



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

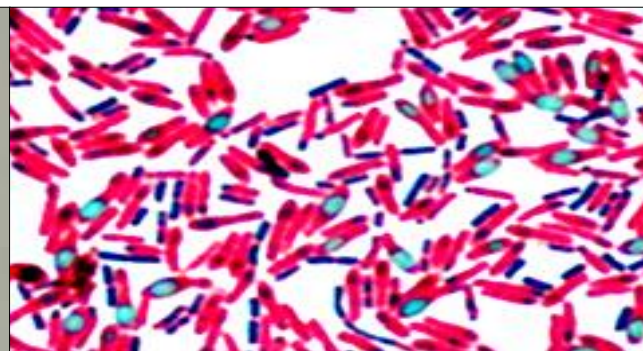
Uma combinação de tratamentos e/ou ingredientes utilizados para aumentar a estabilidade, a segurança e a qualidade dos alimentos deverá ser implementada – é o que chamamos “Hurdle Technology” ou Tecnologia de obstáculos

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

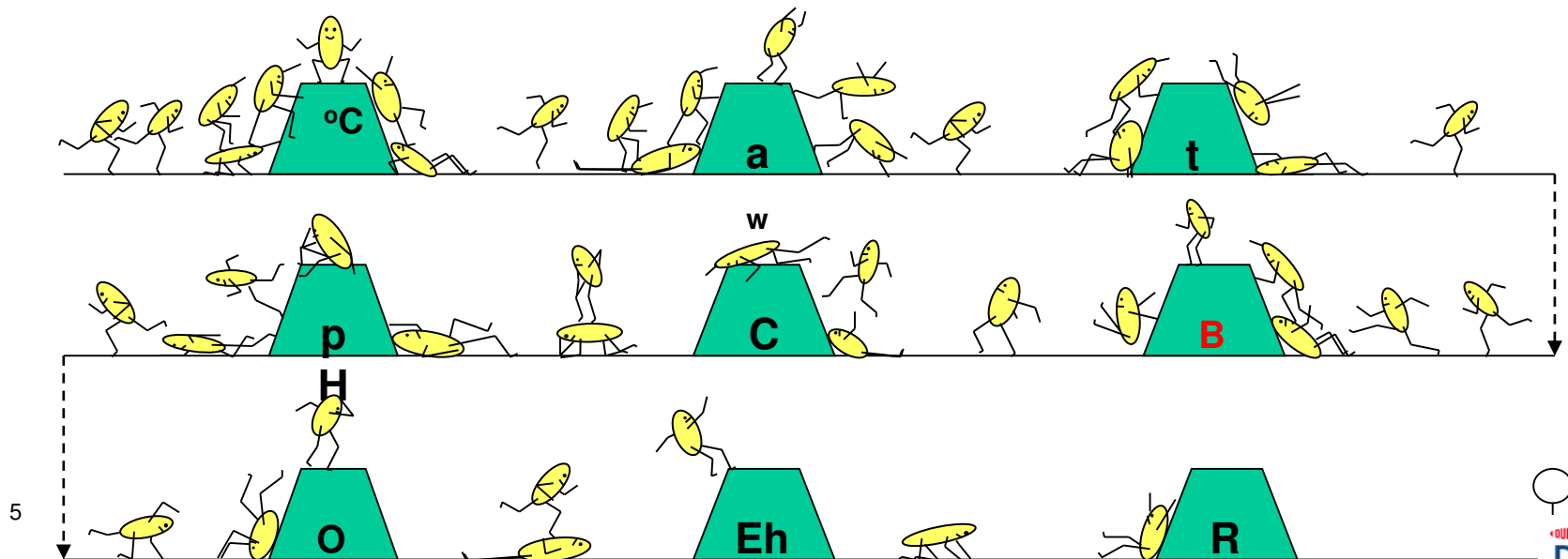
C Conservantes químicos

Eh Tensão de oxigênio
Mudança de Gases

T Temperatura de armazenamento

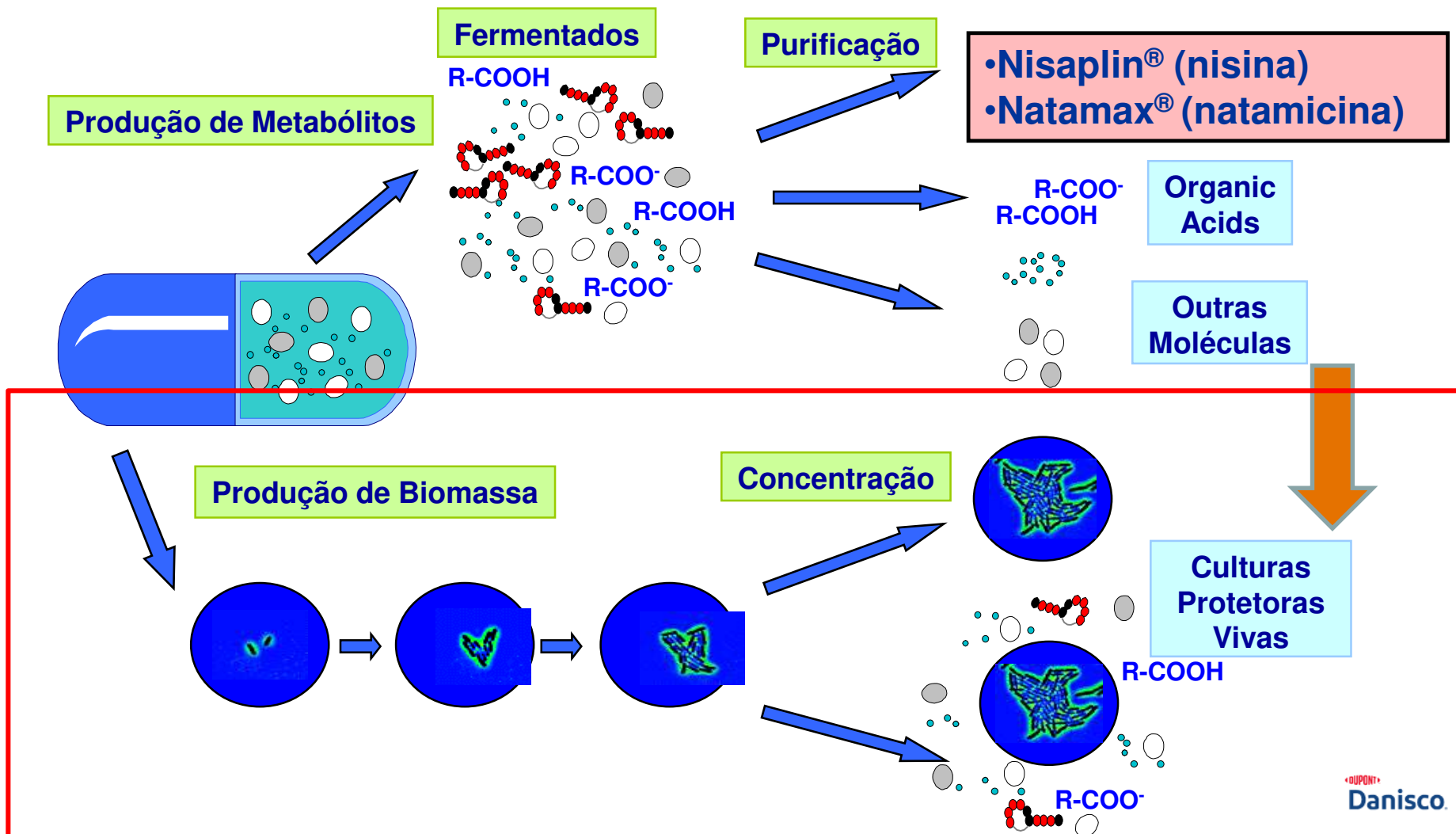
B Antimicrobianos

R Radiação UV γ



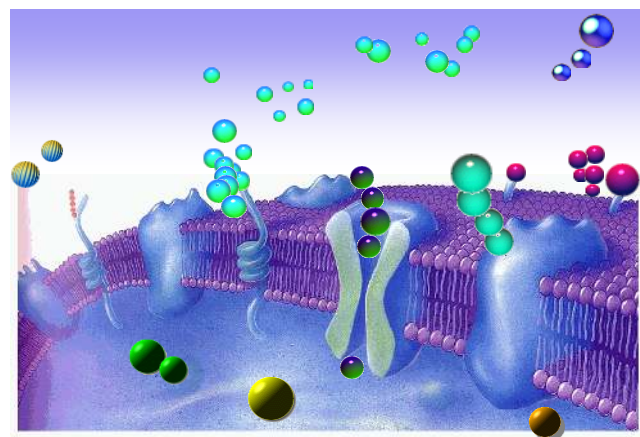
Antimicrobianos Naturais

