

PATOS DE MINAS  
É BÃO DEMAIS  
DA CONTA SÔ!

Distribuidor de produtos:

◀ DUPONT ▶

Fonterra  
Dairy for life

fermentech  
GENTE QUE AMA QUEIJO



# Bioproteção em lácteos

Antonio Salles – DuPont N&B



Distribuidor de produtos:

**DUPONT**



## Uma gama de produtos para um rótulo “limpo”

NISAPLIN®, Antimicrobiano Natural

NATAMAX®, Antimicrobiano Natural

**HOLDBAC™, Culturas Protetoras**

Para todos os antimicrobianos importante consultar a legislação



## Hurdle Technology - Tecnologia de obstáculos

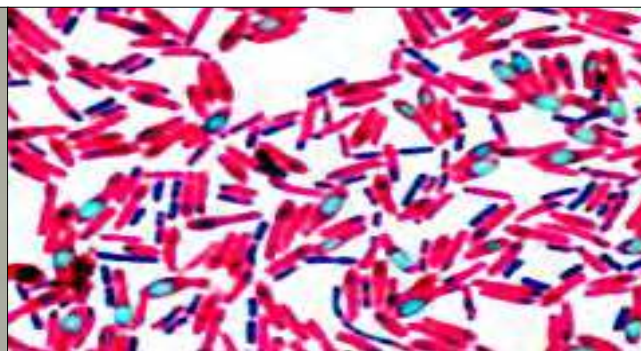
Uma combinação de tratamentos e/ou ingredientes utilizados para aumentar a estabilidade, a segurança e a qualidade dos alimentos deverá ser implementada – é o que chamamos “Hurdle Technology” ou Tecnologia de obstáculos

Controlar e/ou inibir o crescimento de microrganismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos!



## Obstáculos em alimentos

- Controle de temperatura (aquecimento, refrigeração)
- Atmosfera Controlada (atmosfera modificada)
- O controle de aW (ou controle da umidade)
- Controle do pH
- Agentes químicos / limpeza (sais, ácidos orgânicos)
- Outros ingredientes (extrato) - Antimicrobianos naturais (CULTURAS PROTETORAS)



# Os Antimicrobianos e o Sistema de Múltiplas Barreiras

## “Hurdle Technology”

°C Temperatura de processo

pH Acidez

O Microbiota Competitiva

$a_w$  Atividade de água

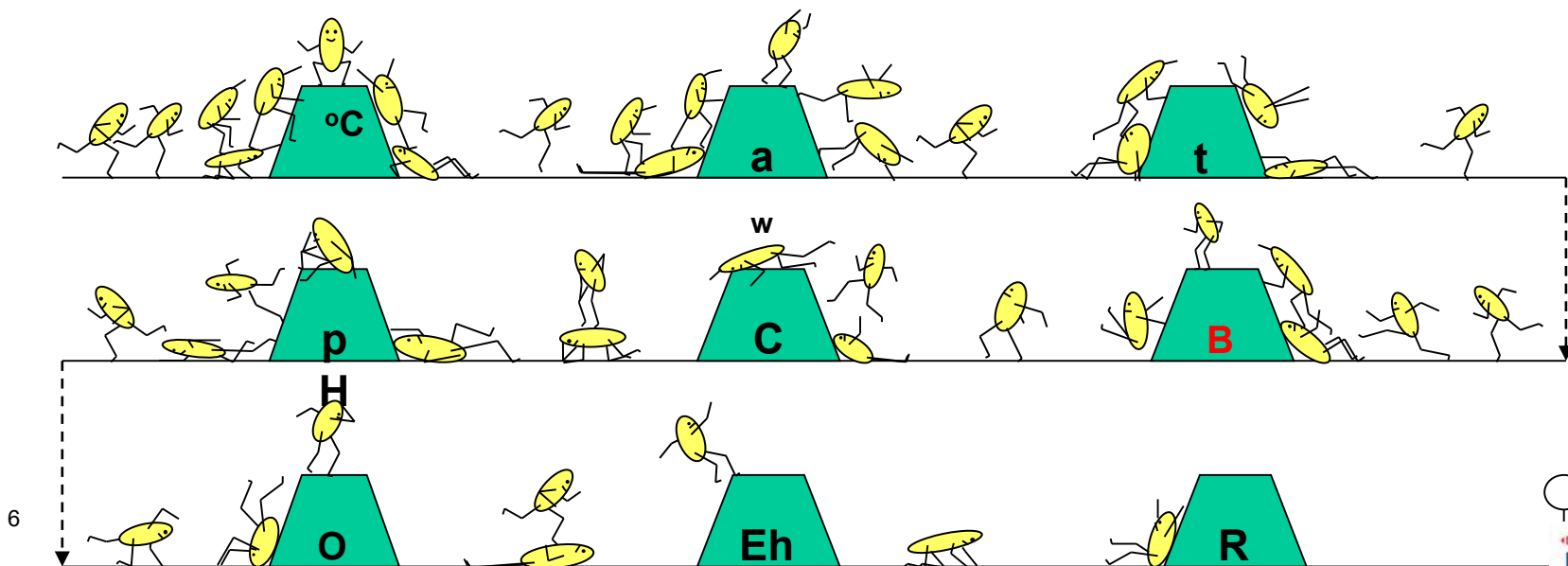
C Conservantes químicos

Eh Tensão de oxigênio  
Mudança de Gases

T Temperatura de armazenamento

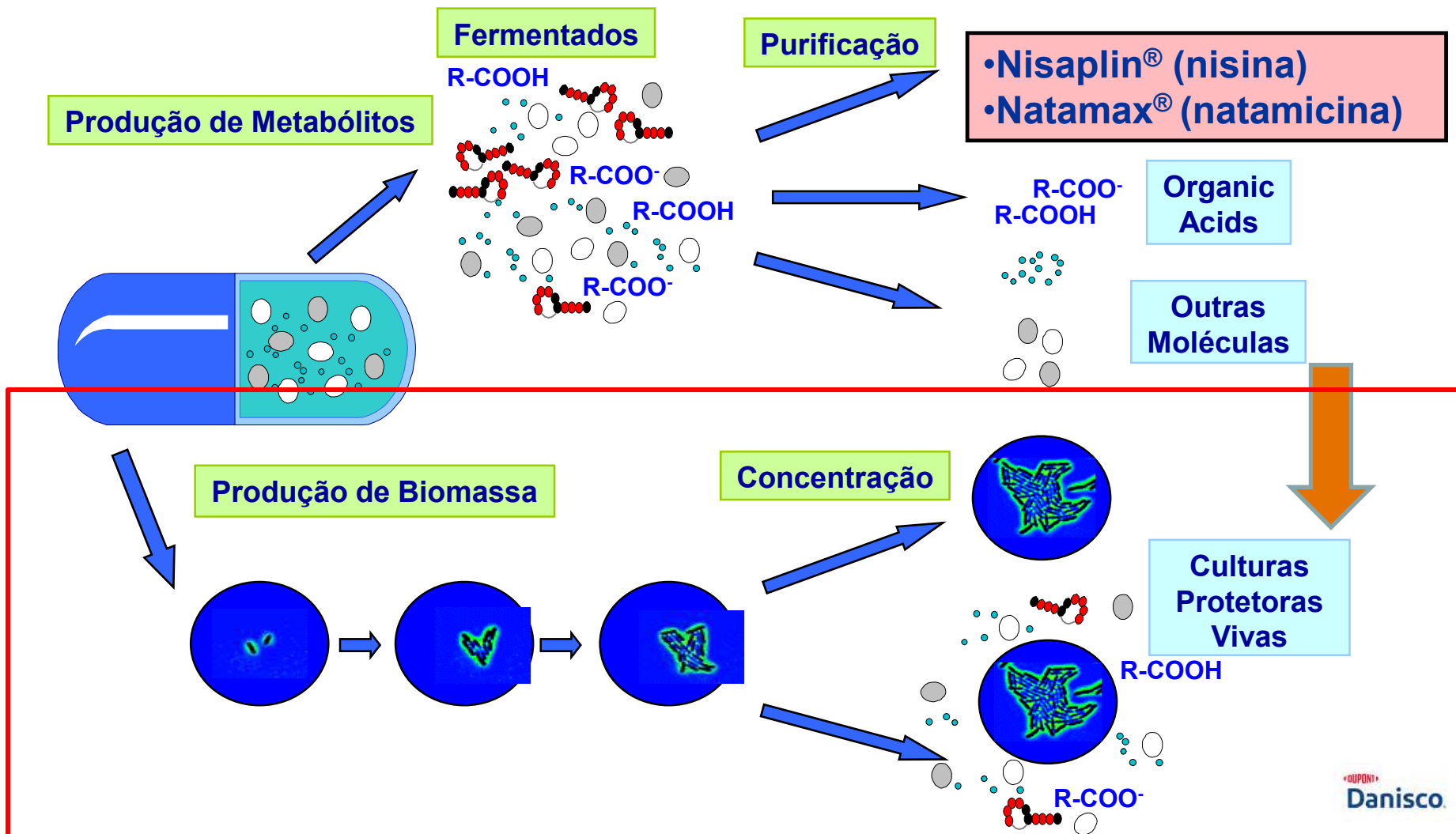
**B Antimicrobianos**

R Radiação UV  $\gamma$

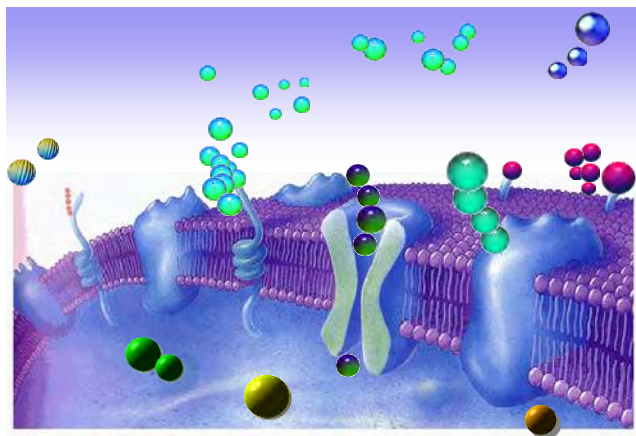


# Antimicrobianos Naturais

## Preparações purificadas/Biomassa-Cultivos protetores



# HOLDBAC™ Cultivos protetores contra Bolores / leveduras / Bactérias



Metabólitos antimicrobianos



+

Efeitos de exclusão competitiva



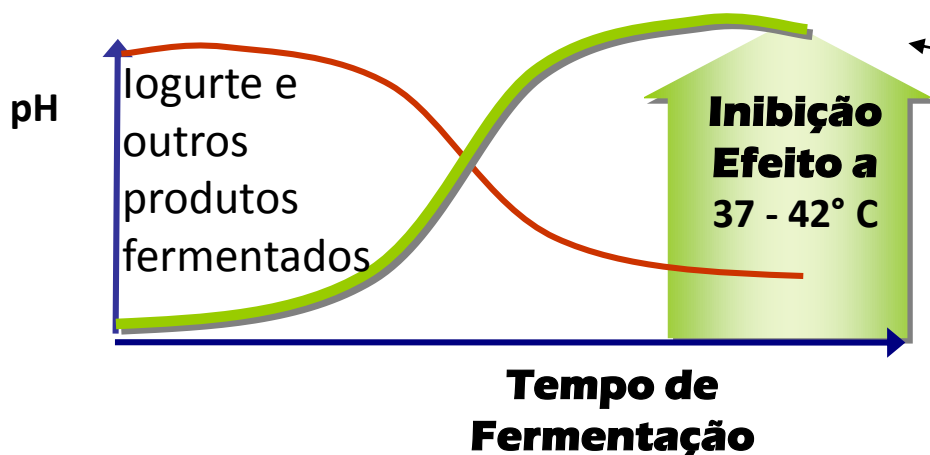
Inibição de microrganismos indesejáveis através da competição por nutrientes, oxigênio, etc

