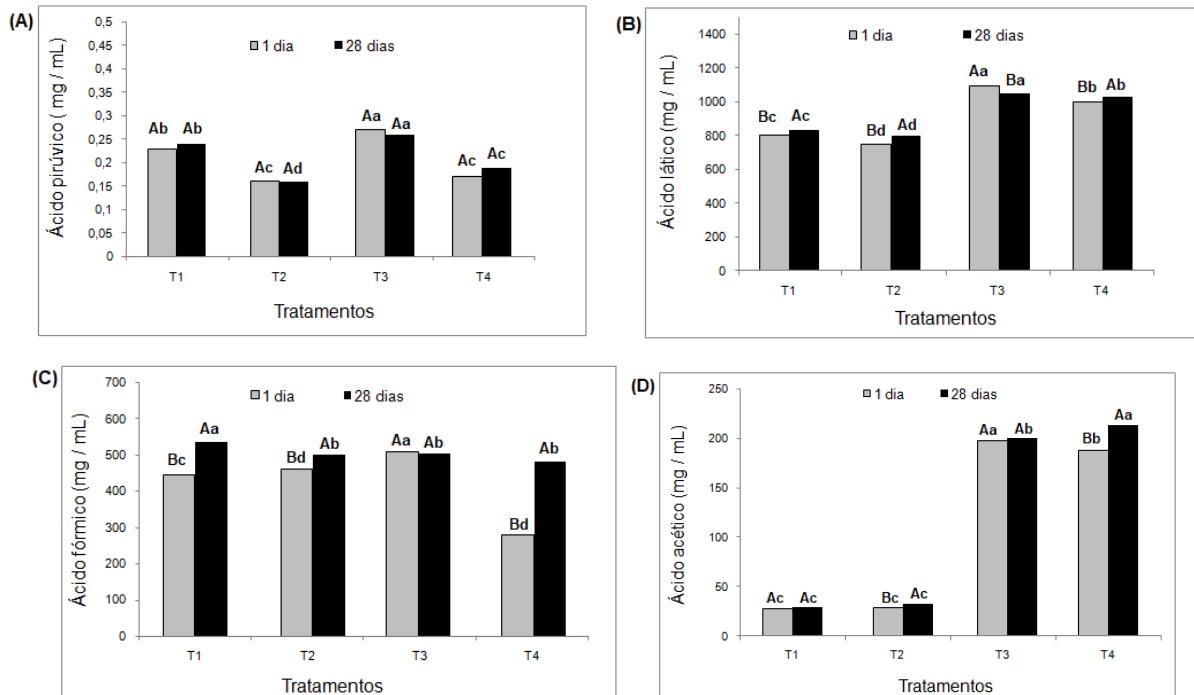
Em geral, as culturas do tratamento T3 produziram a maior quantidade de ácido láctico durante a fermentação (1 dia), porém houve redução ao final do período de estocagem, enquanto a amostra T4 apresentou aumento significativo deste ácido em sua matriz durante a estocagem. Apesar do maior tempo de fermentação (tempo para atingir pH 4,5), nos tratamentos T3 e T4 no final da fermentação e durante o período de 28 dias de estocagem, a quantidade de ácido láctico nestas amostras foi superior às amostras T1 e T2. Estes dados também estão coerentes com os resultados observados para acidez e pH das amostras (Tabela 7).

Com exceção do tratamento T3, nos demais tratamentos houve aumento significativo no teor de ácido fórmico durante a estocagem.

De acordo com Hemme e Foucaud-Scheunemann (2004), *Ln. mesenteroides* são amplamente utilizados na indústria de laticínios para a produção de compostos aromáticos e exopolissacarídeos. Como esperado para esta BAL, houve uma alta produção de ácido acético (201 e 214 mg/L, respectivamente em T3 e T4, ANEXO 3). Os valores de pH mais baixos de pós-acidificação para *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, combinados com o maior concentração de ácido láctico e acético é semelhante ao obtido por Silva (2015) para outras cepas de *Ln. mesenteroides*. Possivelmente, esses micro-organismos produziram ácido acético a partir do metabolismo do citrato (MAYO; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK; FERNÁNDEZ, 2010), uma vez que a habilidade de metabolizar citrato ou ácido

cítrico está presente em diversos gêneros de BAL, tal como *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (SILVA, 2015).

Figura 5 - Ácidos orgânicos (mg/mL) nas amostras de creme de leite fermentado durante a estocagem refrigerada: A) Pirúvico, B) Láctico, C) Fórmico, D) Acético.



T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. Letras maiúsculas iguais no mesmo tratamento e letras minúsculas iguais no mesmo dia de estocagem, não se diferenciam pelo teste de Tuckey a 5% de significância (n = 3).

Como uma BAL heterofermentativa, *Ln. mesenteroides* produz ácido acético que pode se acumular rapidamente (MOON et al., 2015) e há evidências que níveis mais baixos deste composto em queijos não afetaram a intensidade de aroma e nem a qualidade do produto. Em contrapartida, os altos índices de qualidade do aroma em queijos podem ser devidos a um melhor equilíbrio entre seus compostos voláteis ativos (ÁVILA et al., 2017).

Altas concentrações de ácido fórmico e acético produzidos por BAL também podem contribuir para a bioconservação do alimento, uma vez que estes ácidos

podem contribuir para a inibição de *Listeria* sp. em produtos lácteos (AFZAL et al., 2010).

4 CONCLUSÃO

O efeito de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado apresentou características típicas e promissoras: a cepa aumentou o tempo de fermentação, porém produziu maiores teores de ácidos orgânicos (pirúvico, láctico e acético) no produto final, produziu bacteriocinas com ação bacteriostática sobre *Listeria monocytogenes* quando presente em baixa concentração (até 10^2 UFC/mL), e o produto contendo *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 apresentou atividade antioxidante significativamente maior que dos demais tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIQUEL, H.; OMAR, N. B.; MOLINOS, A. C. LOPEZ, R. L.; JOSE GRANDE, M. MARTINEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CANAMERO, M. M. GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical 265 samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1-2, p. 38-49, 2008.

AFZAL, M. I.; JACQUET, T.; DELAUNAY, S.; BORGES, F.; MILLIERE, J. B. REVOL-JUNELLES, A. M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C. *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 573-579, 2010.

ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; BALTASAR, M. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1- 2, p. 61- 66, 2010.

ALI, Y.; KOT, W.; ATAMER, Z.; HINRICHS, J.; VOGENSEN, F. K.; HELLER, K. J.; NEVE, H. Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3628-3636, 2013.

ALMEIDA, A. R. **Compostos bioativos do bagaço de malte: fenólicos, capacidade antioxidante in vitro e atividade antibacteriana**. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ALVES, L. L.; RICHARDS, N. S. P. dos S.; MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Inulin and probiotic concentration effects on fatty and linoleic conjugated acids in cream cheeses. **European Food Research Technology**, v. 233, n. 4, p. 667-675, 2011.

ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; ACURCIO, L. B.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592-1600, 2014.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed.**, AOAC International, Maryland, USA. 2005.

ARAKAWA, K.; YOSHIDA, S.; AIKAWA, H.; HANO, C.; BOLORMAA, T.; BURENJARGAL, S.; MIYAMOTO, T. Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 3, p. 449-56, 2016.

ARDO, Y.; PEDERSEN, T. B.; VOGENSEN, F. K. Effect of heterofermentative lactic acid bacteria of DL-starters in initial ripening of semi-hard cheese. **International Dairy Journal**, v. 57, s/n, p. 72-79, 2016.

ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 591-596, 2013.

ARQUÉS, J. L.; RODRIGUEZ, E.; LANGA, S.; LANDETE, J. M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 584183, 9 p., 2015.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**, v. 22, n. 3 - 4, p. 457- 461, 2011.

ASKOUL, I.; GORRAH, S. S.; AL-AMIR, L. Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from some syrian fermented foods, **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 4, p. 2507-2520, 2014.

ASPRI, M.; BOZOUDI, D.; TSALTAS, D.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Raw donkey milk as a source of Enterococcus diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. **Food Control**, v. 73, p. 81-90, 2017.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BALAKRISHNAN, G.; AGRAWAL, R. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. **Journal Food Science Technology**, v. 51, n. 12, p. 4138-4142, 2014.

BALCIUNAS, E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134 -142, 2013.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

BEKAL, S.; BEEUMEN, J. V.; SAMYN, B.; GARMYN, D.; HENINI, S.; DIVIÈS, C.; PRÉVOST, H. Purification of *Leuconostoc mesenteroides* citrate lyase and cloning and characterization of the cit CDEFG gene cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 647- 654, 1998.

BENKERROUM, N.; OUBEL, H.; ZAHAR, M.; DLIA, S.; FILALI-MALTOUF, A. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 960 - 968, 2000.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 12, p. 789-810, 2006.

BILLE, J.; ROCOURT, J. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, chap. 33, p. 461-471

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy Ethiopian infants. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 504-516, 2013.

BORTOLUSSI, R. Listeriosis: A primer. Canadian Medical Association Journal. 2008. Disponível em: <<http://www.cmaj.ca/content/179/8/795.full>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

BRASIL. Decreto n. 1.812, de 08 de fevereiro de 1996. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de fevereiro de 1996a.

BRASIL. Portaria nº 146, de 9 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Creme de Leite. **Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária**. Poder Executivo, Brasília, DF, 09 de março de 1996b.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135-144, 2006.

BUCHANAN, R. L.; LEON, G. M. C.; HAYMAN, M. M.; JACKSON, T. C.; WHITING, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 75, s/n, p. 1-13, 2017.

CALDER, P. C. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. **Wolters Kluwer Health**, v. 16, n. 4, p. 425-433, 2013.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1-12, 2012.

COGAN, T. M.; HILL, C. Cheese starter cultures. In: Fox P. F. (Ed). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman and Hall. 1993. p. 193-255.

COSTA, D. S. **Modelagem probabilística do crescimento de *Listeria monocytogenes* em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem**. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2016.

COTTER, P. D.; HILLS, C. ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILLS, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, n. 11, v. 2, p. 95-105, 2013.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R. PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 2, p. 148-173, 2012.

DABA, H.; PANDIAN, S.; GOSSELIN, J. F.; SIMARD, R. E.; HUANG, J.; LACROIX, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3450-3455, 1991.

DELGADO, A.; LÓPEZ, F. N. A.; BRITO, D.; PERES, C.; FEVEREIRO, P.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 2, p. 193-201, 2007.

DEWETTINCK, K. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 436-57, 2008.

DILZER, A.; PARK, Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 6, p. 488-513, 2012.

DONKOR, O. N.; NILMINI, S. L. I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 657-665, 2007.

DUALDO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema CompactDry® tc durante estocagem refrigerada de

iogurtes. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 65, n. 374, p. 33-40, 2010.

DUARTE, M. C. K. H.; CORTEZ, N. M. S.; MACEDO, N. C.; FRANCO, L. R. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 1, p.1-10, 2016.

EISENREICH, W.; SLAGHUIS, J.; LAUPITZ, R.; BUSSEMER, J.; STRITZKER, J.; SCHWARZ, C.; SCHWARZ, R.; DANDEKAR, T.; GOEBEL, W.; BACHER, A. ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA Wolfgang. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2040-2045, 2006.

EKINCI, F. Y.; OKUR, O. D.; ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 3, p. 216-224, 2008.

EL-SALAM, M.; EL-SHAFEI, K.; SHARAF, O. M.; EFFAT, B. A.; ASEM, F. M.; EL-AASAR, M. Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability to synthesis conjugated linoleic acid. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 62-69, 2010.

FANEGAS, M. F.; ZAPATA, A. I.; ZUIETA, M. D.; BURITICÁ, M. G.; AGUDEIO, S. O.; VAIENCIA, J. S. Antimicrobial capacity of native acid lactic bacteria isolated from double cream cheese and colombian quesillo. **Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 15, n. 1, p. 45-55, 2017.

