

APLICAÇÃO DE NISINA COMO REVESTIMENTO COMESTÍVEL EM QUEIJO COALHO

MARLENE NUNES DAMACENO¹, MARIA GILNARA LIMA BANDEIRA¹, JONATAS ALMEIDA SILVA¹, WECTON RIVAS SOUSA COSTA¹, JOYCIANE DA SILVA GOMES¹, VANDESONIA MARIA DE SOUSA OLIVEIRA¹, WESLEY DE SOUZA² PAIVA, FRANCISCO ERNESTO DE SOUZA NETO².

¹ Instituto Federal do Ceará (IFCE) - Campus Limoeiro do Norte.

² Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Correspondência: Laboratório de Biotecnologia Industrial Avenida Francisco Mota, 572 - Costa e Silva – Mossoró 59625900, RN – Brasil
Email: wdsipaiva@gmail.com

RESUMO

Os alimentos são ricos em substâncias que favorecem o crescimento microbiano, durante seu processamento esses alimentos podem se contaminar, por isso, a segurança alimentar é tão preconizada nos dias de hoje. O queijo de coalho é o queijo obtido pela coagulação do leite por meio do coalho, complementado ou não pela ação de bactérias lácticas, esse tipo de queijo é responsável por cerca de 10 milhões de reais anuais em negócios na região do nordeste brasileiro e sua conservação é fundamental pra cadeia produtiva da região. Atualmente, muitos pesquisadores têm estudado mecanismos de evitar a proliferação microbiana no queijo de coalho, a utilização de bacteriocinas é uma delas, são compostos de natureza proteica que possuem função bacteriostática e bactericida. O presente trabalho tem como objetivo a utilização de nisina como revestimento de queijo de coalho visando a diminuição da proliferação microbiana do queijo. O queijo foi coletado em queijeiras da região (2 Kg), posteriormente foi cortado em pedaços de 250 g e imergidos na solução de revestimento (2% de amido e 12,5 mg de Nisina/Kg de queijo), após isso, os queijos foram incubados com refrigeração controlada e posteriormente foram feitas as análises microbiológicas com os tempos de 0, 10 e 20 dias. Os resultados demonstraram a eficiência do revestimento de nisina, que inibiu o crescimento de *Staphylococcus* coagulase positivo, em detrimento ao queijo controle (sem revestimento).

Palavras- chave: Segurança alimentar; Nisina, Queijo de coalho.

APPLICATION OF EDIBLE COATING ON HOW NISIN RENNET CHEESE

ABSTRACT

The foods are rich in substances which favor microbial growth during food processing can contaminate these, so as food security is recommended these days. The rennet cheese is cheese obtained by coagulation of milk by rennet, complemented or not by the action of lactic acid bacteria, this type of cheese is responsible for about 10 million dollars in annual business in the Brazilian northeast region and its conservation supply chain is critical to the region. Currently, many researchers have studied mechanisms prevent microbial proliferation in the rennet cheese, the use of bacteriocins is one, are composed of protein nature that have bacteriostatic and bactericidal function. This paper aims to use nisin as a coating of cheese curds, aiming to reduce microbial proliferation cheese. The cheese was collected in cheese factories the region (2 Kg) was subsequently cut into pieces of 250 g and immersed in the coating solution (2% starch and 12.5 mg nisin/kg of cheese), after that, the cheeses were incubated with controlled cooling and subsequent microbiological analyzes to the times of 0, 10 and 20 days were done. The results demonstrated the efficiency of the coating nisin, which inhibited the growth of *Staphylococcus* coagulase positive, rather than the control cheese (uncoated).

Keywords: Food security; Nisin; Rennet cheese.

INTRODUÇÃO

O número crescente e a gravidade de doenças transmitidas por alimentos, em todo o mundo, têm aumentando consideravelmente o interesse do público em relação à segurança alimentar (1). Todos os alimentos podem ser deteriorados entre a colheita, o processamento e a estocagem antes do consumo (2).