+

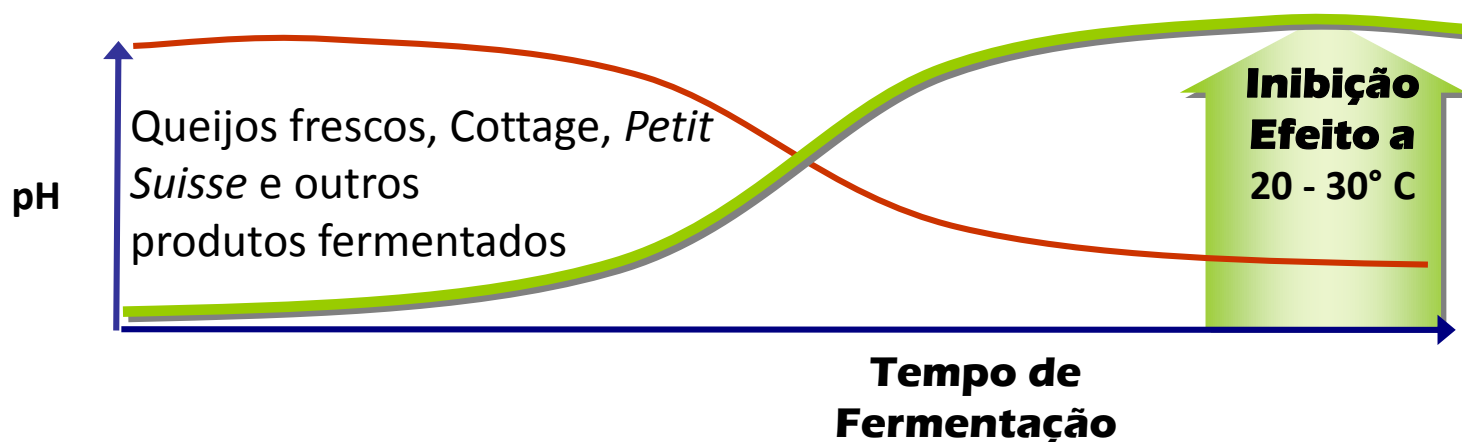
outros efeitos



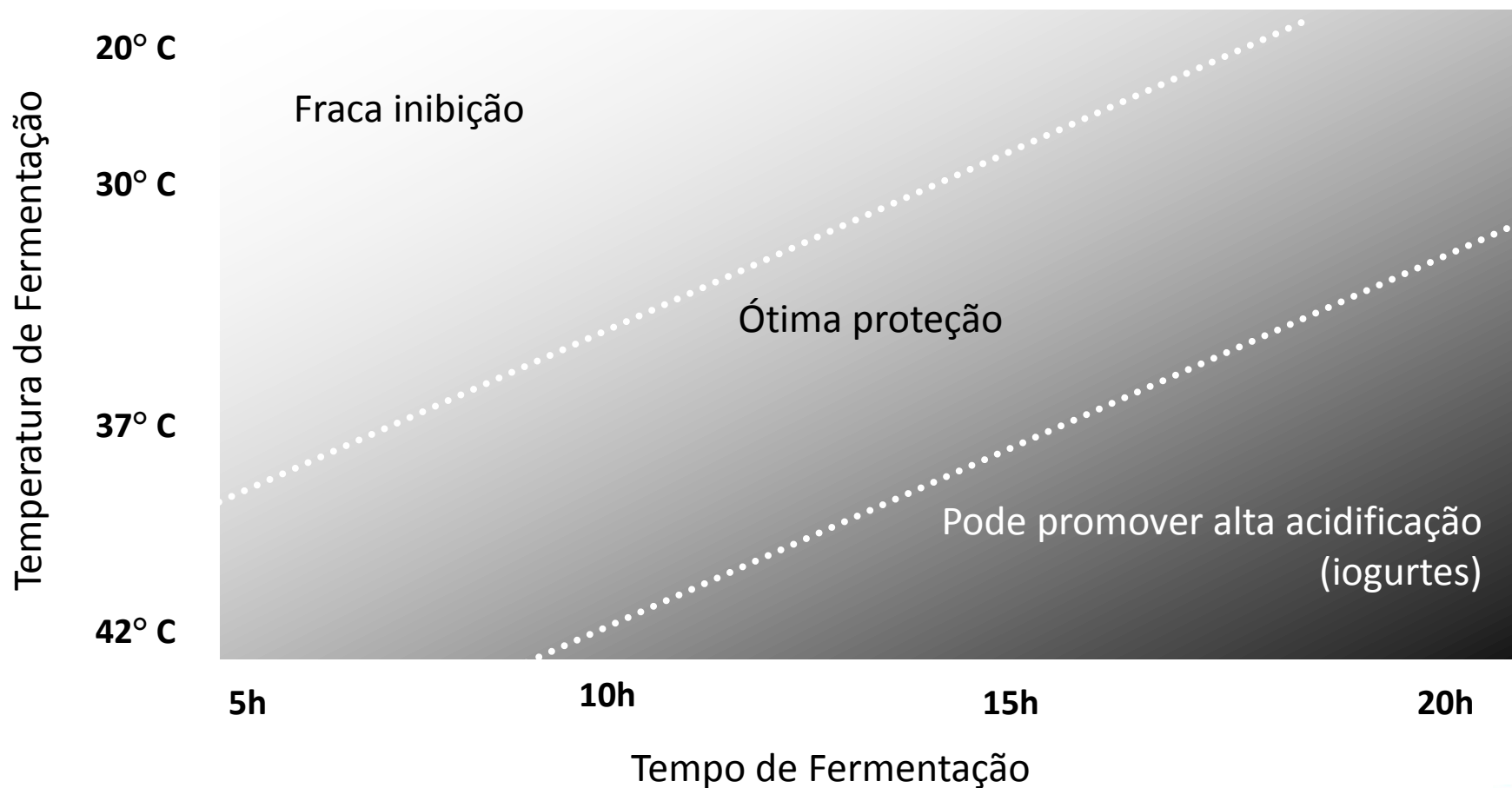
# HOLDBAC™ - Culturas protetoras - Potencial inibitório durante a fermentação/processo



**Número de Células + Metabólitos Antimicrobianos**



## HOLDBAC™ : Proteção mesmo em diferentes faixas de tempo e temperatura

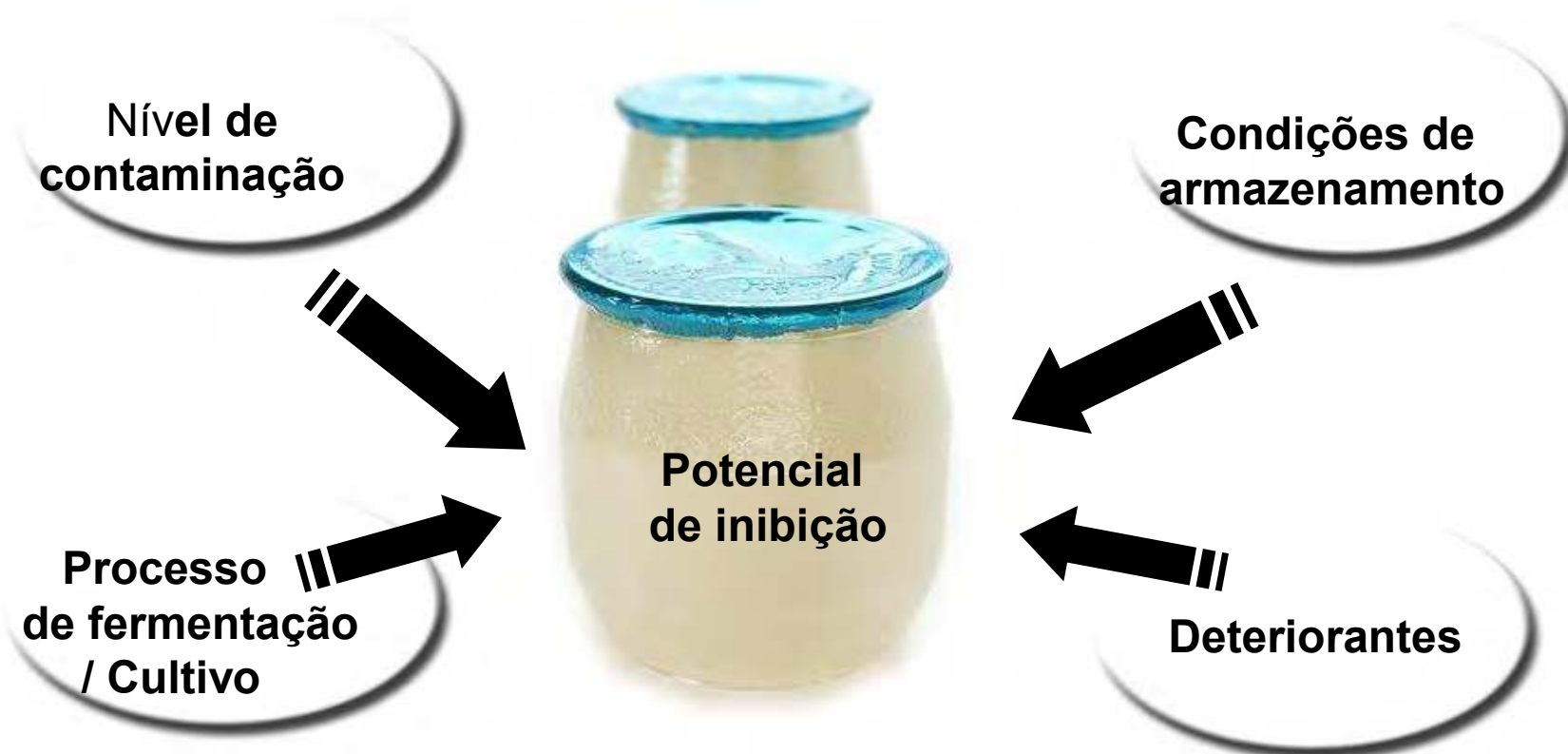


## HOLDBAC™ YM *Plus* e YM - XPM

**aplicação em productos lácteos fermentados  
iogurtes e queijos obtidos por coagulação ácida**



## Linha HOLDBAC™ YM – Inibição de bolores e leveduras: fatores de influência



## HOLDBAC™ YM – Controle de bolores e leveduras

- As misturas de *Propionibacterium* e *Lactobacillus* atuam juntas para auxiliar na inibição do desenvolvimento de bolores e leveduras

|                                   | HOLDBAC™ YM Plus | HOLDBAC™ YM |
|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Saccharomyces ssp. DCS 296        | + + +            | + + +       |
| Saccharomyces ssp. DCS 297        | + + +            | + + +       |
| Candida pelliculosa DCS 1047      | + +              | +           |
| Candida magnoliae DCS 1054        | + +              | +           |
| Candida famata DCS 1233           | +                | +           |
| Candida pelliculosa DCS 1373      | +                | +           |
| Candida parapsilosis DCS 1482     | +                | +           |
| Candida parapsilosis DCS 1483     | +                | +           |
| Rhodotorula mucilaginosa DCS 1613 | + + +            | + +         |
| Candida zeylanoides DCS 1642      | +                | +           |