FARINHA, L. R. L. **Efeito da composição de bactérias lácticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina**. 2016. 121 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-

Graduação Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FARVIN, K. H.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 1-in vitro assays and evaluation in x-3 enriched milk. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1081-1089, 2010.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de enterococcus**. 2005. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, Faculdade de agronomia, Universidade federal do rio grande do sul, Porto Alegre, 2005.

FLORENCE, A. C. R.; BÉAL, C.; SILVA, R. C.; BOGSAN, C. S.; PILLEGGI, A. L.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Fatty acid profile, trans-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2207-2214, 2012.

FOUCAUD, C.; HEMME, D.; DESMAZEAUD, M. Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 20-25, 2001.

GÁLVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p.125-152, 2008.

GALVÉZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; BEN, O. N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1, p.51-70, 2007.

GENDROT, F.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C.; FERCHICHI, M.; HEMME, D. Characterization of amino acid transport in the dairys train *Leuconostoc*

mesenteroides subsp. *mesenteroides* CNRZ 1273. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, s/n, p. 291-295, 2002.

GONG, H. S.; MENG, X. C.; WANG, H. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. **Food Control**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

GUARDAMAGNA, O.; AMARETTI, A.; PUDDU, P. E.; RAIMONDI, S.; ABELLO, F.; CAGLIERO, P.; ROSSI, M. Bifidobacteria supplementation: Effects on plasma lipid profiles in dyslipidemic children. **Nutrition**, v. 30, n.7-8, p. 831-836, 2014.

GUTIÉRREZ, L. F. Conjugated linoleic acid in milk and fermented milks: variation and effects of the technological processes. *Vitae*, **Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**, v. 23, n. 2, p. 134-145, 2016.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 105-108, 2007.

HARDING, D.; SHAW, B. G. Antimicrobial activity of *Leuconostoc gelidum* against close lyre lated species and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 5, 648-654, 1990.

HASTINGS, J. W.; SAILER, M.; JOHNSON, K.; ROY, K. L.; VEDERAS, J. C.; STILES, M. E. Characterization of leucocin A-UAL 187 and Cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 23, p. 7491-7500, 1991.

HASTINGS, J. W.; STILES, M. E. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 12, p. 127-134, 1991.

HÉCHARD, Y.; DÉRIJARD, B.; LETELLIER, F.; CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 12, p. 2725-2731, 1992.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc* characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 16, p. 467-494, 2004.

HENG, N.; WESCOMBE, P.; BURTON, J.; JACK, R.; TAGG, J. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley, M.; Chavan, M., (Eds). **Bacteriocins: ecology and evolution**. Berlin, Springer: p. 45-92, 2007.

HIRAI, C. K. **Considerações sobre a validação dos testes de limites microbianos**. Disponível em < <http://www.revistaanalytica.com.br/consideracoes-sobre-a-validacao-dos-testes-de-limites-microbianos/>>. Acesso em 31 de outubro de 2017.

HOLO, H. N.; NES, I. F. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. **Journal of Bacteriology**, v. 173 n. 12, p. 3879-3887, 1991.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

JEON, H. H.; KIM, K. H.; CHUN, B. H.; RYU, B. H.; HAN, N. S.; JEON, C. O. A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* subsp. *nov.* and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. *nov.* based on complete genome sequences.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 67, n. 7, p. 2225-2230, 2017.

JERÔNIMO-CENEVIVA, A. B. O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociencias, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

JOERGER, M. C.; KLAENHAMMER, T. R. Cloning and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6339-6347, 1990.

JOSHI, S.R.; KOIJAM, K. Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KIHAL, M.; PREVOST, H.; HENNI, D. E.; BENMECHERNE, Z.; DIVIÈS, C. Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk. **World Journal of Dairy and Food Sciences**, v. 2, n. 2, p.62-68, 2007.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 12, n. 2-3, p. 39-85, 1993.

KONGO, M. Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: Past, present and future developments. In: KONGO, M. **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. n.c.: Intech, 2013. p. 3-22. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-starter-cultures-for-cheese-processing-past-present-and-future-developments>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

KOT, W.; HANSEN, L. H.; NEVE, H.; HAMMER, K.; JACOBSEN, S.; PEDERSEN, P. D.; SORENSEN, S. J.; HELLER, K. J.; VOGENSEN, F. K. Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 176, n. 17, p. 29-37, 2014.

LASCANO, G. J.; ALENDE, M.; KOCH, L. E.; JENKINS, T. C. Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6334-6341, 2016.

LEROI, F.; JOFFRAUD, J. J.; CHEVALIER, F. Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold smoked salmon during storage at 5 °C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, v. 63, n. 4, p. 502-508, 2000.

LI, Z.; JIANG, A.; YUE, T.; WANG, J.; WANG, Y.; SU, J. Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 7, p. 4242-4251, 2013.

LI, W.; JI, J.; TANG, W.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Characterization of an antiproliferative exopolysaccharide (LHEPS-2) from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, s/n, p. 334-340, 2014a.

LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food Chemistry*, v. 165, s/n, p. 262-270, 2014.

LIMA, M. S. F.; SILVA, R. A.; SILVA, M. F.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Características microbiológicas e antioxidantes de um novo alimento funcional

probiótico: Leite de ovelha fermentado por kefir. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 2014.

LIN, C. L.; WANG, C. C.; CHANG, S. C.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lyciumbarbarum linnaeus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 146-151, 2009.

LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 103-110, 2000.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Separating milk fats from fiction. **WCDS Advances in Dairy Technology**, v. 23, s.n, p. 19-36, 2011.

LOPES, A. R. **Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

MACOUZET, M.; LEE, B. H.; ROBERT, N. Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 2128-2134, 2010.

MARIE, K. P. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Lp6SH isolated from “Sha’a”, a maize-based traditionally fermented beverage from Cameroon. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 2, p. 149-158, 2012.

MARTÍN, M.; SENDER, P. D.; PEIRÚ, S.; MENDONZA, D. MAGNI, C. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar. *acetylactis* CRL264. **Journal Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5649-5660, 2004.

MASUDA, Y.; ONO, H.; KITAGAWA, H.; ITO, H.; MU, F.; SAWA, N.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8164-8170, 2011.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 2. ed. Chichester: John Wileys And Sons, 2010. Cap. 1. p. 3-33.

MOHANTY, D. P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P. S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MOON, J. S. Genome sequence analysis of potential probiotic strain *Leuconostoc lactis* EFEL005 isolated from kimchi. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 337-342, 2015.

MOON, Y. H.; MADSEN, L.; CHUNG, C.; KIM, D.; DAY, D. F. Lime application for the efficient production of nutraceutical glucooligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742 (ATCC13146). **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 279-285, 2015.

MORTVEDT, C. I.; NISSEN-MEYER, J.; SLETTEN, K.; NES, I. F. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L 45. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1829-1834, 1991.

NASCIMENTO, M. S. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal**. 2007. 184 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA L. General aspects of bacteriocins. **Brazil Journal Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

PAPATHANASOPOULOS, M. A.; KRIER, F.; REVOL-JUNELLES, A. M.; LEFEBVRE, G.; LE CAER, J. P.; VON HOLY, A.; HASTINGS, J. W. Multiple bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and other *Leuconostoc* / *Weissella* strains. **Current Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 331-335, 1997.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PATTERSON, E.; CRYAN, J.F.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P.; DINAN, T. G.; STANTON, C. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 4, p. 477-489, 2014.

PAULA, A. T.; JERÔNIMO-CENEVIVA, A. B.; TODOROV, S. D.; PENNA, A. L. B. The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 147-171, 2015b.

PAULA, A. T.; JERÔNIMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain

isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 1-13, 2014.

PAULA, A. T.; JERÔNIMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 899-910, 2015a.

PAULA, R. A. **Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico isoladas de salame tipo italiano**. 2005. 187 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PHAM, P.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G.; CERNING, J. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6. p. 2302-2310, 2000.

PIHLANTO, A.; VIRTANEN, T.; KORHONEN, H. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 20, n.1, p. 3-10, 2010.

QUEIROZ, A. A. M. **Caracterização molecular de bacterias ácido lácticas com potencial tecnologico para produção de queijo coalho no Ceará**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará., Fortaleza, 2008.

RAMESH, V.; RAJESH, K.; SINGH, R. R. B.; KAUSHIK, J. K.; MANN, B. Comparative evaluation of selected strains of lactobacilli for the development of antioxidant activity in milk. **Dairy Science and Technology**, v. 92, n. 2, p. 179-188, 2012.

RAMOS, S. V. **Validação da metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade microbiológica de formas farmacêuticas líquidas e determinação da eficácia dos conservantes**. 2010. Tese (Doutorado). Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmecêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. **Annals of Biological Research**, v. 1, n. 4, p. 218-228, 2010.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124-140, 2012.

RENES, 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**, v. 34, s/n, p. 340-346, 2017.

RIBEIRO, C. G. S. **Produção e composição do leite de vacas alimentadas com capim elefante suplementado com óleo de girassol**. 2013. 192 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

ROBINSON, R. K. Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. New York: **John Wiley and Sons**, 2005. 3rd ed., p. 374-375.

RODRIGUES, F. J.; DORTA, C.; SHIGEMATSU, E.; CEDRAN, M. F.; ROSSI, B. M.; RIBEIRO, M. A. P.; VARJÃO, A. G. Viabilidade do emprego do meio de cultura PCA para a contagem de bactérias probióticas. In: SIMPAN – SIMPÓSIO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, v. 25, n. 1, 2014, Araraquara: **Brazilian Journal Food of Nutrition**, 2014. p. 55.

RUTKOWSKA, J.; BIALEK, M.; ADAMSK, A.; ZBIKOWSKA, A. Differentiation of geographical origin of cream products in Poland according to their fatty acid profile. **Food Chemistry**, v. 178, s/n, p. 26-31, 2015.

SAH, B. N. P.; VASILJEVIC, T.; MCKECHNIE, S.; DONKOR. O. N. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: A Critical Review. **Comprehensive Reviews**, v. 14, n. 2, p. 123-138, 2015.

SANTOS, M. I. S. **Caracterização de agentes com potencial antimicrobiano para utilização na indústria alimentar**. 2016. 147 f. Tese (Doutorado) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016.

SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. **Life Sciences**, v. 78, n. 18, p. 2088-2098, 2006.

SHAO L.; WU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, W.; AI, L.; GUO, B. Partial characterization and immune stimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, s/n, p. 51-56, 2014.

SHI, F.; WANG, Y.; LI, Y.; WANG, X. Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 9, p. 1551-1557, 2016.

SILVA, L. F. **Diversidade e evolução da microbiota láctica autóctone em queijo Muçarela de búfala e aplicação tecnológica dos isolados**. 2015. 149 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo mussarela de búfala**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

SILVA, L. J. M. **Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP**. 2011. 185 f. Dissertação (Mestrado) - Tecnologia e Segurança Alimentar, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2011.

SILVA, L. **Seleção de bactérias lácticas com atividade anti-*Listeria* a partir de leite de cabra cru**. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2014.

SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

TAMIME, A. Y. **Fermented milks**. Oxford: Blackwell Science. 2006.

TULINI, F. L.; LOHANS, C. T.; BORDON, K. C.; ZHENG, J.; ARANTES, E. C.; VEDERAS, J. C.; DE MARTINIS, E. C. Purification and characterization of antimicrobial peptides from fish isolate *Carnobacterium maltaromaticum* C2:

Carnobacteriocin X and carnolysins A1 and A2. **International Journal Food Microbiology**, v. 173, s/n, p. 81-88, 2014.

VERNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and milk products**. Technology, Chemistry and Microbiology. New York: Chapman & Hall. 2001.

VIEIRA, A. P. Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta. 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

VIEIRA, C. P.; CABRAL, C. C.; LIMA, B. R. C. C.; PASCHOALIN, V. M. F.; LEANDRO, K. C.; CONTE-JUNIOR, 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**, v. 31, s/n, p. 172-178, 2017.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 68-75, 2012.

VIRTANEN, T.; PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN, H.; Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Applied microbiology**, v. 102, n. 1, p. 106-15, 2007.

XIRAPHI, N.; GEORGALAKI, M. RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; TSAKALIDOU, E.; DROSINOS, E. H. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 194-203, 2008.