O queijo obtido por coagulação do leite por meio de coalho, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, classificado como queijo de média a alta umidade, é denominado de queijo coalho (3). No Nordeste do Brasil a maior parte da produção de queijo coalho é obtida em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza essa atividade como importante no âmbito social e econômico (4).

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos. O queijo de coalho, por ser elaborado, em quantidade considerável, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade (5).

Vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo coalho relataram ocorrência de micro-organismos patogênicos e contagem de micro-organismos deterioradores em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação. Dentre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (6).

As bacteriocinas são compostos de natureza protéica (proteínas ou peptídeos), sintetizadas ribossomicamente por bactérias Gram-positivas e negativas como parte do sistema de defesa do microrganismo. Apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias tais como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (7).

A ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, dependendo mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana, como a fase de crescimento celular, e de suas condições de crescimento, do que uma característica relacionada a sua própria molécula (8). Podem, dessa forma, promover um efeito letal bactericida, sem lise celular

(9-12) ou com lise celular (bacteriolítico) (10, 13-15) ou, ainda, inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (10).

A nisina é um tipo de bacteriocina que possui capacidade de inibir grande parte das bactérias gram positivas presentes em queijos e sua utilização na indústria alimentar é aprovada mundialmente por ser considerada totalmente segura em alimentos. Bactérias gram negativas, fungos filamentosos e leveduras são menos sensíveis à ação da nisina, no entanto, foi relatado a efetividade deste composto contra bactérias gram-negativas e fungos filamentosos quando usado em combinação com o EDTA, que é um agente quelante (16,17).

Uma propriedade química importante da nisina é sua considerável resistência térmica, especialmente em valores de pH ácidos, suportando aquecimento de 115 °C durante 20 minutos com inativação inferior a 5 % em pH 3,0 (18). Objetivou-se com este trabalho aplicar um revestimento de nisina em queijo coalho e avaliar sua ação inibitória no crescimento microbiano durante o período de armazenamento refrigerado de 20 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Planta Piloto de Leite e Derivados e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE, *campus* Limoeiro do Norte - CE. O queijo utilizado no trabalho foi adquirido em uma queijaria da região, em um único bloco com aproximadamente 2Kg, que foi produzido no mesmo dia do início das análises. Em seguida, foi transportado em caixa isotérmica até o local do experimento.

Revestimento do queijo

O queijo foi cortado, assepticamente, em pedaços de aproximadamente 250g e imersos na solução de revestimento. O revestimento foi preparado utilizando 2% de amido e 12,5 mg de Nisina/Kg de queijo. Para seu preparo, utilizou-se água destilada que misturada junto ao amido foi aquecida, mexendo constantemente, até atingir 70°C. Após esfriar, adicionou-se a nisina diluída em água destilada. Depois de imersos, os queijos secaram a temperatura ambiente, em câmaras assépticas. Seguida a secagem, os queijos revestidos e queijos controle, sem o revestimento, foram armazenados sob refrigeração.

Análises Microbiológicas

Os queijos, revestidos e controle, foram analisados durante 20 dias de armazenamento refrigerado, nos tempo 0, 10 e 20 dias.

Para as análises de contagem de *Staphylococcus* coagulase positivos, realizou-se em triplicata a pesagem de 10g de queijo e diluições seriadas em solução estéril de NaCl 0,85% até obter a diluição 10^{-3} . Após as diluições, retirou-se 0,1ml de cada diluição, adicionou-se em placas contendo Ágar Baird-Parker acrescido de emulsão de gema de ovo. Depois de secas, as placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. Depois do período de incubação, foi realizada a contagem e a seleção de colônias típicas. Estas colônias foram semeadas em Caldo BHI e incubadas por 24 horas a 36°C. Em seguida, foi realizado o teste de coagulase utilizando o plasma de coelho (19).