Preparações purificadas/Biomassa-Cultivos protetores





HOLDBAC™ Cultivos protetores contra Bolores / leveduras / Bactérias



Metabólitos
antimicrobianos



+

Efeitos
de exclusão
competitiva



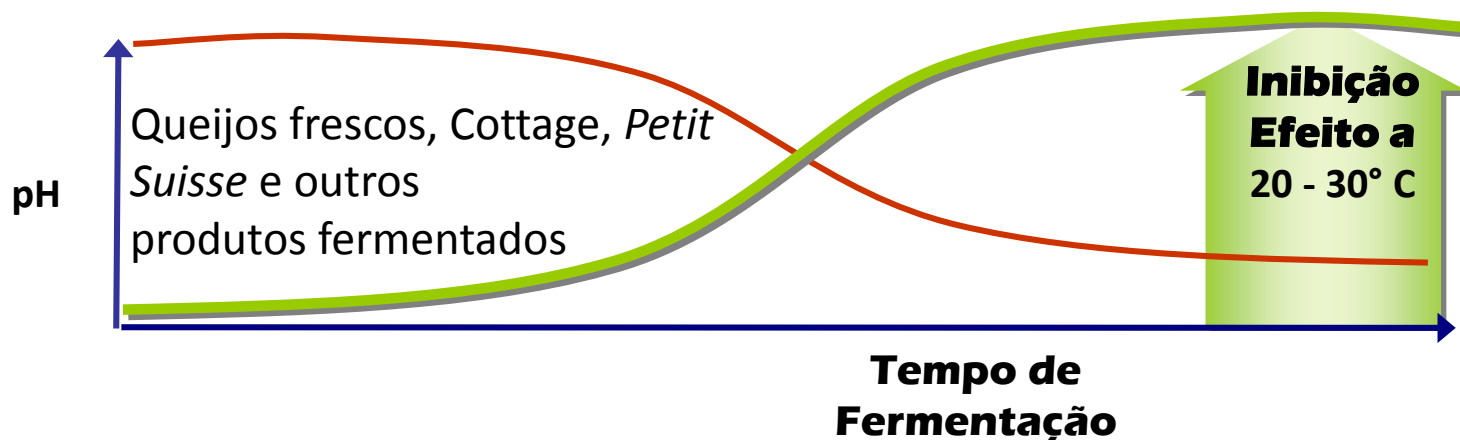
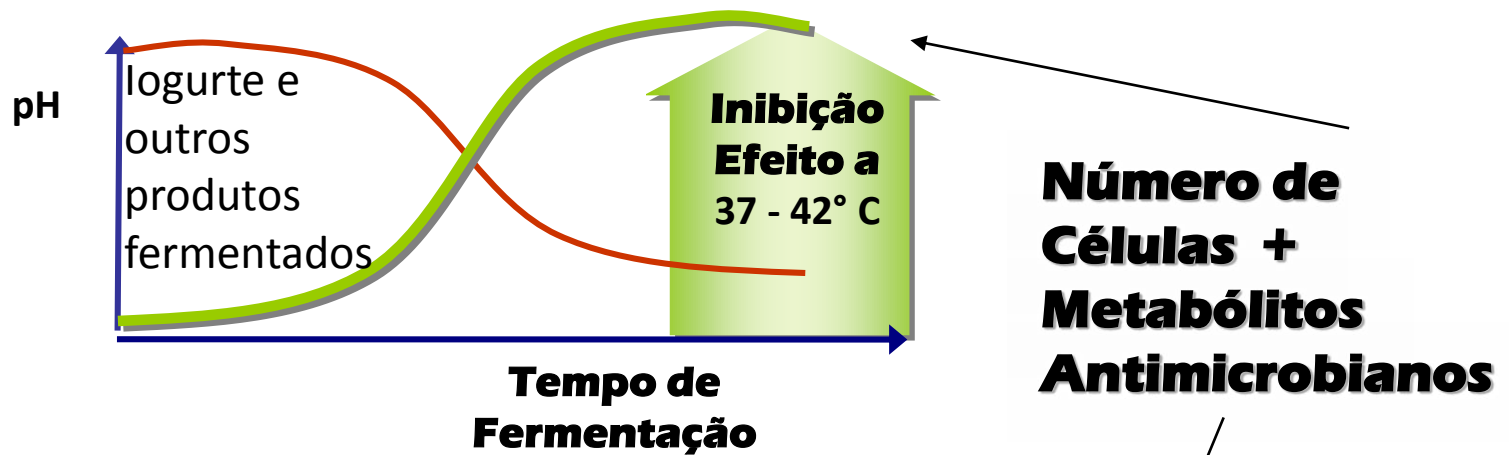
Inibição de
microrganismos
indesejáveis através da
competição por
nutrientes, oxigênio, etc