YILMAZ-ERSAN, L. Fatty acid composition of cream fermented by probiotic bacteria. **Mljekarstvo**, v. 63, n. 3, p. 132-139, 2013.

ZHANG L.; LIU, C.; LI, D.; ZHAO, Y.; ZHANG, X.; ZENG, X.; YANG, Z.; LI, S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, s/n, p. 270-275, 2013.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; HAMIDA, J. B. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. **Protein Journal**, v. 29, n. 6, p. 432-439, 2010.

CAPÍTULO II

Effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 on *Listeria monocytogenes* inhibition and fatty acids profile in fermented cream

Danielle Oliveira Borges¹, Mariana Mitiko Matsuo², Cristina S. Bittencourt Bogdan², Sabrina Neves Casarotti³, Ana Lúcia Barretto Penna¹

¹ São Paulo State University – UNESP, Department of Food Engineering and Technology

² São Paulo University – USP, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology

³ Mato Grosso Federal University – UFMT, Department of Food and Nutrition

ABSTRACT

The capacity of bioconservation and the fatty acids profile of fermented cream by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 in co-culture with *Lactococcus* spp. and *Listeria monocytogenes* were evaluated. In addition, the physicochemical characteristics of the products were also assessed. The cream was fermented according to four treatments: T1 - co-culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*; T2 - co-culture of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; T3 - co-culture of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - co-culture of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. The fermented cream presented typical physicochemical characteristics for the product. *L. monocytogenes* count increased significantly in the T2 treatment, in contrast, in the T4 treatment that included *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, a reduction of 0.7 log₁₀ CFU/mL was observed for *L. monocytogenes* count (from 2.1 ± 0.01 to 1.4 ± 0.05 log₁₀ CFU/mL), showing the bacteriogenic activity of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55. Additionally, there was a strong reduction of butyric acid, at the end of

storage. The medium-chain fatty acids (MCFA) fraction increased after fermentation, however the treatments and storage time did not affect them. There was a reduction in the long-chain fatty acids (LCFA) during storage, suggesting that *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 affected the production of lipase by *Lactococcus* spp. The relative content of short-chain fat acids (SCFA) increased and MUFA decreased during the storage period in all treatments, however, these changes were not affected by the type of culture used. In general, the polyunsaturated fatty acids (PUFA) content did not change during fermentation and storage period in all treatments. The linolenic acid content decreased significantly after fermentation and the *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP affected the bioconversion of conjugated linoleic acid (CLA) in T3. *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 presented antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, affected the fatty acids profile of fermented cream and showed ability of CLA bioconversion.

1 INTRODUCTION

Consumers are more aware of the link between diseases such as cardiovascular, cancer, diabetes and obesity, and excessive intake of certain dietary ingredients or changes in eating habits. As a result, consumers no longer think of food as just a necessity for nutrition and growth, but also in terms of providing health benefits (Sanders, 1994; Mellentin and Heasman 2015). Today, most of the trends that influence consumer and food perception have a direct impact on nutrition and health, and thus on life quality.

The health benefits of milk and dairy products to humanity are known since medieval times and may be attributed to the biologically active components that are present in milk. Additionally, the fermented dairy products have been standing out because of its availability and healthy appeal through the action of probiotic bacteria which modulates d activities produced, in the fermented milk products (Bhat and Bhat, 2011).

The fermentation of dairy products by lactic acid bacteria (LAB) is one of the oldest and most efficient forms of food preservation by non-thermal processing

(Kongo, 2013). Besides the production of organic acids (lactic, acetic, formic, among others), LAB are also used for food preservation due to the production of antimicrobial substances, such as hydrogen peroxide, diacetyl and bacteriocins. The use of bacteriocins as biopreservatives in foods is effective to in the control the of pathogenic and deteriorating spoilage microorganisms (Sullivan; Ross; Hill, 2002; Reis et al., 2012).

Bacteriocins from some bacteria inhibit the growth of closely related microorganisms, while others inhibit a much wider range of microorganisms, including foodborne pathogens and spoilage microorganisms, such as *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium tyrobutyricum*. Therefore, the incorporation of bacteriocin-producing strains as a starter or adjunct culture in the manufacture of fermented foods provides an attractive and economical alternative to the addition of purified bacteriocins or synthetic preservatives (Alegría et al., 2010).

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen able to adapt their cellular physiology to multiply under refrigeration temperatures and persist in food-processing environments. It is also a public health concern since this microorganism can cause a lot of health problems, including central nervous systemic infections, meningitis, gastrointestinal disorders, abortion and exhibits high mortality rates in children, elderly, immuno-compromised people (Drevets, Bronze, 2008; Paula et al., 2015a).

During the fermentation process, the LAB strains cause a rapid acidification of the raw material through the production of organic acids, mainly lactic and acetic acids, ethanol, aroma compounds and antimicrobial substances, such as hydrogen peroxide and bacteriocins, exopolysaccharides and several important enzymes that can act on milk components, such as fat, protein and carbohydrate. In this way, they improve microbial life and safety, texture, nutritional quality and contribute to the pleasant sensory profile of the cream (Hati et al., 2013; Birri et al., 2013; Yilmaz-Ersan et al., 2016).

The lipolytic enzymes produced by LAB are responsible for the changes observed in fat during milk fermentation, changing the degree of saturation and the size of the fatty acid chains (Florence et al., 2016). One major pathway to produce flavor constituents in fermented milk products is through lipolysis or oxidation of fatty

acids in milk fat, which results in secondary alcohol, carbon dioxide, lactones, acids and alcohol.

The production of conjugated linoleic acid (CLA), a fatty acid with numerous health benefits, from linoleic acid by LAB has receiving a crucial attention. Dairy foods, especially those with high fat content, are the main source of polyunsaturated fatty acids, such as conjugated linoleic acid (CLA), which is a potent health benefits, such as anticarcinogenic and anti-inflammatory activities and inhibition of the onset of diabetes (Larsson et al., 2005; Hati et al., 2013). PUFAs were considered beneficial in the prevention and treatment of various cardiovascular diseases due to antithrombotic, anti-inflammatory and antihypertensive properties. In addition to the cardiovascular effects, PUFAs promote the early development of the eye and brain, regulate immune function and may improve inflammatory conditions (Ránky et al., 2017).

Renes et al. (2017) tested 85 autochthonous LAB strains for the ability to produce CLA; among the tested strains, four *Leuconostoc mesenteroides* strains was classified as CLA producers. In a similar study, El-Salam et al. (2010) attested that *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* gave the highest CLA production compared to other species of LAB tested.

Considering the fermented dairy products, the fermented cream stands out because it is a high value product, rich in fat, and commonly used primarily as an ingredient in sauces and toppings recipes. Fermented cream is obtained by fermentation of standardized, homogenized and thermally treated products using certain strains of LAB.

Leuconostoc spp. are heterofermentative LAB found in various food products and commodities such as vegetables, cereal, fruits, wine, fish, dairy products and meat. It has a promising future for application in dairy foods by enhancement of physicochemical characteristics of these products, mainly due the production of organic acids, CO₂ and volatile compounds, which contribute to the flavor and texture of butter, cream and cheese (Hemme, Foucaud-Scheunemann, 2004; Paula et al., 2015a; Flórez et al., 2016).

Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* SJRP55 was isolated from water buffalo mozzarella cheese and identified by whole 16S rDNA gene

sequencing (Silva et al., 2015). It was considered potentially probiotic because it presented resistance to stressful conditions that simulated the gastrointestinal tract and ability to deconjugate bile salts. It also presented good adhesion properties, β -galactosidase activity and viability in fermented milk during storage. Moreover, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 produced antibacterial compounds against *Listeria* spp. strains and not inhibiting against *Lactobacillus* spp., and was considered promising a biopreservative culture in fermented milk, and the purified bacteriocins can also be applied in food preservation (Paula et al., 2014; Paula et al., 2015b).

In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroids* SJRP55 on the fatty acid profile and production of conjugated linoleic acid (CLA) in fermented cream and their ability to inhibit *Listeria monocytogenes*. The physicochemical and microbiological characteristics of the cream fermented by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 in co-culture with *Lactococcus* spp., was also carried out.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Dairy cream

UHT (ultra-high temperature) cream (Camponesa, Lagoa da Prata, MG, Brazil) with 20% fat, from a same batch, available on the local market was used.

2.2 Cultures

The following cultures were used for cream fermentation: a) lyophilized commercial co-culture of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50A (DSM Food Specialities, New South Wales, Australia), b) *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 belonging to IBILCE/UNESP culture collection, previously isolated from the processing of buffalo mozzarella cheese, and c) *L. monocytogenes* ATCC 15313 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) cryopreserved in glycerol at -80 °C. *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 and *L.*

monocytogenes ATCC 15313 strains were maintained at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in MRS broth supplemented with 20% (v/v) glycerol.

2.3 Production of fermented cream

The following treatments were conducted: T1 - cream inoculated with *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50 A; T2 - cream inoculated with *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50 A and *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - cream inoculated with *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50 A and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, and T4 - cream inoculated with *Lc. lactis* subsp. *Lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 50 A, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. All treatments were fermented in duplicate.

A population of approximately 7.0 log CFU/mL LAB were inoculated into two liters of UHT cream for each treatment. For evaluation of bacteriocin production, *L. monocytogenes* ATCC 15313 was inoculated (10^2 CFU/mL) as an indicator.

After inoculation, flask samples were transferred to a water bath, and the measurement and recording of pH values each 30 min using a pH meter (HANNA model HI 3220, São Paulo, Brazil). Batch fermentation were performed at controlled temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, which is the ideal temperature for a better development of organic acids and bacteriocins by *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 (Paula et al., 2015b) up to a pH of 4.6, which was selected as the condition for stopping fermentation.

Afterward, fermented cream was transferred to an ice bath and cooled down to $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ to stop the metabolic activity of the microorganisms. The product was put in 80-mL sterile plastic cups, and stored at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 28 days.

2.4 Chemical composition of fermented cream

The chemical composition of fermented cream included: fat by the Gerber method (AOAC, 2005 - method 2000.18), protein content by the Kjeldahl method (AOAC, 2005 - method 991.20), moisture content by vacuum oven drying (IAL, 2008 - method 012/IV), and ash content by muffle incineration at $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ (AOAC, 2005 -

method 935.42). The nitrogen free extract fraction (Nifext) was calculated by difference. All analyzes were performed in triplicate.

2.5 Fatty acids and conjugated linoleic acid (CLA) extraction and analyses

The samples for analysis of fatty acids were collected in the cream before fermentation (time 0), at the first and 28-day of refrigerated storage. The fat of the cream were extracted according to the ISO method 14156 (ISO, 2001) and the fatty acids methyl esters (FAME) were prepared by esterification according to the ISO method 15884 (ISO, 2002).

Analyses of FAME were carried out in a Varian GC gas chromatograph (model 430 GC, Varian Chromatograph Systems, Walnut Creek, California, USA), equipped with a CP 8412 auto injector. Injections were performed in a 100-m fused silica capillary column (ID $\frac{1}{4}$ 0.25 mm) coated with 0.2 mm of polyethylene glycol (SP-2560, Supelco, USA) and analysis was carried out under the following conditions: using helium as carrier gas; isobaric pressure of 37 psi; linear velocity of 20 cm/s; make-up gas: helium at 29 mL/min at split ratio of 1:50; volume injected: 1.0 mL. The injector temperature was set at 250 °C and the detector temperature at 280 °C. The oven temperature was initially set at 75 °C for 3 min, then programmed to increase to 150 °C at a rate of 37.5 °C/min, and then to 215 °C at a rate of 3 °C/min (Luna et al., 2004). Qualitative fatty acid composition of the samples was determined by comparing the retention times of the peaks with those of standards 05632 and 189-19 (Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, USA). The Galaxie Chromatography Data System (Varian Chromatograph Systems) was used for identification and quantification of peaks. The relative content of FAME was calculated from the area of each peak, and expressed as a percentage of total FAME, according to the official method Ce 1-62 (AOCS, 1997). Results were grouped and expressed as g/100 g of short-chain fatty acids (SCFA – C4:0 and C6:0), medium-chain fatty acids (MCFA – C8:0 to C15:0), long-chain fatty acids (LCFA – C16:0 to C18:3), saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), and polyunsaturated fatty acids (PUFA), according to Ackman (2007). All samples were analyzed in quadruplicate.