### Níveis de inibição:

+ substancial

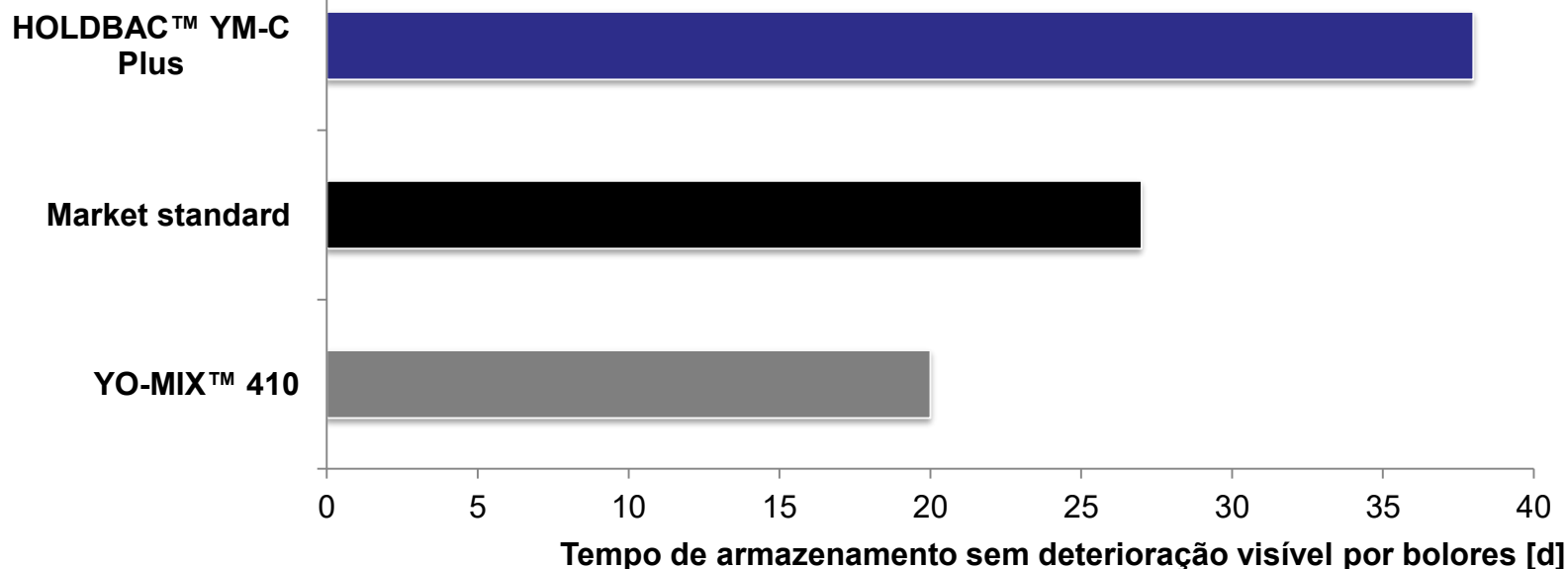
+ + forte

+ + + muito forte

## HOLDBAC™ YM Plus

### Controlando bolores e leveduras sistema modelo iogurtes / queijos por coagulação ácida

- logurte – sistema modelo – “challenge” - bolores

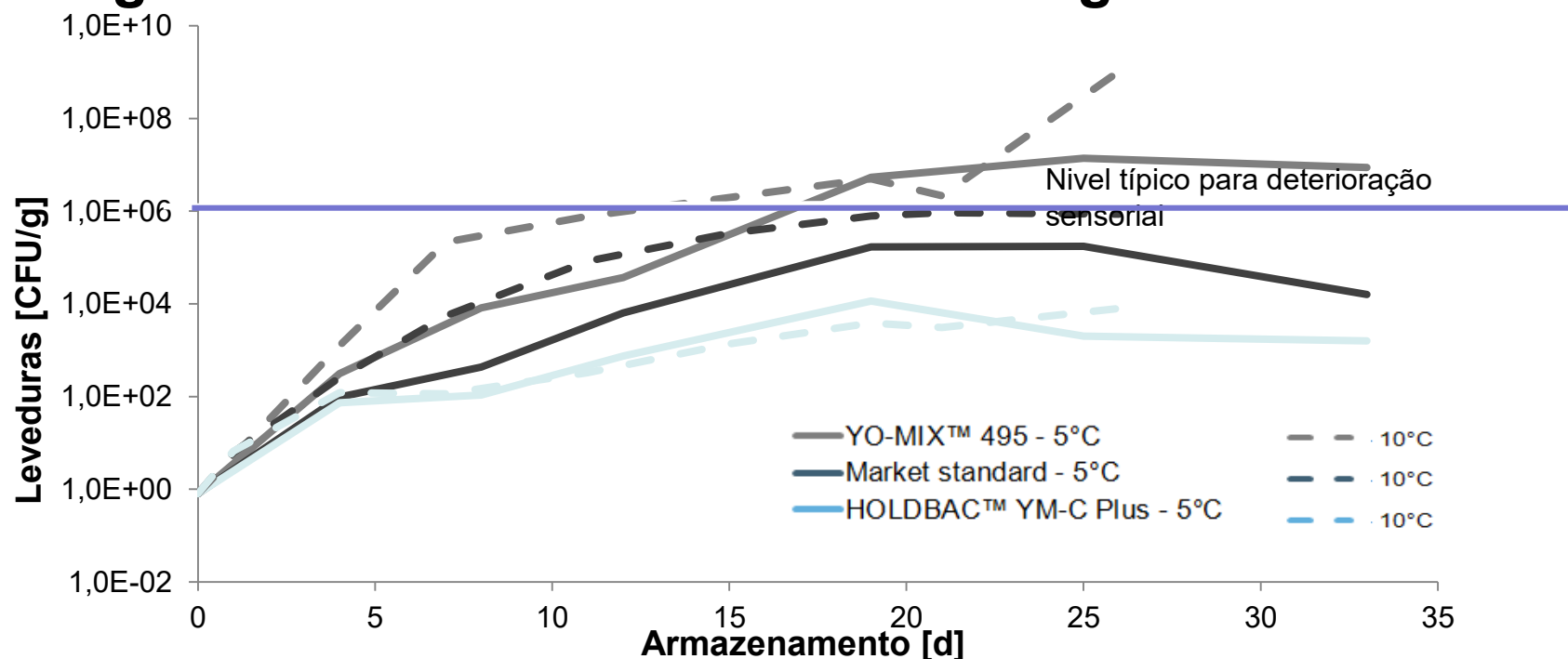


|                     |   |
|---------------------|---|
| Dose                | HOLDBAC™ YM-C Plus ou padrão de mercado com 10 DCU / 100 L de leite |
| Desafio com bolores | Pool de 3 de cepas de bolores a 15 esporos/g                        |
| Cultivo de iogurte  | YO-MIX™ 410   |
| Condições do estudo | Armazenamento a 5° C por 38 dias                                    |

# HOLDBAC™ YM Plus

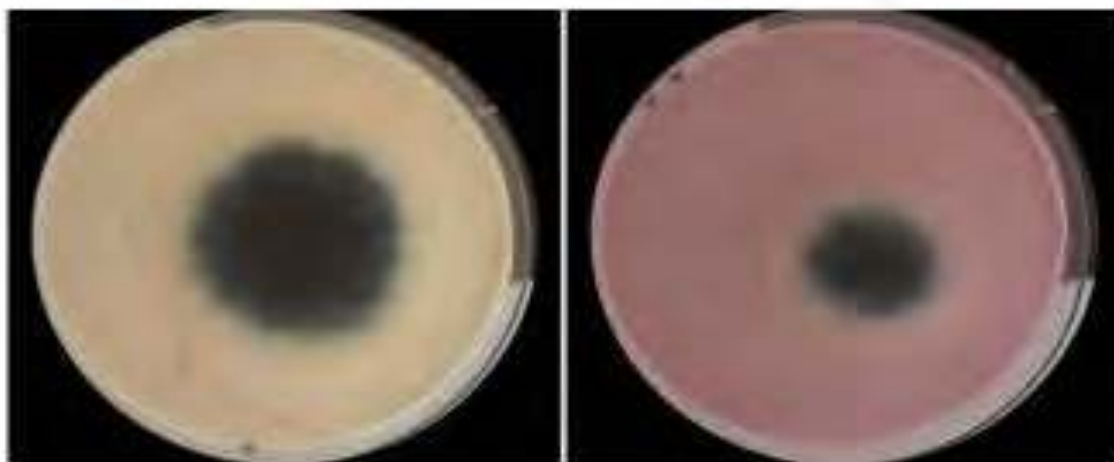
## Controlando bolores e leveduras sistema modelo iogurtes / queijos por coagulação ácida

### • Iogurte – sistema modelo – “challenge” - leveduras



|                       |   |
|-----------------------|---|
| Dose                  | HOLDBAC™ YM-C Plus ou u padrão de mercado com 10 DCU / 100 L de leite |
| Desafio com leveduras | Pool de cepas de leveduras com 8 CFU/10 g                             |
| Condições do estudo   | Armazenamento a 5° C o u 10° C por até 33 dias                        |