Para as análises de contagem de Coliformes totais e Termotolerantes, de cada diluição citada anteriormente foram retirados 1ml e adicionados em caldo lactosado, em seguida incubados a 36°C por 48 horas. Quando ocorria formação de gás, os tubos positivos eram repicados para o Caldo Bile Verde Brilhante e incubados a 36°C por 48 horas, para a contagem de coliformes totais. Na ocorrência de tubos positivos de Caldo Bile Verde Brilhante, os mesmos eram repicados em caldo EC e incubados a 45°C por 48 horas para a contagem de coliformes termotolerantes (19).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias do grupo *Staphylococcus* spp. isoladas apresentaram resultados positivos no teste de coagulase. Na Figura 1 estão os resultados das análises microbiológicas dos queijos coalho revestido com nisina e controle, com as médias da contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positivo.

Tempo	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo*	
	Controle	Revestido
0 dias	1,25	1,25
10 dias	5,40	5,05
20 dias	5,10	4,90

Figura 1 – Médias e desvio padrão em $\log\text{UFC.g}^{-1}$ da contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positivo no queijo revestido com nisina e controle, durante 20 dias de armazenamento refrigerado. * $\log\text{UFC.g}^{-1}$.

O elevado índice de *Staphylococcus* Coagulase Positivo no queijo em estudo pode estar associado à mastite bovina, obtenção inadequada do leite e hábitos higiênicos insatisfatórios, principalmente na manipulação dos queijos durante o processo de fabricação (20).

A utilização da nisina como revestimento em queijo coalho provocou redução na contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, quando comparado ao queijo coalho controle, durante o período de armazenamento proposto, que é maior do que o prazo de validade do queijo coalho regulamentado pela legislação como 10 dias (21). Sobral (2012) analisando queijos artesanais da região do Cerrado verificou que as contagens de *S. aureus* em queijos com aplicação da dose de 500 UI.mL⁻¹ de nisina foi estatisticamente igual as contagens dos queijos controle, ao longo do período de 60 dias de maturação (22). O resultado do presente estudo foi semelhante aos estudos em queijos artesanais das regiões de Araxá (23) e Canastra (24), onde a nisina foi eficaz no combate aos *Staphylococcus* coagulase positivo.

Isso comprova que a aplicação de nisina deve ser estudada caso a caso, pois a microbiota de cada região possui resistência distinta à essa bacteriocina. Apenas a utilização de nisina como revestimento não garante que os queijos artesanais sejam seguros. Para que isso ocorra, é necessário que a contagem inicial de *Staphylococcus* spp. no leite seja baixa e que se pratique as boas práticas de fabricação, pois a eficácia da nisina depende da contagem inicial (25).

Como podemos visualizar na Figura 2, o número mais provável de coliformes totais e termotolerantes foi reduzido durante o período de armazenamento, sendo verificada uma maior redução no queijo controle. Resultados semelhantes foram encontrados, verificando que os coliformes dos queijos Minas artesanais Canastra foram inferiores nos queijos do grupo-controle quando comparadas aos queijos adicionados de 100 UI.mL⁻¹ e 500UI.mL⁻¹ de nisina que, por sua vez, não diferiram entre si (23).

Tempo	Coliformes*			
	Totais		Termotolerantes	
	Controle	Revestido	Controle	Revestido
0 dias	1,2	1,2	Ausentes	Ausentes
10 dias	0,3	0,73	Ausentes	Ausentes
20 dias	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes

Figura 2 – Número mais provável de Coliformes totais e termotolerantes no queijo revestido com nisina e controle durante 20 dias de armazenamento refrigerado. *NMP/g.

A nisina não atua sobre gram negativos (24,16,26), dessa forma, não reduz ou impede a multiplicação de enterobactérias. Com isso, contribui indiretamente para o aumento de suas contagens na medida em que inibe gram positivos, fazendo com que a competição entre esses micro-organismos diminua (27). Portanto, o uso de nisina não garante a qualidade do queijo, faz-se necessário manter as condições de higiene e Boas Práticas na fabricação e também na obtenção do leite. A presença de coliformes indica a qualidade higiênico-sanitária deficiente do produto.