2.6 Microbiology analyses

The microorganisms used for cream fermentation were quantified at the end of the fermentation and weekly in the product during 28 days of refrigerated storage using selective media defined according to previous experiments. *Listeria sp.* were counted using Listeria Enrichment Broth added of 1.5% PCA and incubated at 37 °C for 48 h under aerobic condition. *Leuconostoc sp.* and *Lactococcus spp.* were counted using MRS agar with 30 µg/mL vancomycin hydrochloride and MRS agar, respectively and both LAB were incubated at 25 °C for 48 h under aerobic condition.

2.7 Statistical analysis

Results were analyzed using one-way ANOVA. The treatments were compared among each other in the same storage period, and the samples of the same treatment were compared during the time. These analyses were carried out using the STAT Software version 2.0. Mean values were compared using the Tukey test at $P \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chemical composition of fermented cream

The moisture and fat content values of the four treatments did not show any significant difference ($p > 0.05$). Moisture contents ranged from 70.16 (T3) to 72.08% (T1), and those of fat between 20.77 (T4) and 21.05 (T1). Despite differences in protein, ash and carbohydrate content among treatments, these variations are considered normal in industrial processes (Table 1).

The fermented cream fat content meets the minimum range of 10% (m/m) and maximum 19.9% (m/m), which is a requirement for low, light cream or semi cream according to Brazilian legislation (BRASIL, 1996).

3.2. Fatty acids profile of cream and fermented cream

The fatty acids profile of fat extracted from fermented creams according to the four treatments, were analyzed before fermentation (NF, day 0) and after 1 and 28 days of refrigerated storage (Table 2). Their distribution according to chain length allowed separation of short chain fatty acids (SCFA), medium chain fatty acids (MCFA) and long chain fatty acids (LCFA). The saturation degree allowed classification of the fatty acids into saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids.

Table 1. Chemical composition of fermented milk cream samples.

%	Treatments			
	T1	T2	T3	T4
Moiture	72.08 ± 0.30 ^a	70.66 ± 0.99 ^a	70.16 ± 1.01 ^a	70.90 ± 0.68 ^a
Fat	21.05 ± 0.33 ^a	20.92 ± 0.13 ^a	21.00 ± 0.35 ^a	20.77 ± 0.15 ^a
Proteins	3.41 ± 0.19 ^a	3.20 ± 0.08 ^{ab}	3.24 ± 0.08 ^{ab}	3.11 ± 0.01 ^b
Ash	0.89 ± 0.01 ^a	0.78 ± 0.01 ^c	0.86 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.01 ^c
Nifext	2.57 ± 0.15 ^b	4.44 ± 1.11 ^a	4.75 ± 0.76 ^a	4.46 ± 0.66 ^a

Nifext - Nitrogen free extract fraction. T1 - *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (control); T2 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. Results express the means followed by standard deviation. Equal letters in the same line do not differ statistically by the Tukey test at 5%.

The fatty acid profile varied during fermentation and storage, as a result of the treatments. The concentrations of SCFA did not varied during the storage period, for all treatments, except for a slight variation in T1 at day 1. Comparing all treatments, a reduction in the content of SCFA was mainly ascribed to a stronger reduction in butyric acid (C4:0) after 28 days of storage. The concentration of butyric acid was reduced by 2.66% in T1, 0.12% in T2, 5.46% in T3 and 38.5% in T4, relative to the lowest amount of SCFA in T4 at the end of storage. Butyric acid occurs in cream and butter and is responsible for the characteristic butyric note of rancid butter. Milk fat, also known as butterfat, is characterized by the presence of several short chain fatty acids (4, 6, 8, 10 carbon atoms) which are present in only very small amounts in

other fats. Butyric acid accounts for about 4% of the fatty acids in milk fat (GORDON, 2012).

The percentage of MCFA fraction increased after fermentation in all treatments, and the myristic acid (C14:0) was the most prevalent one, representing approximately 63% of MCFA, however, myristic acid content was not affected by the type of culture and storage time. The higher increase of MCFAs content during the storage time was observed by caprylic (increasing of 7.7%) and lauric (increasing of 6.55%). In similar study, Yilmaz-Ersan (2017) found that the major differences between creams fermented by different cultures (*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*) were observed in myristic (C14:0), palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (c C18:1n-9), elaidic (t C18:1n-9), linoleic (c C18:2n-6) and α -linolenic acids (18:3n-3, ALA).

Table 2 – Concentration (%) of fatty acid methyl esters in fermented cream before fermentation and during 28 days of refrigerated storage.

Samples	Time (days)	SCFA	MCFA	LCFA	SFA	MUFA	PUFA
T1	0	3.5 ± 0.24 ^{Aa}	18.4 ± 0.05 ^{Ca}	78.1 ± 0.20 ^{Aa}	70.5 ± 0.35 ^{Ba}	27.7 ± 0.07 ^{Aa}	1.9 ± 0.37 ^{Ba}
	1	2.9 ± 0.19 ^{Bb}	18.7 ± 0.22 ^{Ba}	78.4 ± 0.19 ^{Aa}	70.5 ± 0.23 ^{Bb}	27.0 ± 0.19 ^{Ba}	2.5 ± 0.04 ^{Aa}
	28	3.4 ± 0.08 ^{Aa}	19.0 ± 0.17 ^{Aa}	77.5 ± 0.20 ^{Bb}	71.8 ± 0.22 ^{Aa}	26.4 ± 0.15 ^{BCa}	1.8 ± 0.13 ^{Ba}
T2	0	3.5 ± 0.24 ^{Aa}	18.4 ± 0.05 ^{Ba}	78.1 ± 0.20 ^{Aa}	70.5 ± 0.35 ^{Ba}	27.7 ± 0.07 ^{Aa}	1.9 ± 0.37 ^{Aa}
	1	3.4 ± 0.44 ^{Aa}	18.8 ± 0.22 ^{Aa}	77.8 ± 0.23 ^{Aba}	70.9 ± 0.28 ^{Bab}	26.8 ± 0.09 ^{Bab}	2.2 ± 0.21 ^{Aab}
	28	3.6 ± 0.11 ^{Aa}	19.0 ± 0.12 ^{Aa}	77.4 ± 0.04 ^{Bb}	71.9 ± 0.09 ^{Aa}	26.3 ± 0.07 ^{Ca}	1.8 ± 0.03 ^{Aa}
T3	0	3.5 ± 0.24 ^{Aa}	18.4 ± 0.05 ^{Ba}	78.1 ± 0.20 ^{Aa}	70.5 ± 0.35 ^{Ba}	27.7 ± 0.07 ^{Aa}	1.9 ± 0.37 ^{Aa}
	1	3.3 ± 0.03 ^{Aa}	18.8 ± 0.11 ^{Aa}	78.0 ± 0.14 ^{Aa}	71.7 ± 0.12 ^{Aa}	26.3 ± 0.13 ^{Cb}	2.0 ± 0.17 ^{Ab}
	28	3.4 ± 0.02 ^{Aa}	19.0 ± 0.14 ^{Aa}	77.7 ± 0.14 ^{Ab}	71.6 ± 0.14 ^{Aa}	26.5 ± 0.10 ^{Ba}	1.8 ± 0.11 ^{Aa}
T4	0	3.5 ± 0.24 ^{Aa}	18.4 ± 0.05 ^{Ba}	78.1 ± 0.20 ^{Aa}	70.5 ± 0.35 ^{Ba}	27.7 ± 0.07 ^{Aa}	1.9 ± 0.37 ^{Aa}
	1	3.4 ± 0.77 ^{Aa}	18.9 ± 0.17 ^{Aa}	77.6 ± 0.94 ^{Aa}	71.3 ± 0.74 ^{Aab}	26.7 ± 0.55 ^{Bab}	2.1 ± 0.25 ^{Ab}
	28	2.6 ± 0.22 ^{Bb}	18.9 ± 0.43 ^{ABa}	78.5 ± 0.61 ^{Aa}	71.3 ± 1.49 ^{Aa}	27.1 ± 0.97 ^{Ba}	1.8 ± 0.60 ^{Aa}

Abbreviations: 0: Before fermentation; 1: first day after fermentation; 28: twenty-eighth day after fermentation; SCFA: Short-chain fatty acids; MCFA: Medium chain fatty acids; LCFA: Long-chain fatty acids; SFA: Saturated fatty acids; MUFA: Monounsaturated fatty acids; PUFA: Polyunsaturated fatty acids. Means ± standard deviations with same capital letters within the same treatment and lower-case letters at the same storage time, do not differ by Tuckey Test ($P > 0.05$), $n = 4$.

In the treatments T1 and T2, there was a reduction in the LCFA content during storage, however, in T3 and T4 treatments the LCFA was not significantly different over 28 days of storage. These data may suggest that *Ln. mesenteroides* subsp.

mesenteroides SJRP55 impaired the production of lipase by *Lactococcus* spp., in dispute for nutrients from the medium.

During the cell growth, *Ln. mesenteroides* required glutamine, methionine, valine, and nicotinic acid as essential nutrients and 8 amino acids (Arg, Cys, His, Leu, Phe, Pro, Thr and Try), 5 vitamins (ascorbic acid, folic acid, inosine, calcium panthothenate, and thiamine), and others (manganese, magnesium, adenine, uracil, and Tween 80) as supplemental nutrients. This medium is useful to study the metabolic characteristics of *Ln. mesenteroides* and to explain its role in food fermentation (Jin et al., 2012). According to Cocaign-Bousquet (1995), *Lactococcus lactis* has sustained growth in media with the minimum nutrient conditions with nine amino acids (Glu, Met, Ile, Leu, Val, Ser, Arg, His and Thr), of which seven are also essential to the growth of *Ln. mesenteroids*.

The synthesis of proteolytic enzymes is not the only fundamental requirement for rapid acid production in milk fermentations, but that dipeptide transporter is also an essential component in the process of casein utilization by *lactococci* during growth in milk. *Lactococci* require several amino acids and B vitamins besides carbohydrates, phosphate, potassium and magnesium. The amino acids can either be supplied in pure chemical form or as a hydrolyzed casein product (Niel; Hahn-Hägerdal, 1999).

The relative content of SFA increased during the storage period in all treatments (Table 2), however the different treatments only slightly affected this group of fatty acids on day 1 of storage period. The main fatty acids found in fermented cream correspond mainly to saturated fatty acids, such as butiric acid (C4:0), caproic acid (C6:0), caprilic acid (C8:0), capric acid (C10:0), lauric acid (C12:0), miristic acid (C14:0), palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0).

Palmitic acid (C16:0) represents 50% of the total SFA content in the NF and fermented samples, regardless the type of culture. Palmitic acid has been shown to be an antimutagenic component present in milk fat and its concentrations are greater in kefir than in milk and yogurt. Furthermore, it was showed that palmitic acid can inhibit mutagenesis in dose-dependent response in bacterial cells using *in vitro* test (Vieira et al., 2017).

The MUFA content in the fermented samples was lower than in the unfermented samples; it decreased during storage for all treatments and there was a

slight variation between treatment T1 and T3 (Table 2). Within the MUFA fraction, oleic acid (C18:1*trans*) was the most prevalent one, representing 96% of the total monounsaturated content, followed by approximately 4% palmitoleic acid. Different results were found by Balakrishnan and Agrawal (2014), in which milk from various sources (cow, goat and camel) was fermented by *Pediococcus pentosaceus*, and the oleic and linoleic acids were higher in fermented milk than the unfermented ones.

The monounsaturated oleic acid lowers plasma cholesterol, LDL (low density lipoprotein) cholesterol and triacylglycerols, and prevents coronary heart disease (Mensink et al., 2003).