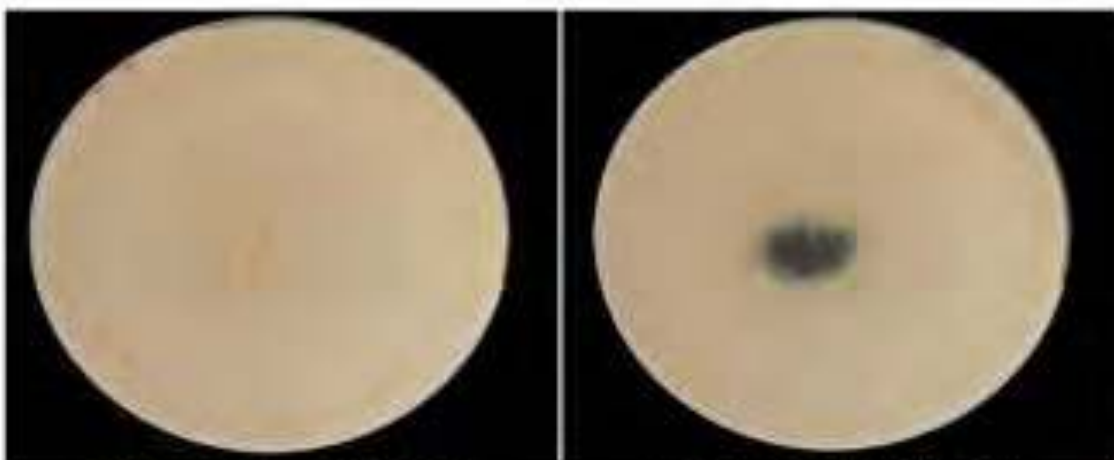
## HOLDBAC™ YM line – Controlando bolores em fermentados



Reference

Reference + Sorbate

YO-RAPID - *P. roqueforti*



10 DCU HOLDBAC® YM XPM

10 DCU HOLDBAC® YM-B Plus

## HOLDBAC™ YM line – Controlando leveduras em fermentados



Inoculation level: 0.5  
CFU/g Yeast pool:

- *S. cerevisiae*
- *C. colliculosa*
- *R. mucilaginosa*

At least 1log difference  
after 21 days of storage  
at 8°C.

## HOLDBAC™ YM e HOLDBAC™ LC

**aplicação em queijos frescos obtidos por coagulação enzimática**



## HOLDBAC™ YM e HOLDBAC™ LC

### Queijo fresco “Minas Frescal” – Exemplo Prático

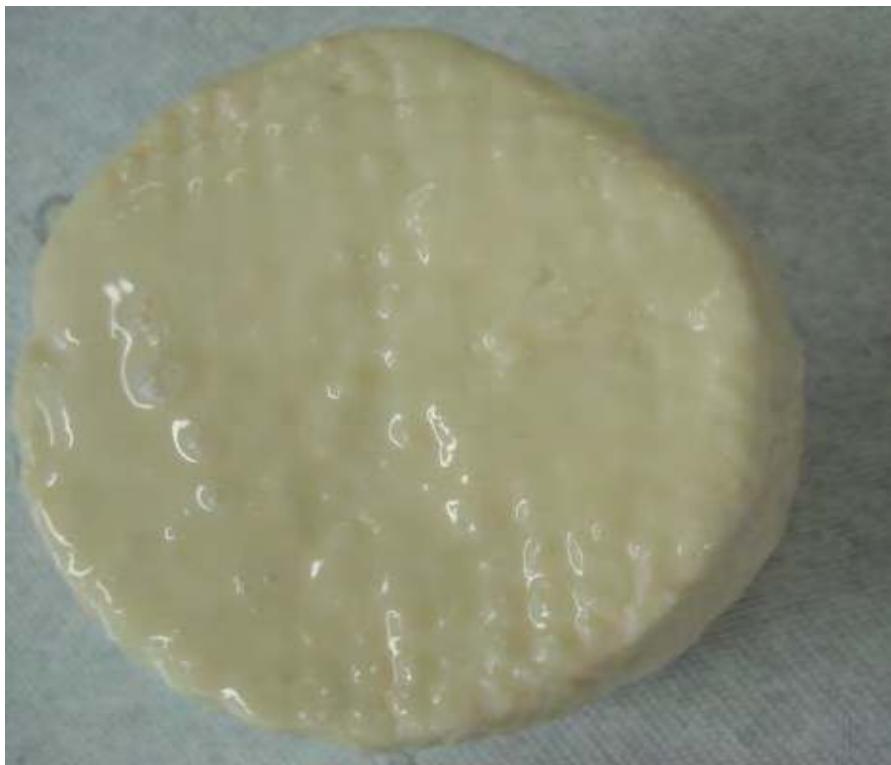
- HOLDBAC™ YM-C e LC adicionados ao Leite antes da coagulação

Avaliação visual – casca melada – amostras a 10 -12 °C

|  | 7 dias | 14 dias | 21 dias | 28 dias |
|--|--------|---------|---------|---------|
| <b>Padrão</b>                            | -      | + /-    | +       | + +     |
| <b>HOLDBAC™ YM-C<br/>5 DCU / 100 lts</b> | -      | -       | -       | + /-    |
| <b>HOLDBAC™ LC<br/>2,0 DCU / 100 lts</b> | -      | -       | + /-    | +       |

# HOLDBAC™ YM e HOLDBAC™ LC

## “Minas Frescal”



Padrão

Após 14 dias - início de casca melada



**HOLDBAC™ LC**

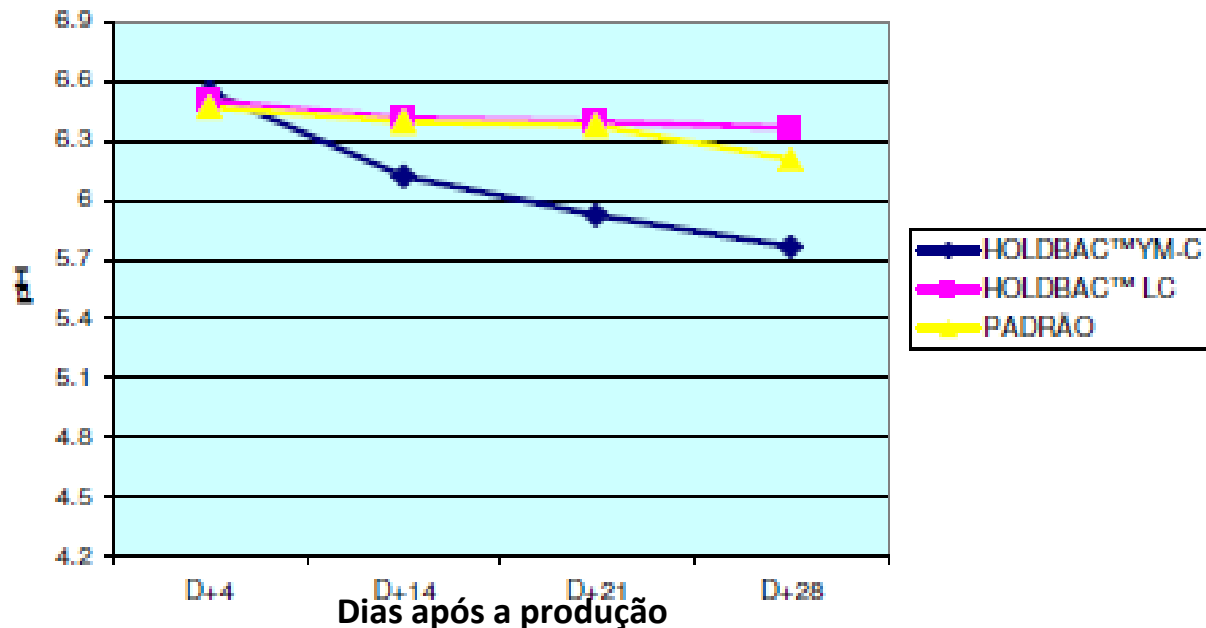
Após 21 dias - início de casca melada

**HOLDBAC™ YM-C**

Após 28 dias - início casca melada

## HOLDBAC™ LC e HOLDBAC™ YM-C “Minas Frescal”

pH durante o  
período de avaliação



HOLDBAC™ LC – 2,0 DCU / 100 litros manteve o pH estável durante o período avaliado;  
HOLDBAC™ YM-C – 5 DCU/100 litros – Abaixamento mais acentuado de pH comparado com as outras amostras (Padrão e HOLDBAC™ LC)

Proteção com HOLDBAC™ LC foi melhor que o Padrão (21 dias x 14 dias)  
A proteção com HOLDBAC™ YM-C foi a melhor (28 dias x 21 dias - HOLDBAC™ LC X 14 dias - Padrão)