CONCLUSÃO

A aplicação de apenas nisina não garante a qualidade de queijos coalho, pois a mesma não inibe bactérias gram negativas, possibilitando o favorecimento da sua multiplicação pela redução do número de micro-organismos que competem pelo mesmo substrato. Além disso, de acordo com diversos trabalhos, sua eficácia contra *Staphylococcus* está relacionada à contagem inicial, assim, seu emprego deve ser aliado às boas práticas de fabricação para que se obtenha um produto que atenda aos padrões estabelecidos pela legislação e que seja seguro para a população.

Com isso, é possível concluir que estudos devem ser realizados para encontrar a quantidade ideal de nisina que possibilite o controle de gram positivos sem favorecer o crescimento de gram negativos no queijo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Atmed, 2002. 424 p.
- (2) GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelflife. *Int. J. Food Microbiol*, 1996. 33, 51-54.
- (3) BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996, Seção 1, p.3977-3978.
- (4) PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Quim. Nova*, v.27, p.293-300, 2004.
- (5) FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, É. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 23 (Supl.): 162-165, dez. 2003.
- (6) CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.27, p.205-214, 2007.
- (7) NES, I. F.; YOON, S. S.; DIEP, D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Science Biotechnology*, v. 15, n. 5, p. 675-690, 2007.
- (8) HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A.L. DAVIDSON, P.M. Ed. *Antimicrobial in Foods*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1983, p. 327-351.

- (9) CARMINATI, D.; GIRAFFA, G.; BOSSI, M. G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, Ames, v. 52, n. 9, p. 614-617, 1989.
- (10) CILANO, L.; ROSSO, D.; BOSSO, M. G. Azione di sostanze inibitrici prodotte da batteri lattici verso microrganismi patogeni. L'Industria del Latte, Lodi, v. 27, n. 3-4, p. 3-20, 1991.
- (11) DAVEY, G.P. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, Palmerston North, v. 16, n. 2, p. 187-190, 1981.
- (12) VENEMA, K.; ABEE, T.; HAANDRIKMAN, A.J.; LEENHOUTS, J.K.; KANINGS, W.N.; VENEMA, G. Mode of action of lactococcin B, a thiolactivated bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 59, n. 4, p. 1041-1048, 1993.
- (13) HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; KLAENHAMMER, T.D. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, Ames, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989.
- (14) KOJIC, M.; SVIRCEVIC, J.; BANINA, A.L; TOPISIROVIC, K. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 57, n. 6, p. 1835-1837, 1991.
- (15) ZAJDEL, J.K.; GEGLOWSKI, P.; DOBRZANSKI, W.T. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 49, n. 4, p. 969-974, 1985.
- (16) BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A.; BOTHWELL, M. K.; McGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. Colloids and Surfaces, v. 25, p. 81-90, 2002.
- (17) PINTO, M. S. Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo minas artesanal do Serro. Tese. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- (18) ADAMS, M. Nisin in multifactorial food preservation. In: ROLLER, S. (Ed.) Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Cap. 2, England: Woodhead Publishing Limited, 2003.
- (19) SIQUEIRA, R. S. Manual de microbiologia de alimentos. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. Brasília: EMBRAPA-SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1995. 159 p.
- (20) ARAÚJO, R. A. B. M., MARTINS, J. M., PINTO, M. S.; OLIVEIRA, P. N., OLIVEIRA, R. C., FURTADO, M. M., FERREIRA, C. L. L.F. Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal da região de Araxá. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, n. 339, v. 59, p. 93-96, Juiz de Fora, jul./ago. de 2004.
- (21) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02/01/2001, p.1-54, 2001.
- (22) SOBRAL, D. Efeito da nisina na contagem de *Staphylococcus aureus* e características do queijo minas artesanal da região de Araxá. 2012. 116p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2012.
- (23) TEODORO, V. A. M.. Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG. 2012. 138p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2012.
- (24) CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, v. 71, p. 1-20, 2001.
- (25) PINTO, M. S., CARVALHO, A. F., PIRES, A. C. S., SOUZA, A. A. C., SILVA, P. H. F., SOBRAL, D., PAULA J. C. J., SANTOS, A. L.. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. International Dairy Journal, v. 21, p. 90-96, 2011.

(26) 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, p. 457-461. 2011.

(27) TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, v. 18, p. 499-509. 2001.