PUFA fraction was mostly composed by conjugated linoleic acid (C18:2, cis-9 trans-11, CLA) and α -linolenic acid (C18:3 cis-9 cis-12 cis-15, ALA) (Figure 2).

In general, PUFA content was stable during fermentation and storage period for all treatments, except for T1. Similar results were reported by Florence et al. (2012), in which this fraction remained statistically unchanged ($P > 0.05$) during storage in conventional fermented milks (yogurt and probiotic yogurt). However, Estrada et al. (2011) observed in strawberry yoghurts, after four weeks of cold storage, a reduction in PUFA fraction in organic fermented milks ($P < 0.01$), regardless the *B. lactis* strain used. These differences can be attributed to the different strains and food matrix used.

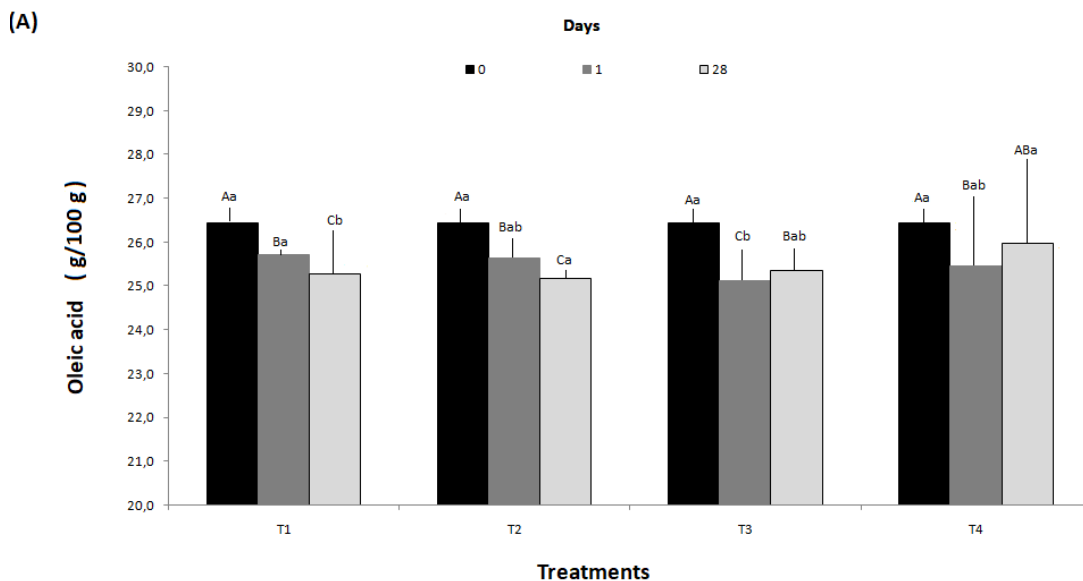
Lactococcus produces different enzymes that are responsible for the degradation of LCFA and MUFA (Jenkins and Harvatine, 2014). The presence of lipases and esterases has been demonstrated in nine strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis*, citrate positive lactococci and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Esterase activity was higher than lipase activity in all strains. Kamaly et al. (1990) reported the presence of lipases in the cell-free extracts of a number of strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris*; these lipases were, in general, optimally active at 37 °C and pH 7 to 8.5. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* showed the highest lipolytic activity of the strains studied on tributanoic acid and milk fat emulsions.

The presence of esterolytic activities in an intracellular extract of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* has already been reported in the literature. As the location of most LAB esterase/lipase activities appears to be intracellular. It is evident that they may require release into the food matrix through cell autolysis for maximum efficiency (El-Hofi, El-Tanboly and Abd-Rabou, 2011).

Depending on their concentration and perception threshold, volatile fatty acids can either contribute positively to the aroma of the dairy product or to a rancidity defect. The flavor effect of free fat acids in cheese and fermented cream, e. g., is regulated by pH (Collins et al., 2003). As the T4 treatment had the greatest reduction in butyric acid content during storage, there is less possibility of off-flavor development in the product. Comparing treatments T1 and T3, where there is absence of *Listeria* contamination, T3 had a greater reduction of butyric acid.

3.3. Bioactive unsaturated fatty acids contents of fermented cream

During fermentation, oleic acid (*trans* C18:1) relative concentration decrease in T1, T2 and T3 (Fig. 1A), however in T4, after 28 days of storage, the final content was similar to the unfermented cream. It is interesting to maintain a high relative content of *trans*-C18:1 as it participates in CLA production in the human and acts as an intermediate fatty acid in the biohydrogenation pathway (Florence et al., 2012).



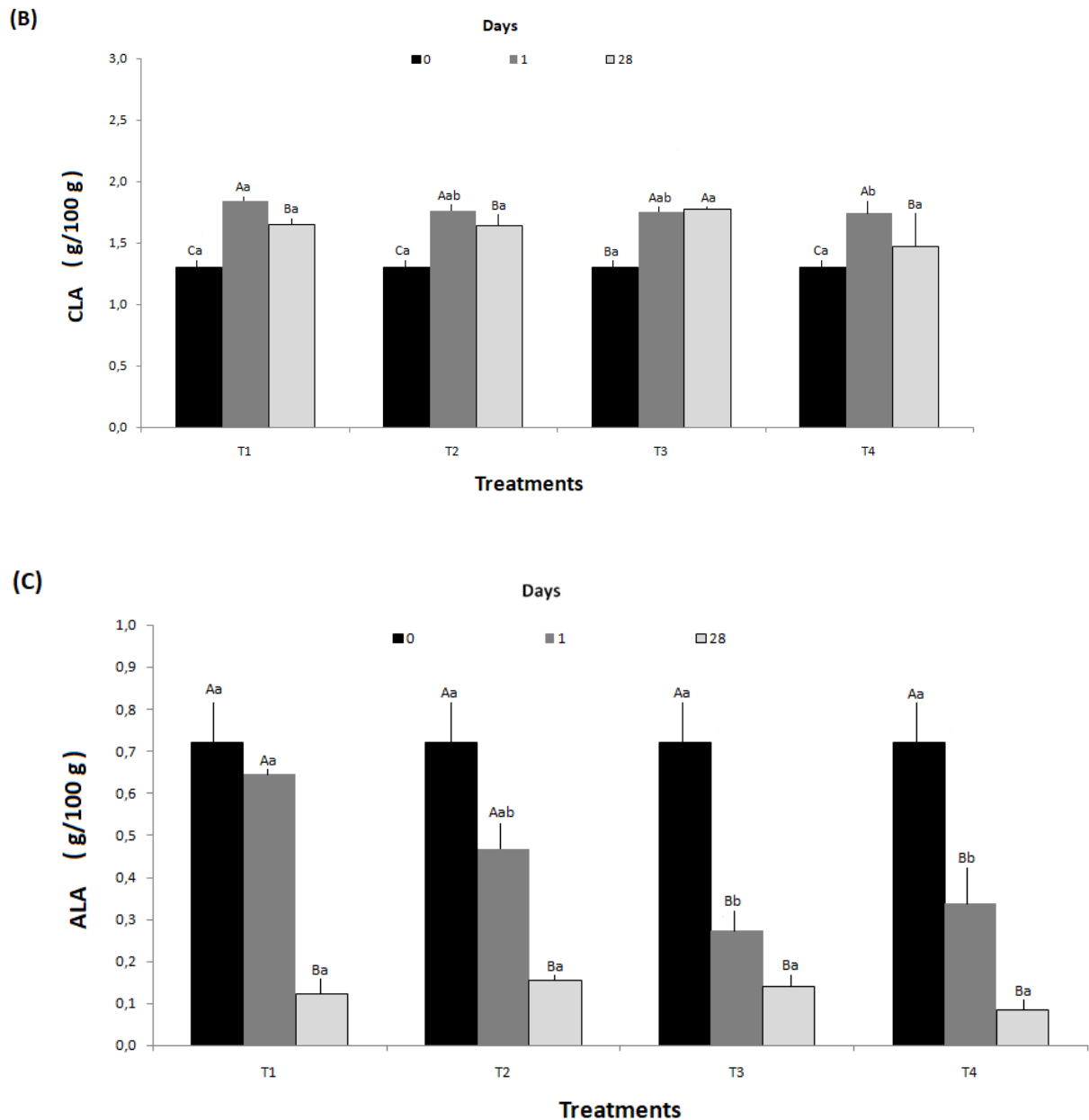


Fig. 1. Evolution of trans-octadecenoic acid (C18:1 *trans*, oleic acid, A), conjugated linoleic acid (CLA, B) and α -linolenic acid (ALA, C) relative contents in fermented cream during fermentation and storage, using different cultures: T1 - *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (control); T2 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. 0: Day 0 (before fermentation); 1: 1 day after fermentation; 28: 28 days of storage at 5 °C. Means \pm standard deviations with same capital letters within the same treatment and lower-case letters at the same storage time, do not differ by Tuckey Test ($P > 0.05$), $n = 4$.

Among the identified CLA-isomers, the C18:2 *cis* 9, *trans*11 and the C18:2 *trans* 10 *cis*12, are considered as molecules biologically active, due to their protective effects against various common diseases such as obesity, atherosclerosis, diabetes, some chronic inflammatory diseases and cancer. Anticarcinogenic effects have been observed in different cancer types, with doses varying between 55 mg and 3.5 g CLA/day, but the most important results have been reported regarding breast cancer (Gutiérrez, 2016).

Studies have evaluated the factors affecting the content of CLA in milk and dairy products, because these foodstuffs are the main source of CLA in the human diet, providing about 70% of the total CLA daily intake, which varies between 70 and 430 mg/day (Gutiérrez, 2016). However, including the conversion of octadecenoic (vaccenic) acid in the human body by the D9-desaturase enzyme, an average intake of 650 mg/day can be achieved (Gorissen et al., 2015). Since these intake values are lower than those recommended for achieving beneficial effects on human health (3-4 g CLA/day), various technological alternatives have been investigated to increase the CLA concentration in milk and dairy products, and hence the daily CLA intake of the population. In this study, the sample fermented with *Lactococcus* spp. and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, presented 1.8 g/100g of CLA content, which corresponds to 60% of the total recommended daily contents.

The α -linolenic acid (ALA) content decreased significantly after fermentation and during the storage period in T3 and T4 treatments (Fig. 1C). The strains used during fermentation did not influenced the final ALA concentration in the fermented creams. The highest percentage of ALA was detected in the samples before fermentation, followed by a decline until day 28 (Fig. 1B). This phenomenon can be explained by a possible biohydrogenation of ALA into C18:2 and C18:1 intermediates, which was triggered by microbial enzymes isomerases and reductases (Jenkins et al., 2008).

Alpha-linolenic (ALA) is an omega-3 fatty acid which plays an important role in human growth and development and in preventing diseases. Omega-3 fatty acids belong to a group of polyunsaturated fatty acids essential for human growth, development, prevention of numerous cardiovascular diseases, and maintenance of a healthy immune system. Our bodies do not synthesise ALA, therefore must be consumed from a dietary source (Uddin et al., 2014).

The minimum consumption of ALA is 0.3 g/day or 40 mg of eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) per 100 g or 100 kcal (European Union, 2010). Then, despite the reduction of ALA with fermentation, the ALA content in T2 provide 66.6% of the daily requirements recommended for daily consumption.

3.4. Microorganisms viability - bacterial concentrations during storage of sour cream

Populations of viable bacteria during the storage period are shown in Fig. 2.