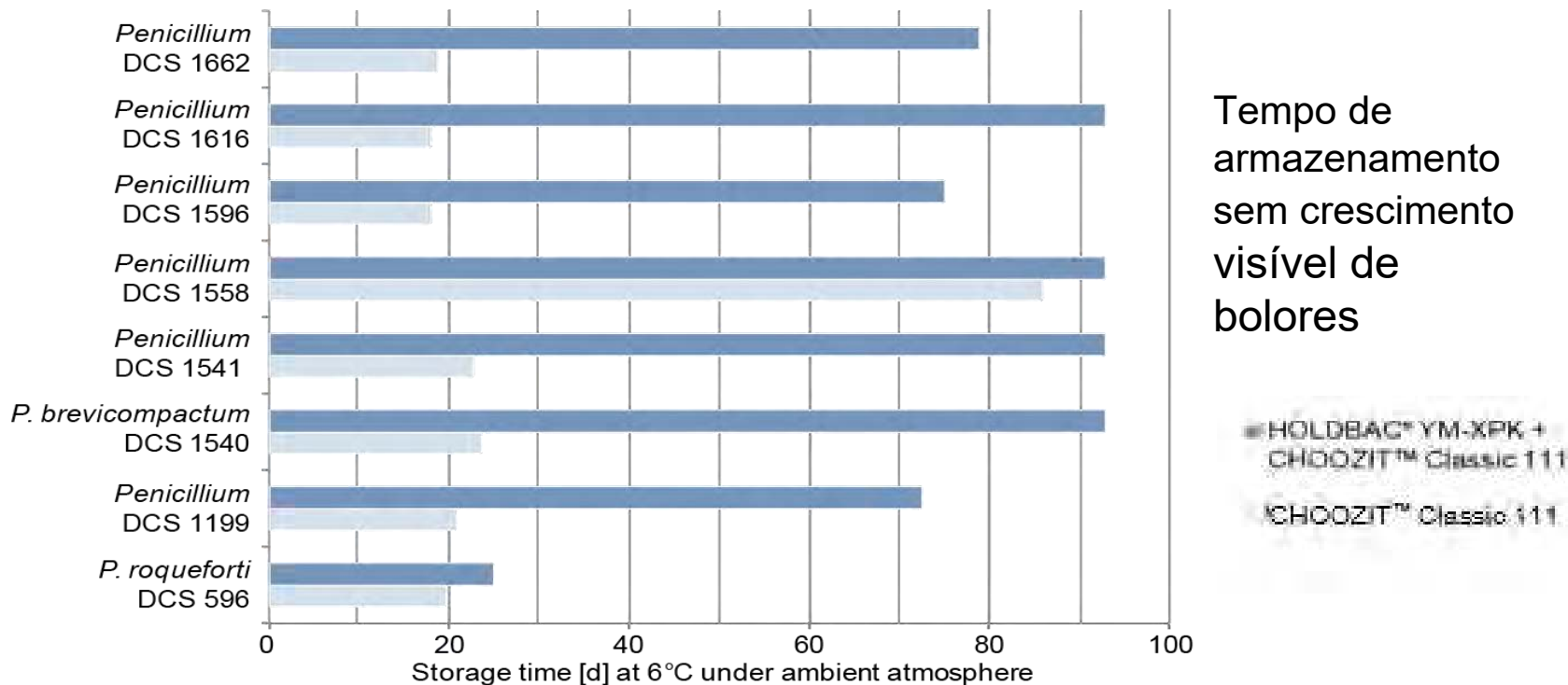
# HOLDBAC™ YM-XPB

## Nova proteção de bolores e leveduras para seus queijos



# HOLDBAC™ YM-XPK

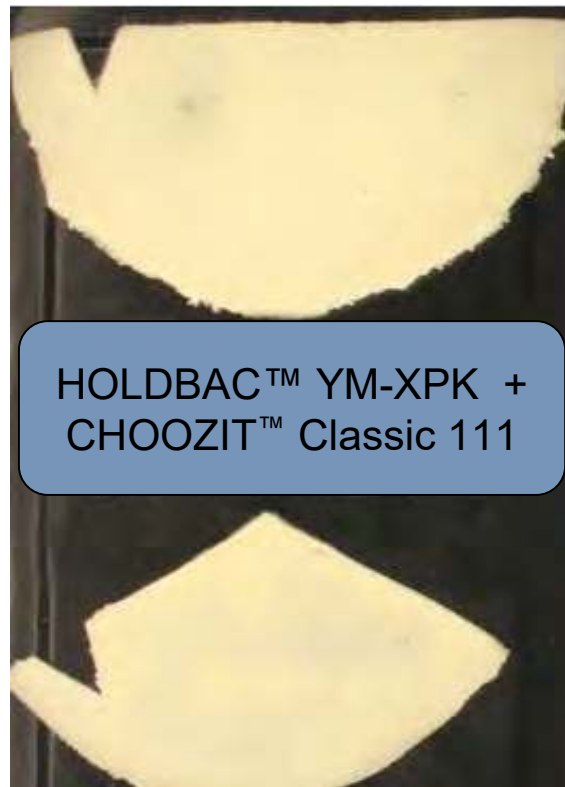
## Controlando bolores e leveduras para minimizar perdas – queijos semi-duros



|                     |  |
|---------------------|--|
| Dose                | HOLDBAC® YM-XPK a 10 DCU / 100 L de leite          |
| challenge           | 10 esporos / spot                                  |
| cultivo             | CHOOZIT™ Classic 111                               |
| Condições do estudo | Armazenado a 6° C por 95 dias temperatura ambiente |

# HOLDBAC™ YM-XPB

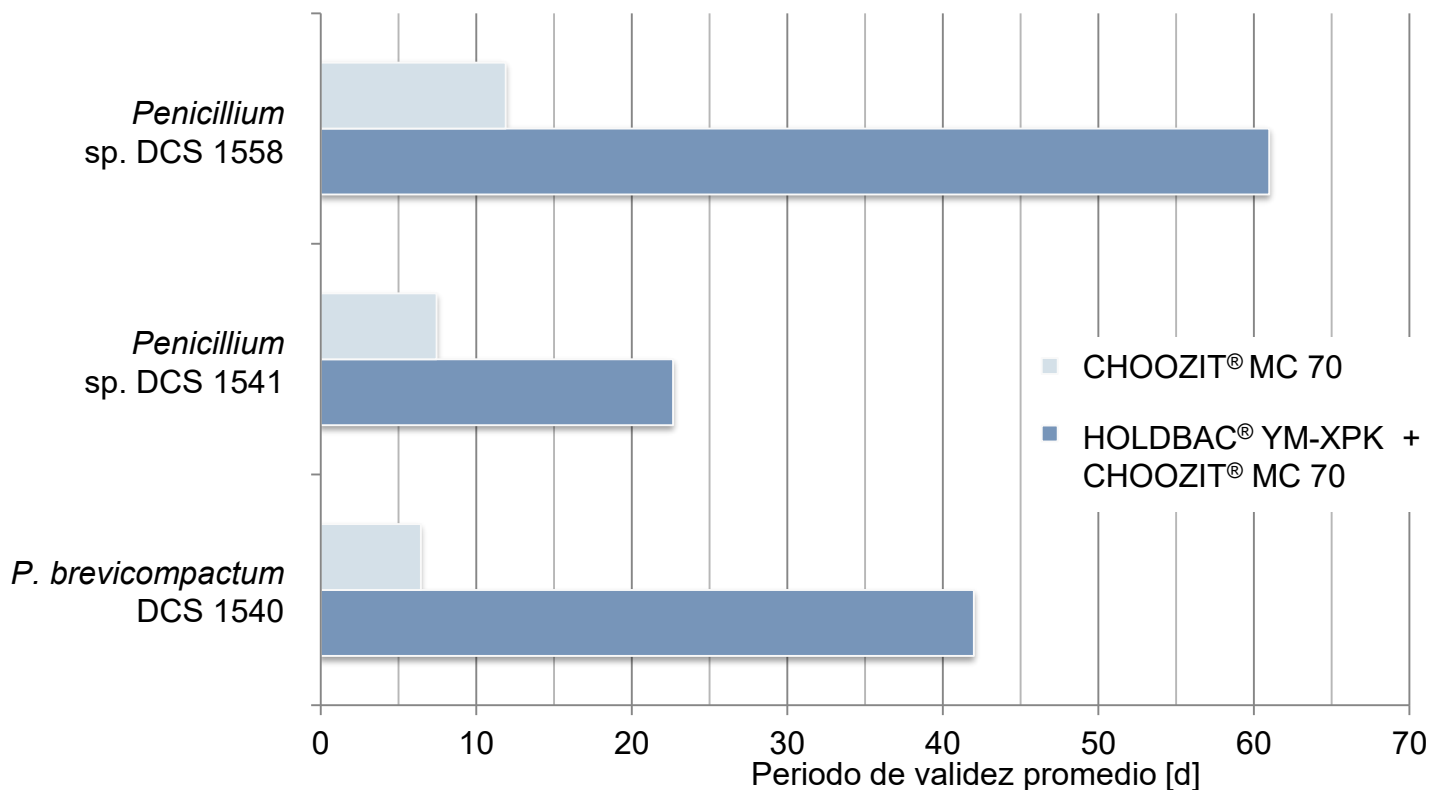
## Controlando bolores e leveduras - queijos semi-duros



|                    |   |
|--------------------|---|
| Dose               | HOLDBAC® YM-XPB a 10 DCU / 100 L de leite |
| challenge          | 10 esporos/spot                           |
| cultivo            | CHOOZIT™ Classic 111                      |
| Condições do teste | 6° C por 27 días em temperatura ambiente  |

# HOLDBAC™ YM-XPB

## abusando da temperatura – modelo em queijo semi-duro



|                     |   |
|---------------------|---|
| Dose                | HOLDBAC® YM-XPB a 10 DCU / 100 L de leite |
| challenge           | 5, 10 and 50 esporas / spot               |
| Cultivo             | CHOOZIT™ MC 70                            |
| Condições do estudo | 12° C por 61 dias                         |

# HOLDBAC™ YM-XPB

## Fácil de aplicar

- Os cultivos HOLDBAC™ YM-XPB são aplicados diretamente ao leite no tanque junto com o cultivo “Starter”, mantendo o processo como de rotina



## As NSLAB\* e o uso de HOLDBAC™ LC



\* NSLAB - non-starter lactic acid bacteria / bactérias não pertencentes ao fermento láctico iniciador

## As NSLAB\* e o uso de HOLDBAC™ LC

Quais são as principais NSLAB?

- **Lactobacilos heterofermentativos facultativos do grupo II**  
*Lactobacillus casei /paracasei – Lactobacillus plantarum -*  
*Lactobacillus pentosus - Lactobacillus rhamnosus, etc.*

Tambem pode-se considerar NSLAB:

- **Lactobacilos heterofermentativos do grupo III**  
*Lactobacillus fermentum, Lactobacillus brevis*
- *Leuconostoc spp., pediococos y enterococos*
- NSLAB - non-starter lactic acid bactéria / bactérias não pertencentes ao fermento láctico iniciador

# HOLDBAC™ LC e as NSLAB

## Fontes de NSLAB

- Leite cru é a maior fonte de NSLAB em queijos
- A contaminação pós pasteurização, os biofilmes em plantas sanitizadas, o silo de leite cru, a unidade de ultrafiltração, a tina, etc. – também contribuem para o desenvolvimento das NSLAB no queijo (Sommers et al., 2001; Agarwarl et al., 2006)
- **HOLDBAC™ LC (*L. rhamnosus*) - poderia ser uma ajuda na solução do efeitos negativos da presença das NSLAB**