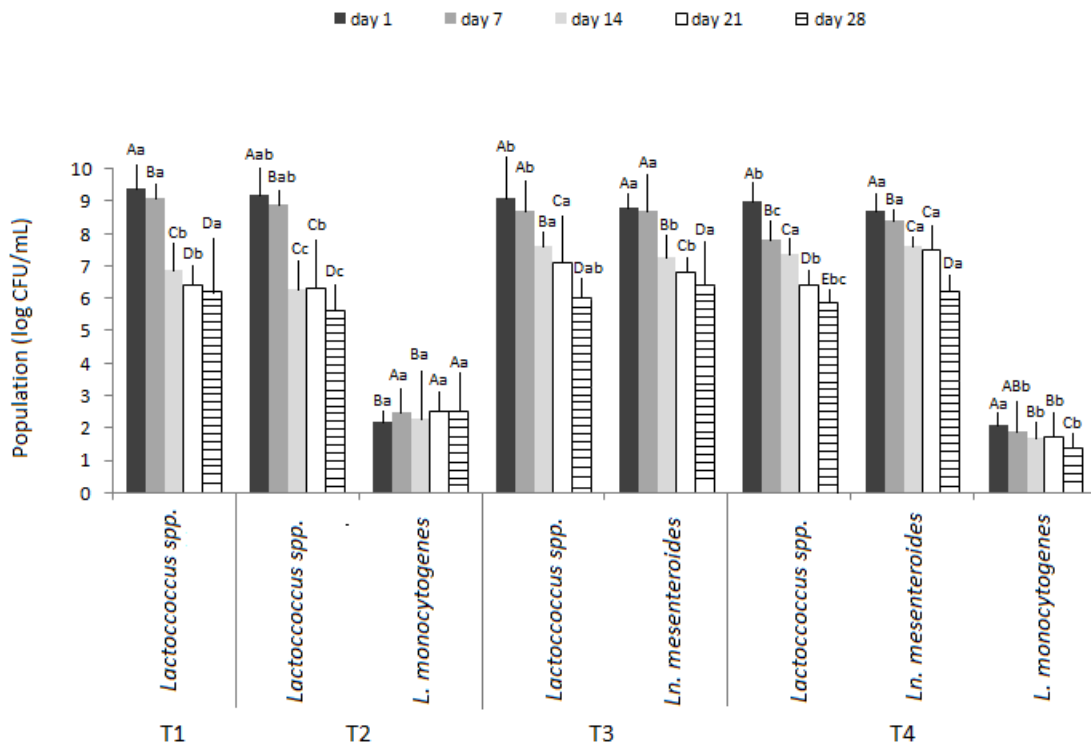


Fig. 2. Population (\log_{10} CFU/mL) of microorganisms in fermented cream treatments (20% fat) during refrigerated storage (Temperature ≤ 5 °C), (n = 4). T1 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (control); T2 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* and *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. Different capital letters indicate significantly different means during the storage time (comparison between days), and different lower-case letters indicate significantly different means of the culture in the different treatments on the same day of storage for the Tukey's test ($P < 0.05$).

Population of *Lactococcus spp.* ranged from 9.0 to 9.4 log₁₀ CFU/mL in all treatments at day 1, with no significant difference among the treatments (P>0.05). The counts of *Lactococcus spp.* decreased about 3.0 or 4.0 log cycles after 28 days storage in all fermented creams, being T2 the one that had the biggest reduction (4.4 log cycles), which coincides with the treatment in which there was an increase of 0.3 log₁₀ CFU/mL of *L. monocytogenes* during the same storage period. Antunes et al. (2007) using *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Bifidobacterium animalis* in sweet and dietetic buttermilk observed a decrease up to 2.0 log cycles in the *Lactococcus* count after 28 days storage.

Ln. mesenteroides decreased 2.4 log₁₀ CFU/mL in T3 and 2.5 log₁₀ CFU/mL in T4 after 28 days storage, while *Lactococcus spp.* had a larger decrease in the population in the same treatment, being 3.1 log₁₀ CFU/mL in T3 and 3.2 log₁₀ CFU/mL in T4, indicating a better survival of *Leuconostoc* in the medium. In buttermilk, Antunes et al. (2007) got an extra *Leuconostoc* count of 0.6 log₁₀ CFU/mL at the end of 28 days of storage.

L. monocytogenes could growth and increased significantly (P<0.05) in fermented cream during fermentation (T2) when it was inoculated with *Lactococcus spp.* However, there was a reduction of 0.7 log₁₀ CFU/mL for 28 days storage when *L. monocytogenes* was inoculated with *Lactococcus spp.* and *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* SJRP55 (T4). These results lead to the existence of bacteriogenic activity of *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* SJRP55 against *L. monocytogenes*, similar to that reported by Paula et al. (2015b) in milk.

4. Conclusions

The data obtained in this study allowed to point out different cultures used to produce fermented cream resulted in typical physicochemical characteristics for the products and bacterial metabolism modified the relative fatty acid composition of fermented cream. *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* SJRP55 had antimicrobial activity against *L. monocytogenes* in fermented cream, with a reduction up to 50% in the microbial population. Besides that, *Ln. mesenteroides subsp. mesenteroides* SJRP55 showed ability of CLA bioconversion, however this

conversion was impaired in the presence of *L. monocytogenes*. Further studies can help to better understand the shift of *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 metabolism into the production of bacteriocins or CLA bioconversion.

Acknowledgments

The authors wish to thank DSM Food Specialties (Jaguapé, São Paulo, Brazil) for the donation of *Lactococcus* spp. cultures, Dr. Daise Aparecida Rossi for her help and support in the Applied Animal Biotechnology Laboratory, Federal University of Uberlândia (UFU).

References

ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; BALTASAR, M. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, n. 143, p. 61-66, 2010.

ANTUNES, A. E. C.; GRAEL, E. T.; MORENO, I.; RODRIGUES, L. G.; DOURADO, F. M.; SACCARO, D. M.; LERAYER, A. L. S. Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a new fermented milk product. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, v. 1, p. 173-177, 2007.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed., AOAC International, Maryland, USA. 2005.

AOCS . Official method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography. In **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Champaign, IL, USA: American Oil Chemists Society, 1997.

ARAKAWA, K.; YOSHIDA, S.; AIKAWA, H.; HANO, C.; BOLORMAA, T.; BURENJARGAL, S.; MIYAMOTO, T. Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* 213M0 isolated from Mongolian fermented mare milk, airag. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 3, p. 449-56, 2016.

BALAKRISHNAN, G.; AGRAWAL, R. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Science Technology**, v. 51, n. 12, p. 4138–4142, 2014.

BHAT, Z. F.; BHAT, H. Milk and dairy products as functional foods: a review. **International Journal of Dairy Science**, v. 6, n.1, p. 1-12, 2011.

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 504-16, 2013.

BRASIL. Decreto n. 1.812, de 08 de fevereiro de 1996. **Aprova Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de fevereiro de 1996.

CHICH, J. F.; MARCHESSEAU, K.; GRIPON, J. C. Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: Purification and characterization. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 2-3, p. 169-174, 1997.

COCAIGN-BOUSQUET, M.; GARRIGUES, C.; NOVAK, L.; LINDLEY, N. D. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 108-116, 1995.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 11, p. 841-866, 2003.

DREVETS, D. A.; BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 53, n. 2, p. 151-165, 2008.

EL-SALAM, M.; EL-SHAFEI, K.; SHARAF, O. M.; EFFAT, B. A.; ASEM, F. M.; EL-AASAR, M. Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability

to synthesis conjugated linoleic acid. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 62-69, 2010.

EL-HOFI, M.; EL-TANBOLY, E.; ABD-RABOU, N. S. Industrial Application of Lipases in Cheese Making: A review. **Internet Journal of Food Safety**, v. 13, s/n, p. 293-302, 2011.

ESTRADA, J. D., BOENEKE C., BECHTEL P., SATHIVEL S. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5760-5769, 2011.

EUROPEAN UNION. Commission Regulation (EU) N. 116/2010. Amending Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council with regard to the list of nutrition claims. **Official Journal of the European Union. Document 32010R0116.**

FLORENCE, A. C. R., NOGUEIRA, M. O.; DELILE, A.; BÉAL, C., Survival of *Bifidobacterium* strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fatty acid composition. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 1-9, 2016.

FLORENCE, A. C. R.; BÉAL, C.; SILVA, R. C.; BOGSAN, C. S.; PILLEGGI, A. L.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Fatty acid profile, trans-octadecenoic, alfa-linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2207-2214, 2012.

FLÓREZ, A. B., CAMPEDELLI, I.; DELGADO, S.; ALEGRÍA, Á.; SALVETTI, E.; FELIS, G. E. Antibiotic susceptibility profiles of dairy *Leuconostoc*, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2016.

GORDON, J. Dairy Products. In: RANKEN, M. D.; KILL, R. C. (Orgs.). **Food Industries Manual**. New York: Springer Science & Business Media, 2012. p. 132-164.

GORISSEN, L.; LEROY, F.; DE VUYST, L.; DE SMET, S.; RAES, K. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1561-1574, 2015.

GUTIÉRREZ, L. F. Conjugated linoleic acid in milk and fermented milks: variation and effects of the technological processes. **Vitae, Revista de La Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**, v. 23, n. 2, p. 134-145, 2016.

HATI, S.; MANDAL, S.; PRAJAPATI, J. B. Novel starters for value added fermented dairy products. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 1, n. 1, p. 83-91, 2013.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. Leuconostoc characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 16, p. 467-494, 2004.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ISO. International Organization for Standardization. **Milk and milk products - Extraction methods for lipids and liposoluble compounds**. ISO 14156:2001-IDF 172:2001. ISO, Geneva, Switzerland, 2001.

ISO. International Organization for Standardization. **Milk fat -Preparation of fatty acid methyl esters**. ISO 15884-IDF 182:2002. ISO, Geneva, Switzerland, 2002.

JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid feeding and milk fat depression. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 623-642, 2014.

JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397-412, 2008.

JIN, K. Y.; EOM, H. J.; SEO, E. Y.; LEE, D. Y.; KIM, J. H.; HAN, N. S. Development of a chemically defined minimal medium for the exponential growth of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1518-1522, 2012.

KAMALY, K. M.; TAKAYAMA, K.; MARTH, E. H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, and their mutants. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 2, p. 280-290, 1990.

KONGO, J. M. Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: Past, present and future developments. In: KONGO, M. **Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. n.c.: Intech, 2013. p. 3-22.

LARSSON, S. C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 4, p. 894-900, 2005.

LASCANO, G. J.; ALENDE, M.; KOCH, L. E.; JENKINS, T. C. Changes in fermentation and biohydrogenation intermediates in continuous cultures fed low and high levels of fat with increasing rates of starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6334-6341, 2016.

LUNA, P.; MARTÍN-DIANA, A. B.; ALONSO, L.; FONTECHA, J. DE LA FUENTE, M. A. REQUENA, T. Effects of milk fat replacement by PUFA enriched fats on n-3 fatty acids, conjugated dienes and volatile compounds of fermented milks. **European Journal of Lipid Science and Technology**, n. 106, v. 7, p. 417-423, 2004.

MELLENTIN, J.; HEASMAN, M. A New era in food and health? In: MELLENTIN, J.; HEASMAN, M. **The Functional Foods Revolution: Healthy People, Healthy Profits?** London: Taylor and Francis, 2015. p. 1-34.

MENSINK, R. P. ZOCK, P. L.; KESTER, A. D. M.; KATAN, M. B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 5, p. 1146-1155, 2003.

NIEL, E. W. J. V.; HÄGERDAL, B. H. Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 5, p. 617-627, 1999.

PAULA, A. T., JERONYMO-CENEVIVA, A. B. TODOROV, S. D., PENNA, A. L. B. The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems. **Food Reviews International**, v. 31, p. 147-171, 2015a.

PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 1-13, 2014.

PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M., PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a

potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 899-910, 2015b.

RANKEN, M.D.; BAKER, C. G. J.; KILL, R. C. Fats and fatty foods. In. RANKEN, M.D.; BAKER, C. G. J.; KILL, R. C. **Food Industries Manual**. New York: Springer Science & Business Media, 1997. p. 277 - 315.

RÁNKY, M.; KOTELES, F.; NYAKAS, C.; BÁRDOS, G.; SZABO, A. A 90 day supplementation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) has benefits on health measures and exercise performance. **Baltic Journal of Sport and Health Sciences**, v. 104, n. 1, p. 36-43, 2017.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124-140, 2012.

RENES, 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**, v. 34, p. 340-346, 2017.

SANDERS, M. E. Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: GOLDBERG, I. (ed) **Functional foods: designer foods, pharmafoods and nutraceuticals**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 294-322.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHI, F.; WANG, Y.; LI, Y.; WANG, X. Mode of action of leuocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 9, p. 1551-1557, 2016.

SILVA, L. F.; CASELLA, T.; GOMES, E. S.; NOGUEIRA, M. C. L.; LINDNER, J. D.; PENNA, A. L. B. Diversity of Lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 2, p. 411-417, 2015.

SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

UDDIN, M. K.; JURAIMI, A. S.; HOSSAIN, M. S.; NAHAR, M. A. U.; ALI, E.; RAHMAN, M. M. Purslane Weed (*Portulaca oleracea*): A Prospective plant source of nutrition, omega-3 fatty acid, and antioxidant attributes. **The Scientific World Journal**, 2014, Article ID 951019, 6 pages. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/951019>>.

UNITED STATES OF AMERICA. U. S. Department of Food and U.S. Department of Health and Human Services. **Dietary Guidelines for American 2010**. 7th Edition, Washington DC. Government Printing Office. 2010.

VIEIRA, C. P.; CABRAL, C. C.; LIMA, B. R. C. C.; PASCHOALIN, V. M. F.; LEANDRO, K. C.; CONTE-JUNIOR, 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**, v. 31, p. 172-178, 2017.

YANG, B.; CHEN, H.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Q.; CHEN, W. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 15, n. nc, p. 314-325, 2015

YILMAZ-ERSAN, L.; OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; SAHIN, S. The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 7, n. 1, p. 22-25, 2016.

YILMAZ-ERSAN, L.; OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; TURAN, M. A.; TASKIN, M. B. Probiotic cream: viability of probiotic bacteria and chemical characterization. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 1- 9, 2017.

CONCLUSÃO GERAL

O uso de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em creme fermentado apresentou resultados promissores, tais como elevado teor de ácidos orgânicos, produção de bacteriocinas com ação bacteriostática sobre *Listeria monocytogenes* quando presente em baixa concentração, atividade antioxidante significativamente maior que nos demais tratamentos, além de exibir capacidade de bioconversão de CLA.

Estes resultados representam o importante potencial de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 para ser explorado comercialmente para o desenvolvimento de produtos fermentados inovadores e funcionais.

Os trabalhos futuros a serem desenvolvidos podem incluir a avaliação da textura e da rancificação da gordura durante o tempo de armazenagem, assim como a avaliação sensorial dos cremes fermentados.

ANEXO 1

Seleção de meios de contagem seletiva dos micro-organismos e definição da população inicial a usada nos experimentos

Antes de avaliar a viabilidade dos micro-organismos, foi necessário selecionar meios de cultura seletivos que permitissem a contagem de cada espécie separadamente após a fermentação do creme. Foram testados os seguintes meios:

- MRS_{pH4,5}: MRS ágar acidificado com ácido acético até pH 4,5 em aerobiose a 30 °C.
- MRS-V (MRS ágar + vancomicina) com três concentrações de antibiotico: 15, 30, 60 e 100 µg/mL; em aerobiose a 30 °C.
- MRS ágar em anaerobiose a 30 °C.
- M17 ágar em aerobiose a 30 °C.
- BHI ágar em aerobiose a 30 °C.
- Listeria Enrichment Broth (LEB) + 1,5% ágar padrão para contagem (PCA) em aerobiose a 30 °C.

As culturas: 1. Cultura mista comercial de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*; 2. *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; 3. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) foram plaqueadas (10 µL) por superfície, separadamente em todos os meios de cultura a serem testados, para verificar em qual era possível permitir o crescimento isolado de cada uma das culturas.

As culturas puras dos micro-organismos apresentaram uma contagem de 7,80 log UFC/mL de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 em Agar MRS, 8,05 log UFC/mL de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* em Agar MRS e 7,45 log UFC/mL de *L. innocua* ATCC 33090 e 7,80 log UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 15313 em em Agar BHI.

Para o meio de cultura ser considerado seletivo e eficaz, a contagem em UFC/mL nos meios testados deveria ser equivalente à contagem obtida quando a

cepa foi inoculada isolada no meio de referência: MRS para BAL (*Lactococcus* spp. e *Leuconostoc*) e BHI para *Listeria* sp.

Tabela A1. Contagem de células viáveis (log UFC/mL) em diferentes meios de cultura.

Meios de cultivo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactococcus sp.</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MRS AE	7,8 ± 0,33*	8,0 ± 0,28**	7,2 ± 0,35	7,4 ± 0,14
MRS ANE	ND	4,4 ± 0,12	6,8 ± 0,17	5,0 ± 0,47
MRS _{pH 4,5}	ND	ND	ND	ND
M17	7,4 ± 0,09	8,0 ± 0,07*	6,5 ± 0,07	6,2 ± 0,28
BHI	6,8 ± 0,14	6,5 ± 0,53	7,4 ± 0,01*	7,4 ± 0,14*
LEB + 1,5 % PCA	ND	ND	7,4 ± 0,34**	7,4 ± 0,14**
MRS-V 15 µg/mL	7,7 ± 0,59	2,1 ± 0,29	1,7 ± 0,88	1,9 ± 0,11
MRS-V 30 µg/mL	7,8 ± 0,13**	ND	ND	ND
MRS-V 60 µg/mL	7,8 ± 0,09	ND	ND	ND
MRS-V 100 µg/mL	7,6 ± 0,02	ND	ND	ND

AE: aerobiose; ANE: anaerobiose; LEB: *Listeria Enrichment Broth*; MRS-V: MRS adicionado de vancomicina. * Valores tidos como referência para cada micro-organismo. **Contagem mais próxima à do meio de referência, utilizada para selecionar o meio de cultura seletivo a ser utilizado nos experimentos. ND: Não houve crescimento de colônias.

A população dos micro-organismos presentes nos meios de cultura seletivos está apresentada na Tabela A1. De acordo com os resultados apresentados, o meio MRS adicionado de cloridrato de vancomicina (antibiótico), nas três concentrações testadas, incubado em aerobiose a 30 °C durante 72 h foi considerado adequado para enumeração seletiva de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, uma vez que impediu o crescimento de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e de *Lc. lactis* subsp.

cremoris, quando comparado ao ágar MRS sem o antibiótico. Assim, o meio MRS-V 30 µg/mL foi escolhido como meio seletivo para contagem de *Ln. mesenteroides* neste trabalho.

Fatma e Benmechernene (2013) isolaram 83 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* de outras BAL e micro-organismos indicadores presentes em leite de camelo utilizando ágar MRS + 30 µg/mL de vancomicina em diferentes temperaturas (15, 30 e 37 °C). Mathot et al. (1994) também conseguiram isolar *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* em cultura mista com *Lactococcus* sp. utilizando MRS e NL ágar adicionados de 20 µg/mL de vancomicina.

O meio LEB adicionado de 1,5% de ágar padrão para contagem permitiu apenas o crescimento tanto de *L. innocua*, quanto de *L. monocytogenes*, sem o desenvolvimento das BAL, sendo selecionado para a contagem de *Listeria* sp.

A contagem da cultura de *Lactococcus* sp. foi feita por diferença da seguinte maneira: Contagem Total em MRS ágar – contagem de *Ln. mesenteroides* – contagem *Listeria* sp.

Tabela A2. Meios de cultura e condições de cultivo selecionados para análise de viabilidade das culturas em creme fermentado.

Micro-	Meio de cultura	Temperatura de	Tempo de	Atmosfera
<i>Listeria</i>	Ágar PCA + LEB	30	72	AE
<i>Lactococcus</i>	MRS	30	72	AE
<i>Leuconostoc</i>	MRS + 30 µg/mL vancomicina*	30	72	AE

ANEXO 2

Testes para definição da população e da espécie de *Listeria* a ser inoculada

Para avaliar a ação das bacteriocinas produzidas por *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 contra *Listeria* sp, amostras de creme de leite foram fermentadas até pH 4,5 com diferentes culturas, e inoculados com diferentes populações de *Listeria* sp. (5 testes), variando de 10^1 até 10^5 UFC/mL. Em seguida, foi efetuada a contagem de micro-organismos usando as condições estabelecidas na Tabela A2.

Na Tabela A3 estão descritos os resultados de contagem dos testes A1, A2, A3, A4 e A5, em que diferentes populações de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* foram inoculadas em creme de leite, juntamente com a cultura láctea (*starter*) e *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, conforme o experimento, seguida de fermentação a 25 °C.

O teste A1, em que o creme de leite foi fermentado somente com a cultura mista comercial de *Lactococcus* sp., serviu como controle para os demais testes. A contagem de *Lactococcus* sp. durante o armazenamento refrigerado variou de 9,2 log UFC/mL (dia 1) a 6,0 log UFC/mL (dia 28).

Os resultados do teste A2 mostraram a existência de efeito bacteriogênico de *Lactococcus* sp. sobre a *Listeria innocua* apenas na amostra inoculada com 10^1 UFC/mL do patógeno e a partir de 7 dias de armazenamento. Nas amostras inoculadas com maiores populações de *Listeria innocua* (10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC/mL), não houve redução da população durante o armazenamento refrigerado.

No teste A3 foi observado que, com a presença de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, houve ação inibitória contra *Listeria innocua* na amostra de menor inoculação inicial do patógeno (10^1 UFC/mL) logo no primeiro dia após a fermentação. Não foi constatado presença de *Listeria innocua* durante todo o período de armazenamento para esta amostra, sendo que no tratamento sem *Ln. mesenteroides* (A2) esse efeito só foi alcançado a partir de 7 dias de armazenamento. Houve redução das contagens de *Listeria innocua* durante todo o

tempo de armazenamento quando o nível de contaminação inicial foi de até 10^3 UFC/mL.

No teste A4, foi observado efeito bacteriogênico de *Lactococcus* sp. sobre *Listeria monocytogenes* na amostra inoculada com população inicial de 10^1 UFC/mL de *Listeria* a partir de 7 dias de estocagem. Quando a inoculação do patógeno foi de 10^2 UFC/mL, houve redução de 0,5 log UFC/mL após 14 dias de estocagem. Para maiores populações de *L. monocytogenes* não foi constatada ação bacteriogênica.

No teste A5 foi observado o efeito bacteriogênico de *Lactococcus* sp. sobre a *L. monocytogenes*, porém com notável vantagem pela presença de *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55, principalmente na amostra inoculada com 10^1 UFC/mL de *L. monocytogenes*. Neste caso, a cepa patogênica foi inibida já durante a fermentação, não sendo detectada a presença de células viáveis no primeiro dia de estocagem. A amostra fermentada com contaminação inicial de 10^2 UFC/mL apresentou redução de 1 log ao longo do período de estocagem.

Diante dos bons resultados de inibição apresentados e maior acervo bibliográfico para embasamento científico, foi decidido que usaríamos a população de 10^2 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 para a produção do creme fermentado para as avaliações finais.

Tabela A3. População de micro-organismos no teste para avaliar a ação das bacteriocinas sobre *Listeria* sp.