# HOLDBAC™ LC e as NSLAB - BIOFILMES



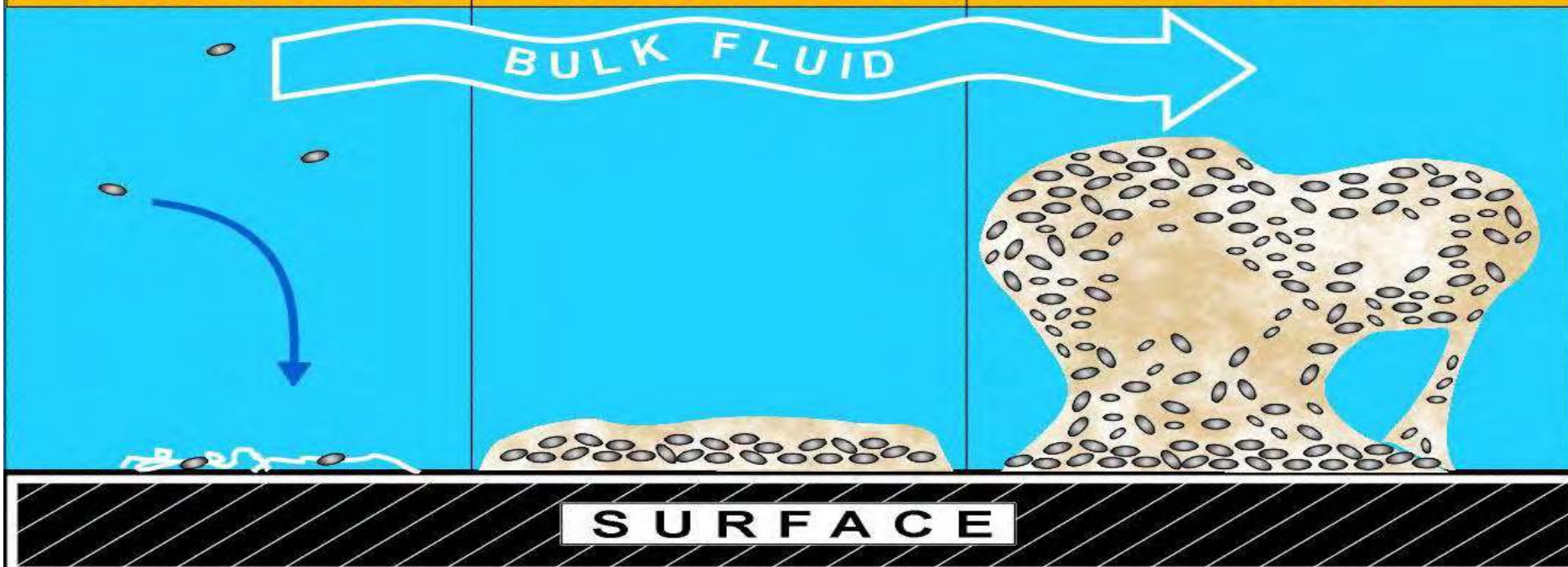
# HOLDBAC™ LC e as NSLAB - BIOFILMES

## Biofilm formation:

Attachment

Colonization

Growth



# A “bactofugação” e a diminuição da carga microbiana total

Baixar a carga de bacilos esporulados como principal função

Em leite frio ou em leite preaquecido a 43-45 ° C aproximadamente 67-85% das bactérias totais são eliminadas e com tratamento duplo pode chegar até 95%.



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB – In vitro

### Avaliação da atividade inibitória do HOLDBAC™ LC in vitro

HOLDBAC™ LC (*Lactobacillus rhamnosus*) mostra uma inibição comprovada contra microrganismos não desejados como *Leuconostoc*, lactobacilos heterofermentadores e enterococos (dependendo da cepa e espécie).

Um trabalho comparando o efeito do *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* do CHOOZIT™ LBC 80 (usado como cultivo de aroma para queijos) poderia apresentar o mesmo poder inibitório do HOLDBAC™ LC contra alguns lactobacilos heterofermentadores no queijo.

# HOLDBAC™ LC e as NSLAB – In vitro

*Lactobacillus brevis* DCS 1164



# HOLDBAC™ LC e as NSLAB – In vitro

*Lactobacillus buchneri* DCS 861



# HOLDBAC™ LC e as NSLAB – In vitro

*Lactobacillus fermentum* DCS 1165



# HOLDBAC™ LC e as NSLAB

## Queijo de coalho; queijos semi duros e duros



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB queijo de coalho

HOLDBAC™ LC (*Lactobacillus rhamnosus*) controla o crescimento de NSLAB- maior fixação do palito na massa do queijo – diminuição da proteólise pelas NSLAB



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB queijo de coalho

HOLDBAC™ LC (*Lactobacillus rhamnosus*) pode controlar o crescimento de indesejáveis por competição de flora (coliformes) e controla o crescimento de NSLAB



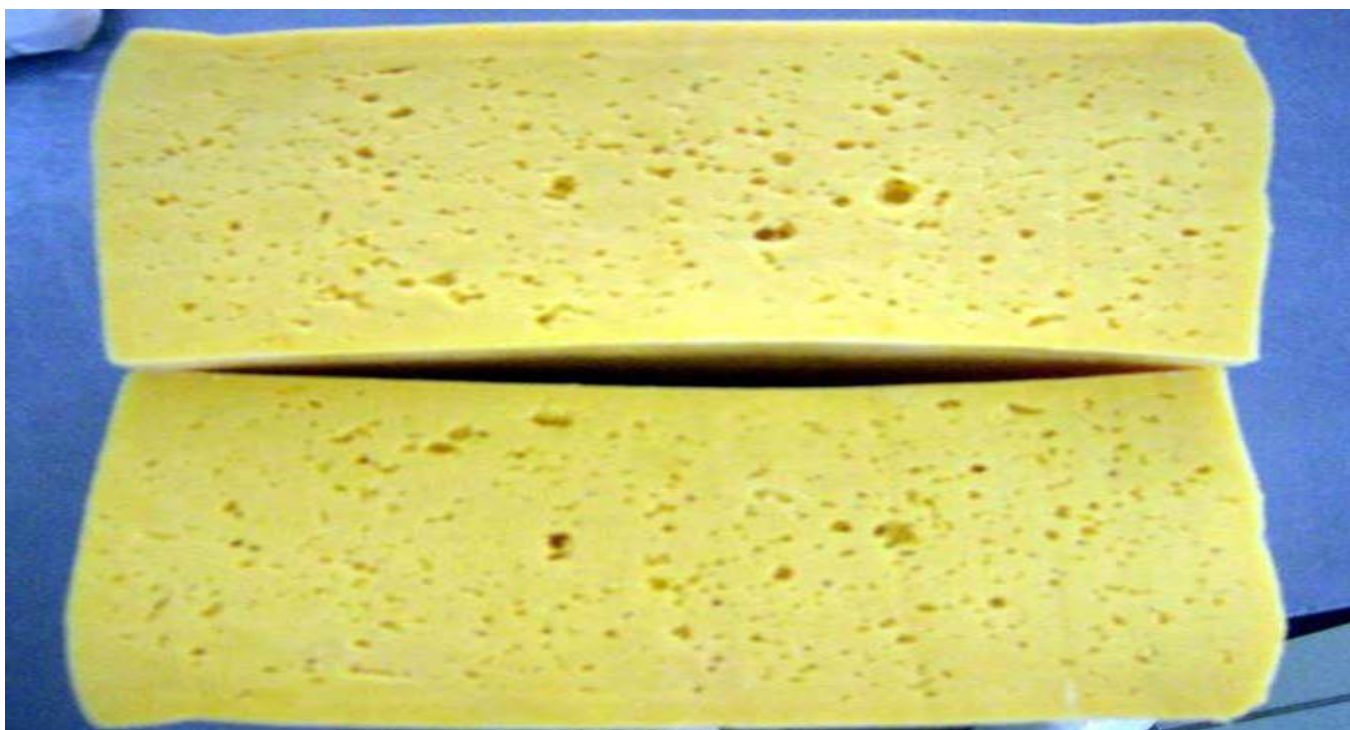
## HOLDBAC™ LC e as NSLAB queijo de coalho

HOLDBAC™ LC (*Lactobacillus rhamnosus*) controla o crescimento de NSLAB heterofermentadores –minimizando a formação de olhaduras indesejáveis



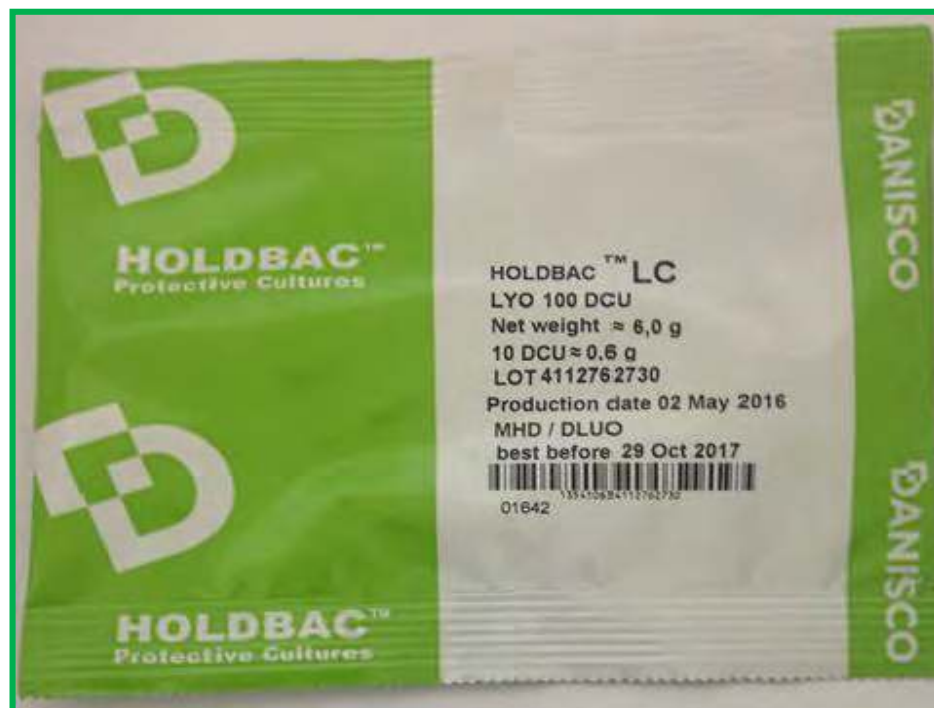
## HOLDBAC™ LC e as NSLAB queijo de coalho

HOLDBAC™ LC (*Lactobacillus rhamnosus*) controla o crescimento de NSLAB heterofermentadores – minimizando a formação de olhaduras indesejáveis



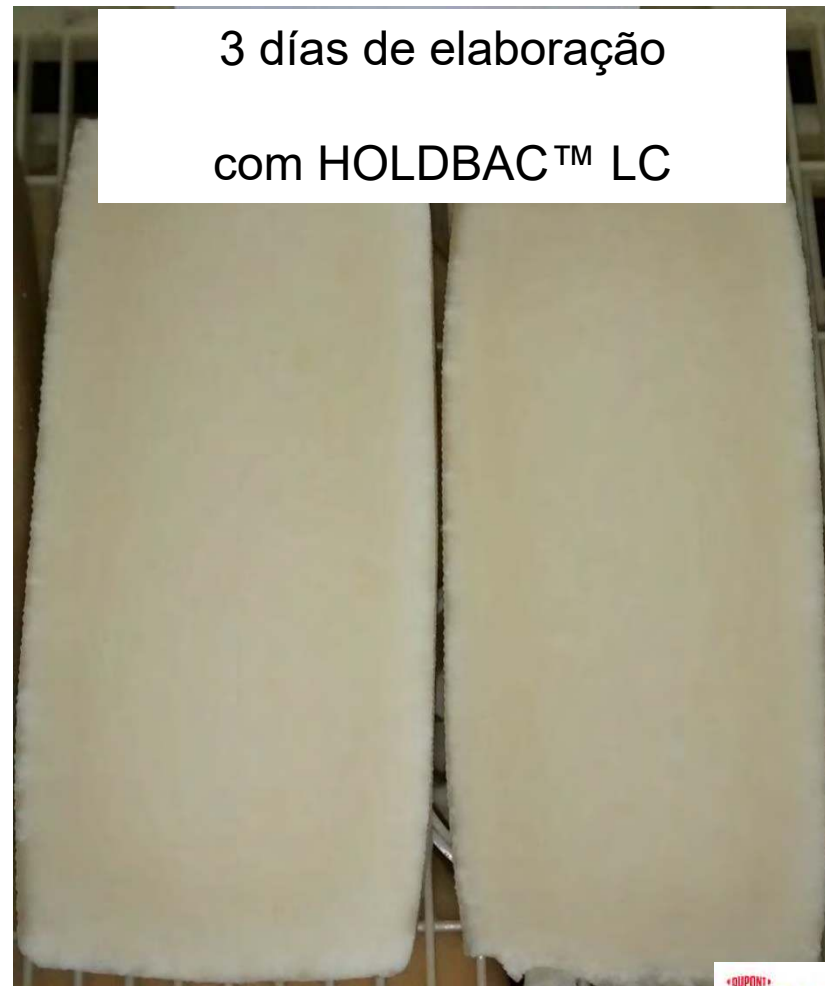
## HOLDBAC™ LC e as NSLAB Queijos semi-duros e duros