Inoculação de <i>Listeria</i> sp. (log UFC/mL)	Contagens (log UFC/mL)	Tempo de armazenamento (dias)				
		1	7	14	21	28
A1:	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,13 ^a	9,0 ± 0,19 ^a	6,7 ^b ± 0,12	6,8 ^b ± 0,31	6,0 ^c ± 0,25
A2: 10 ¹	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,53 ^a	8,9 ± 0,29 ^a	6,3 ± 0,31 ^b	6,5 ± 0,19 ^b	5,8 ± 1,13 ^{bc}
	<i>L. innocua</i>	1,7 ± 0,42 ^a	<1,0 ^b	<1,0 ^b	<1,0 ^b	<1,0 ^b
10 ²	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,18 ^a	9,0 ± 0,10 ^a	6,3 ± 0,21 ^b	6,5 ± 1,17 ^b	5,7 ± 0,26 ^c
	<i>L. innocua</i>	2,2 ± 0,40 ^a	2,6 ± 0,33 ^a	2,4 ± 1,29 ^a	2,6 ± 0,56 ^a	2,6 ± 0,37 ^a
10 ³	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,11 ^a	9,0 ± 0,13 ^a	6,4 ± 0,18 ^b	6,7 ± 0,21 ^b	5,8 ± 0,27 ^c
	<i>L. innocua</i>	3,3 ± 0,64 ^a	3,4 ± 0,48 ^a	3,4 ± 0,12 ^a	3,6 ± 0,30 ^a	3,7 ± 0,47 ^a
10 ⁴	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,16 ^a	9,0 ± 0,20 ^a	6,5 ± 0,41 ^b	6,5 ± 1,03 ^b	5,6 ± 0,82 ^c
	<i>L. innocua</i>	4,4 ± 1,77 ^a	4,4 ± 0,65 ^a	4,4 ± 0,49 ^a	4,5 ± 2,11 ^a	4,7 ± 1,33 ^a
10 ⁵	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,13 ^a	9,0 ± 0,48 ^a	6,4 ± 0,55 ^b	6,3 ± 0,19 ^b	5,5 ± 0,25 ^c
	<i>L. innocua</i>	5,5 ± 1,12 ^b	5,6 ± 0,52 ^b	6,5 ± 0,18 ^a	5,6 ± 0,23 ^a	6,0 ± 0,37 ^a
A3: 10 ¹	<i>Lactococcus</i> sp.	8,7 ± 0,20 ^a	9,2 ± 0,76 ^a	7,8 ± 0,21 ^b	7,2 ± 0,51 ^c	7,0 ± 0,22 ^c
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,6 ± 1,14 ^a	8,3 ± 1,30 ^a	8,2 ± 0,66 ^a	8,0 ± 0,50 ^a	7,9 ± 1,13 ^a
	<i>L. innocua</i>	<1,0 ^a	<1,0 ^a	<1,0 ^a	<1,0 ^a	<1,0 ^a
10 ²	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,40 ^a	9,2 ± 0,75 ^a	7,7 ± 0,82 ^b	6,9 ± 0,33 ^c	6,7 ± 2,03 ^c
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,7 ± 1,18 ^a	8,4 ± 0,76 ^{ab}	8,3 ± 0,28 ^{ab}	8,0 ± 0,60 ^b	8,0 ± 0,44 ^b
	<i>L. innocua</i>	2,4 ± 0,17 ^a	2,1 ± 1,15 ^a	2,3 ± 0,58 ^a	2,2 ± 0,50 ^a	2,0 ± 0,27 ^a
10 ³	<i>Lactococcus</i> sp.	9,3 ± 0,86 ^a	9,3 ± 0,55 ^a	7,8 ± 0,62 ^b	7,0 ± 0,49 ^c	6,8 ± 0,08 ^c
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,7 ± 0,70 ^a	8,6 ± 0,7 ^a	8,4 ± 0,35 ^{ab}	8,1 ± 0,13 ^{bc}	7,9 ± 0,20 ^c
	<i>L. innocua</i>	3,2 ± 0,55 ^a	3,3 ± 0,82 ^a	3,0 ± 1,03 ^a	2,9 ± 0,18 ^a	2,9 ± 0,32 ^a
10 ⁴	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,51 ^a	8,9 ± 0,38 ^{ab}	8,2 ± 0,17 ^b	7,0 ± 1,10 ^c	6,8 ± 0,14 ^c
	<i>Ln. mesenteroides</i>	7,8 ± 0,19 ^a	8,4 ± 0,16 ^a	8,4 ± 0,83 ^a	8,1 ± 0,65 ^a	7,9 ± 0,08 ^a
	<i>L. innocua</i>	4,0 ± 0,21 ^a	4,3 ± 1,13 ^a	4,3 ± 0,72 ^a	4,1 ± 0,55 ^a	4,3 ± 1,03 ^a
10 ⁵	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,44 ^a	9,2 ± 0,36 ^a	8,0 ± 0,19 ^b	7,1 ± 1,11 ^c	6,8 ± 0,15 ^c
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,7 ± 0,39 ^a	8,4 ± 0,13 ^{ab}	8,3 ± 0,15 ^{ab}	8,0 ± 0,27 ^b	7,8 ± 1,22 ^b
	<i>L. innocua</i>	4,9 ± 0,50 ^b	4,9 ± 0,61 ^b	5,5 ± 0,85 ^a	5,2 ± 1,69 ^{ab}	5,4 ± 0,58 ^a

Continua

Inoculação de <i>Listeria</i> sp. (log UFC/mL)	Contagens (log UFC/mL)	Tempo de armazenamento (dias)					
		1	7	14	21	28	
A4: 10 ¹	<i>Lactococcus</i> sp.	9,3 ± 0,96 ^a	8,9 ± 1,12 ^a	6,6 ± 0,70 ^b	6,0 ± 0,50 ^b	6,0 ± 0,77 ^b	
	<i>L. monocytogenes</i>	2,4 ± 0,81 ^a	< 1,0 ^b	< 1,0 ^b	< 1,0 ^b	< 1,0 ^b	
	10 ²	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,23 ^a	8,8 ± 0,67 ^a	6,9 ± 0,89 ^b	6,3 ± 0,52 ^c	6,0 ± 0,36 ^c
		<i>L. monocytogenes</i>	3,1 ± 1,07 ^a	2,5 ± 0,12 ^b	2,6 ± 0,17 ^b	2,5 ± 0,44 ^b	2,5 ± 0,24 ^b
	10 ³	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,58 ^a	8,6 ± 1,20 ^b	6,5 ± 0,83 ^c	6,2 ± 0,80 ^{cd}	6,0 ± 0,62 ^d
		<i>L. monocytogenes</i>	3,5 ± 0,66 ^a	3,4 ± 0,72 ^a	3,6 ± 0,52 ^a	3,4 ± 0,58 ^a	3,5 ± 0,91 ^a
	10 ⁴	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 1,14 ^a	8,8 ± 0,84 ^a	7,2 ± 0,50 ^b	6,6 ± 0,61 ^c	6,3 ± 0,47 ^c
		<i>L. monocytogenes</i>	4,5 ± 0,46 ^a	4,4 ± 0,12 ^a	4,4 ± 0,08 ^a	4,4 ± 0,33 ^a	4,4 ± 0,37 ^a
	10 ⁵	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,60 ^a	8,9 ± 0,45 ^a	7,0 ± 1,17 ^b	7,0 ± 1,24 ^b	6,7 ± 0,84 ^b
		<i>L. monocytogenes</i>	5,0 ± 0,52 ^b	5,5 ± 0,55 ^{ab}	5,7 ± 0,90 ^a	5,5 ± 0,43 ^{ab}	5,4 ± 0,50 ^{ab}
A5: 10 ¹	<i>Lactococcus</i> sp.	9,3 ± 0,87 ^a	8,9 ± 1,23 ^a	7,6 ± 1,16 ^b	6,9 ± 0,68 ^c	6,7 ± 0,54 ^c	
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,8 ± 0,66 ^a	8,4 ± 0,11 ^{ab}	8,3 ± 0,17 ^b	8,1 ± 0,30 ^b	8,0 ± 0,21 ^b	
	<i>L. monocytogenes</i>	< 1,0 ^a	< 1,0 ^a	< 1,0 ^a	< 1,0 ^a	< 1,0 ^a	
	10 ²	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,09 ^a	9,0 ± 0,28 ^a	7,4 ± 0,22 ^b	6,7 ± 0,19 ^c	6,4 ± 0,29 ^c
		<i>Ln. mesenteroides</i>	8,8 ± 1,11 ^a	8,6 ± 0,65 ^{ab}	8,4 ± 0,35 ^{abc}	8,2 ± 0,50 ^{bc}	8,0 ± 0,62 ^c
	10 ³	<i>L. monocytogenes</i>	2,2 ± 0,93 ^a	2,2 ± 1,22 ^a	1,9 ± 1,34 ^a	1,4 ± 0,17 ^b	1,1 ± 0,64 ^b
		<i>Lactococcus</i> sp.	9,4 ± 0,55 ^a	9,1 ± 0,27 ^a	8,5 ± 1,12 ^b	7,3 ± 0,28 ^c	7,0 ± 0,22 ^c
	10 ⁴	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,9 ± 0,43 ^a	8,3 ± 0,47 ^b	8,4 ± 0,82 ^{ab}	8,1 ± 0,51 ^b	7,9 ± 0,19 ^b
		<i>L. monocytogenes</i>	2,3 ± 1,14 ^b	3,3 ± 0,71 ^a	3,0 ± 0,66 ^a	3,0 ± 1,16 ^a	3,1 ± 0,97 ^a
	10 ⁴	<i>Lactococcus</i> sp.	9,2 ± 0,73 ^a	9,0 ± 0,64 ^a	7,6 ± 0,69 ^b	6,9 ± 0,41 ^c	6,3 ± 0,51 ^d
		<i>Ln. mesenteroides</i>	8,8 ± 0,17 ^a	8,3 ± 0,31 ^b	8,1 ± 0,09 ^{bc}	7,9 ± 0,26 ^{bc}	7,8 ± 0,20 ^c
		<i>L. monocytogenes</i>	4,1 ± 0,33 ^b	4,2 ± 0,14 ^a	4,2 ± 0,32 ^a	4,3 ± 0,53 ^a	4,5 ± 0,77 ^a

10 ⁵	<i>Lactococcus</i> sp.	9,1 ± 0,82 ^a	9,3 ± 0,07 ^a	7,7 ± 1,12 ^b	6,9 ± 1,30 ^c	6,0 ± 0,19 ^d
	<i>Ln. mesenteroides</i>	8,8 ± 0,57 ^a	8,3 ± 0,52 ^b	8,0 ± 0,16 ^{bc}	7,9 ± 0,16 ^c	7,6 ± 0,06 ^c
	<i>L. monocytogenes</i>	5,0 ± 0,21 ^c	5,4 ± 0,63 ^b	5,3 ± 0,55 ^b	5,7 ± 0,17 ^a	6,0 ± 1,28 ^a

ANEXO 3

Tabela A4. Teores (mg/mL) de ácidos orgânicos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência nos cremes fermentados.

Ácidos	1 dia	28 dias
Piruvico		
T1	0,23 ± 0,01 ^{Ab}	0,24 ± 0,00 ^{Ab}
T2	0,16 ± 0,00 ^{Ac}	0,16 ± 0,00 ^{Ad}
T3	0,27 ± 0,01 ^{Aa}	0,26 ± 0,00 ^{Aa}
T4	0,17 ± 0,01 ^{Ac}	0,19 ± 0,00 ^{Ac}
Lático		
T1	859,7 ± 8,17 ^{Bc}	888,82 ± 5,42 ^{Ac}
T2	795,85 ± 3,21 ^{Bd}	854,38 ± 7,09 ^{Ad}
T3	1166,79 ± 2,67 ^{Aa}	1118,93 ± 1,96 ^{Ba}
T4	1066,22 ± 2,67 ^{Bb}	1096,09 ± 4,88 ^{Ab}
Fórmico		
T1	444,16 ± 4,95 ^{Bc}	537,09 ± 6,31 ^{Aa}
T2	461,61 ± 3,92 ^{Bb}	501,12 ± 6,68 ^{Ab}
T3	509,46 ± 0,93 ^{Aa}	505,72 ± 10,69 ^{Ab}
T4	280,89 ± 0,80 ^{Bd}	482,33 ± 3,27 ^{Ab}
Ácético		
T1	27,14 ± 1,39 ^{Ac}	29,53 ± 0,79 ^{Ac}
T2	27,98 ± 1,39 ^{Bc}	33,05 ± 1,52 ^{Ac}
T3	197,34 ± 3,50 ^{Aa}	200,91 ± 4,11 ^{Ab}
T4	188,25 ± 2,64 ^{Bb}	213,98 ± 1,25 ^{Aa}

T1 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (controle); T2 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *L. monocytogenes* ATCC 15313; T3 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55; T4 - Cultura mista de *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* + *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP55 + *L. monocytogenes* ATCC 15313. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha e letras minúsculas iguais na mesma coluna, para um mesmo ácido, não se diferenciam pelo teste de Tuckey a 5% designificância.