Teste - Queijo duro – **HOLDBAC™ LC**  
Dose aplicada: 3000 DCU/ 20000 litros



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

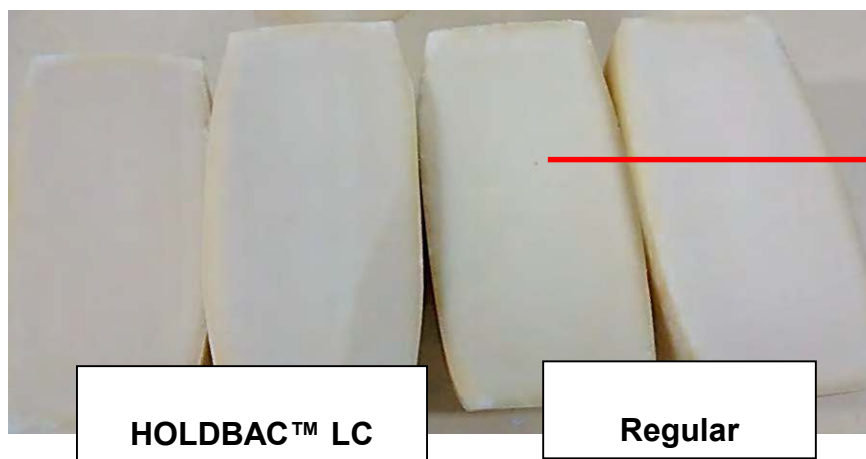
Queijos na saída da salmoura – 3 dias de elaboração



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

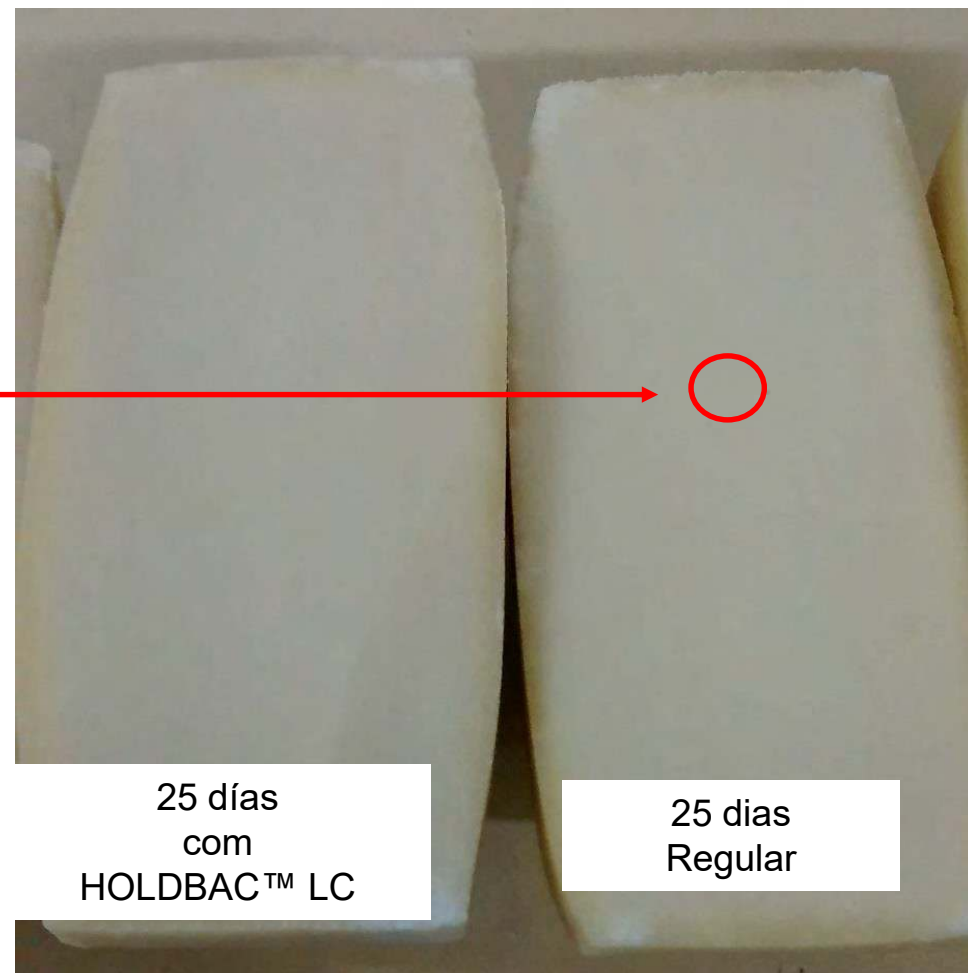
Saída da câmara de secagem

Aproximadamente 25 dias de fabricação



indícios de fermentação com gás no  
queijo regular

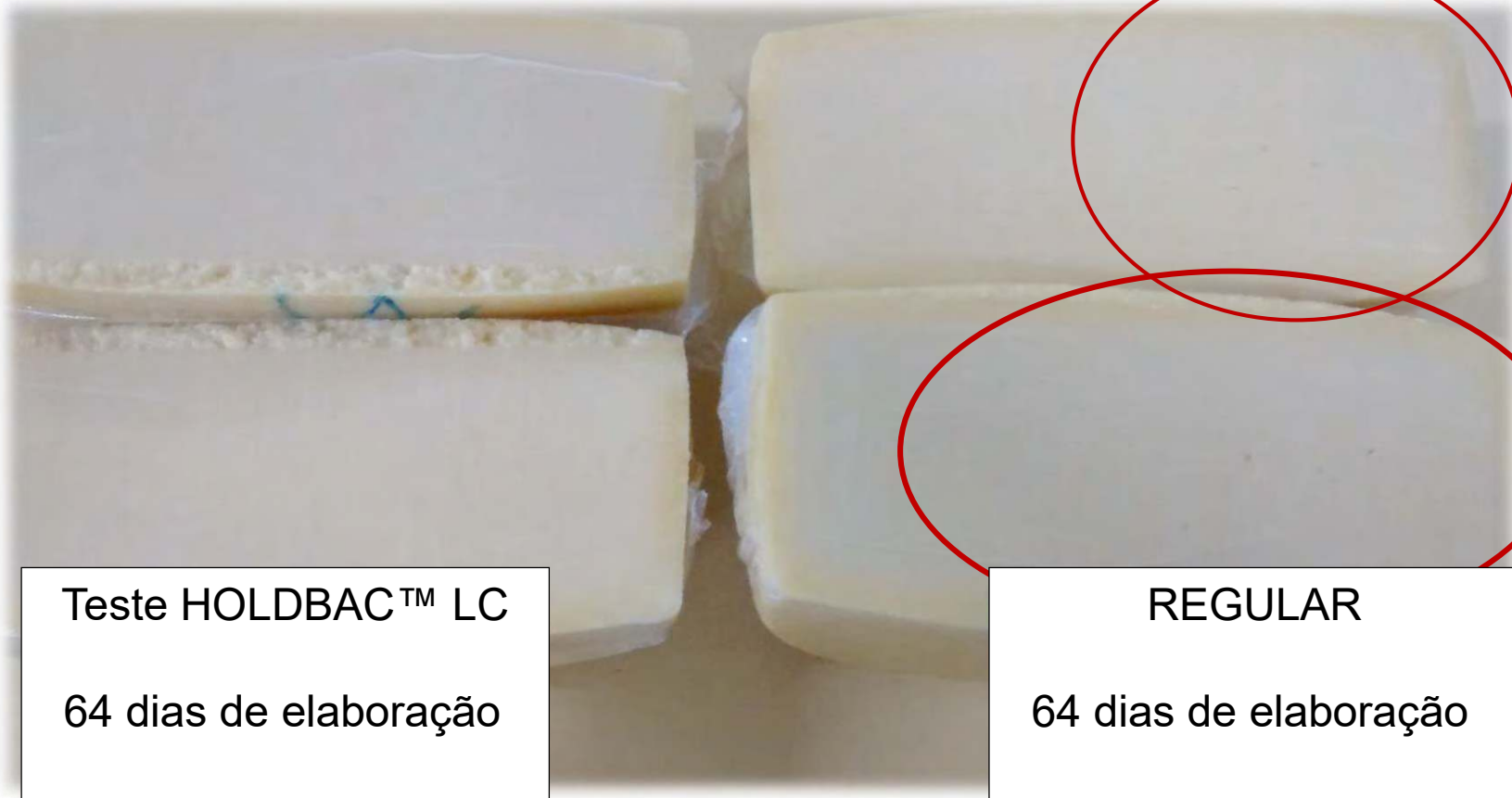
Sem indícios de fermentação com gás  
na amostra com HOLDBAC™ LC



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijo em Câmara “FRIA” ( 4 °C) - 64 dias de fabricação

- Se observa olhos de fermentação com gás no queijo regular.
- Não se observa olhos de fermentação com gás no queijo com **HOLDBAC™ LC**



Teste HOLDBAC™ LC

64 dias de elaboração

REGULAR

64 dias de elaboração

## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijos em Câmara “FRIA” ( 4 °C)

HOLDBAC™ LC

64 dias de elaboração

REGULAR

64 dias de elaboração

# HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijos em Câmara “FRIA” ( 4 °C)

REGULAR

64 dias de elaboração

Teste HOLDBAC™ LC

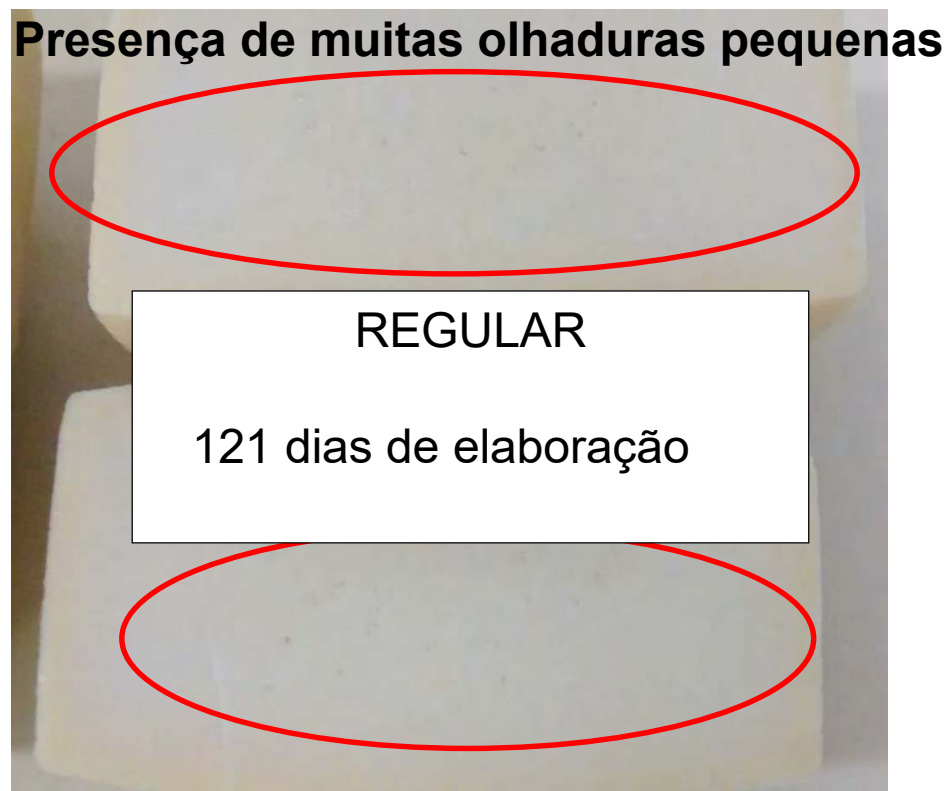
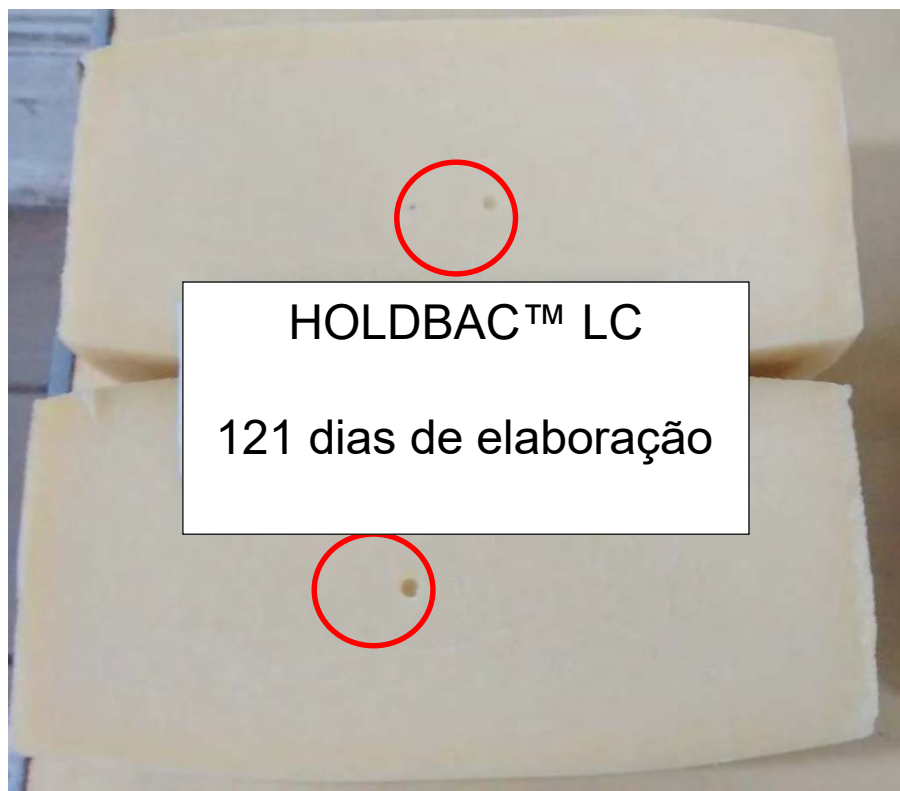
64 dias de elaboração



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijo em Câmara “FRIA” (4 °C)

121 dias de elaboração



## HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Novas possíveis aplicações \*



Uso de cultivos protetores em leite com adição direta em silos, por 12- 24 horas em temperaturas de 2-5°C antes da produção de queijos com a finalidade de controlar a flora presente no leite cru.

\* Doses de  $1e5$  -  $1e6$  UFC/ml

## HOLDBAC™ Listeria dairy para aplicação em queijos

Lembre-se que uma cultura ou solução antimicrobiana **nunca** será isoladamente responsável pela inibição e eliminação de contaminantes e patogênicos



# Incidência de *Listeria*-positive queijos

Table 1. Reports of incidences of *Listeria*-positive cheese.

| SOURCE  | YEAR | CHEESE*     | NUMBER OF SAMPLES | L MONO-CYTOGENES | OTHER LISTERIA | AUTHORS                  |
|---|------|-------------|-------------------|------------------|----------------|--------------------------|
| Germany and other   | 1986 | SC, SHC, HC | 420               | 3.3%             | 3.3%           | Terplan et al. [11] [12] |
| France  | 1987 | SC          | 69                | 14.5%            | n. d.          | Beckers et al. [1]       |
| Austria, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Italy, Netherlands, Norway, Portugal, Sweden, Switzerland | 1987 | SC, SHC     | 187               | 1.1%             | 0.5%           | Farber et al. [3]        |
| France  | 1988 | SC, SHC     | 619               | 2.1%             | 1.5%           | Gledel [4]               |
| France, UK, Switzerland, Germany, Denmark, Lebanon  | 1988 | SC          | 222               | 10.4%            | 8.6%           | Pini, Gilbert [9]        |
| Germany and other   | 1988 | SC, SHC, HC | 509               | 5.7%             | 6.1%           | Weber et al. [13]        |
| Italy   | 1990 | SC          | 121               | 1.6%             | 1.6%           | Massa et al. [8]         |
| Norway  | 1991 | SC          | 90                | 11.0%            | n.d.           | Rorvik, Yndestad [10]    |
| France, Germany   | 1995 | SC          | 91                | 22.0%            | 24.2%          | Eppert et al. [2]        |
| Austria, Denmark, UK, France, Germany, Greece, Italy, Netherlands, Norway, Romania, Spain, Sweden             | 1995 | SC, SHC     | 333               | 6.0%             | n.d.           | Loncarevic et al. [7]    |

\*SC: soft cheese, SHC: semi-hard cheese, HC: hard cheese.

## HOLDBAC™ Listeria dairy

HOLDBAC™ Listeria dairy é uma cultura protetora com capacidade para inibir ou controlar o crescimento de certos “strain/serotypes” de *Listeria* (incluindo *L. monocytogenes*);

Tem baixa capacidade de acidificação;

Composta de *Lactobacillus plantarum*



## HOLDBAC™ Listeria dairy aplicação



Dosagem:

Depende da contaminação inicial. Portanto, deve ser avaliada caso a caso.

Identificar parâmetros do processo, a fonte ou compilar toda a informação sobre a presença na planta e produto.

**HOLDBAC™ Listeria dairy não pode substituir as BPF**

## HOLDBAC™ *Listeria* dairy aplicação

Formas de aplicação:

- Direto no leite:
  - 10 IP contaminação inicial - até 7 UFC *Listeria*/ ml de leite
  - > 10 IP com contaminação > 10 UFC *Listeria* / ml de Leite
- aspersão:
  - 0.2 – 0.3 IP por m<sup>2</sup> de superfície – “Spray” deve ser feito no início da maturação no caso de queijos camembert, brie etc.



**HOLDBAC™ *Listeria* dairy não pode substituir as BPF**

## HOLDBAC™ Listeria dairy aplicação

Formas de aplicação:

- na massa:

10 IP **HOLDBAC™ Listeria dairy** misturado com sal e adicionado a 100 kg de massa

**HOLDBAC™ Listeria dairy  
não pode substituir as BPF**



## Linha HOLDBAC™ para produtos lácteos

|                                | <b>HOLDBAC™ YM-B<br/>e YM-B Plus</b>   | <b>HOLDBAC™ YM-C<br/>e YM-C Plus</b>  | <b>HOLDBAC™ LC</b>  |
|--------------------------------|--|---|---|
| <b>Composição</b>              | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i><br><i>Lactobacillus rhamnosus</i>                                      | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i><br><i>Lactobacillus paracasei</i>   | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>  |
| <b>Doses (DCU/100 l leite)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ iogurte, leite fermentado, creme ácido : 10-20 DCU</li> <li>▪ Cottage: 5-10 DCU **</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ iogurte e leites fermentados: 10 DCU-20 DCU</li> <li>▪ Creme ácido: 10-30 DCU</li> <li>▪ Minas Frescal: 2.5 a 5 DCU</li> <li>▪ Cottage: 5-10 DCU **</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Minas Frescal: 2.5 a 5 DCU</li> <li>▪ Queijo de coalho: 2.5 a 5 DCU</li> <li>▪ Queijos duros e semi duros – 10-15 DCU</li> </ul> |
| <b>Modo de uso</b>             | ▪ inocular no mesmo momento da adição do cultivo principal/"starter"   | ▪ inocular no mesmo momento da adição do cultivo principal/"starter"  | ▪ inocular no mesmo momento da adição do cultivo principal/"starter"  |
|                                |  |   |   |

\*\* Sugestão de que o *dressing* do cottage também possa ser adicionado da cultura protetora

## Linha HOLDBAC™ para produtos lácteos

|                                | <b>HOLDBAC™ YM-XPM</b>   | <b>HOLDBAC™ YM-XPk</b>   | <b>HOLDBAC™ Listeria dairy</b>               |
|--------------------------------|--|--|--|
| <b>Composição</b>              | <i>Lactobacillus paracasei</i><br><i>Lactobacillus plantarum</i>   | <i>Lactobacillus plantarum</i>   | <i>Lactobacillus plantarum</i>               |
| <b>Doses (DCU/100 l leite)</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ iogurte, leite fermentado, creme ácido : 10-20 DCU</li> <li>▪ Cottage: 5-10 DCU **</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Queijos semi-duros e duros – 10 DCU/100 litros</li> <li>▪ Cottage: 5-10 DCU **</li> </ul> | Sob consulta                                 |
| <b>Modo de uso</b>             | ▪ inocular no mesmo momento da adição do cultivo principal/"starter"   | ▪ inocular no mesmo momento da adição do cultivo principal/"starter"   | ▪ diferentes formas de Aplicação - consultar |
|                                |  |  |  |

\*\* Sugestão de que o *dressing* do cottage também possa ser adicionado da cultura protetora

# Perguntas....



•Obrigado pela sua atenção

«DUPONT»

**Danisco.**