+

outros
efeitos

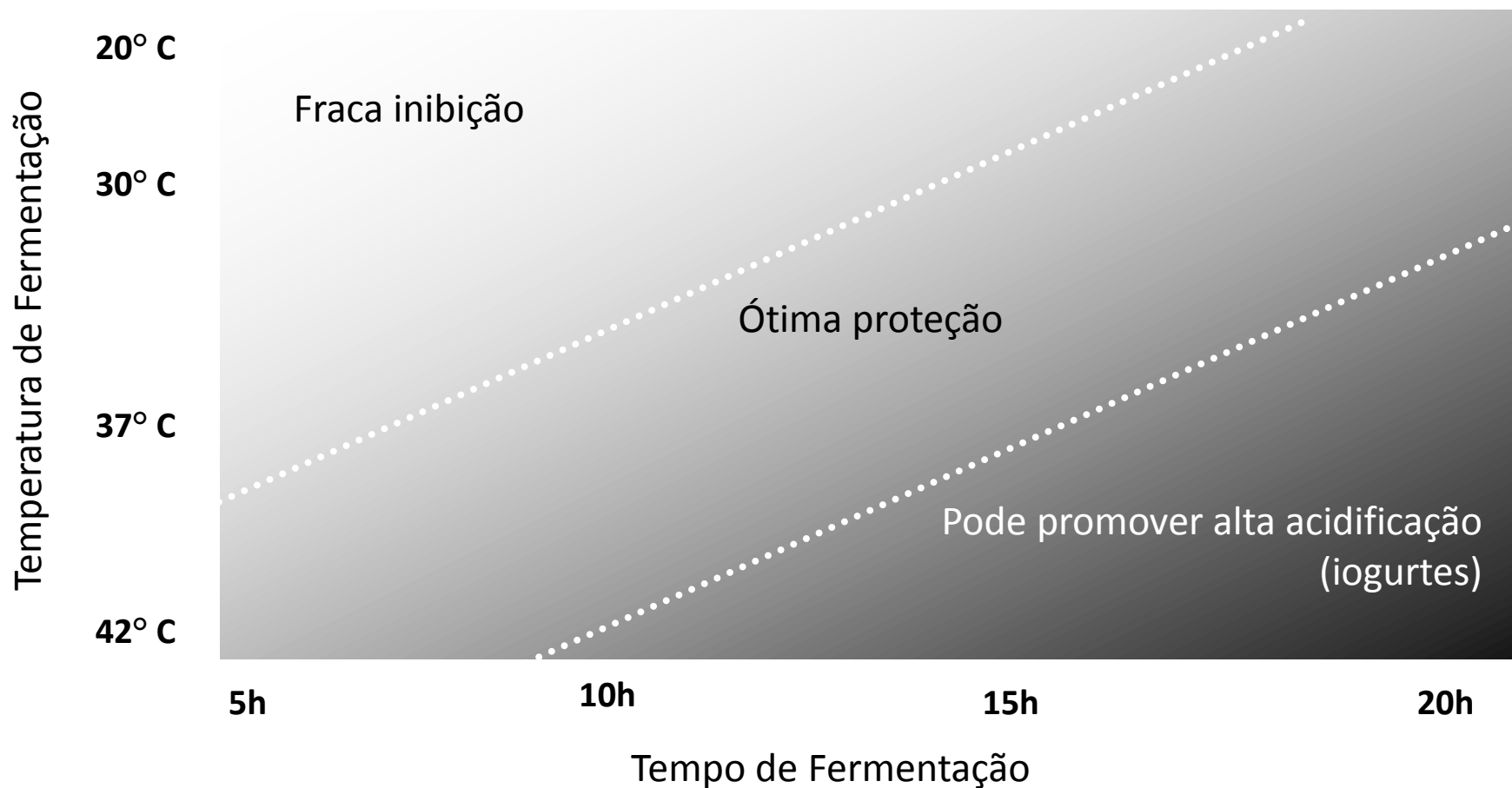


HOLDBAC™ - Culturas protetoras - Potencial inibitório durante a fermentação/processo





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

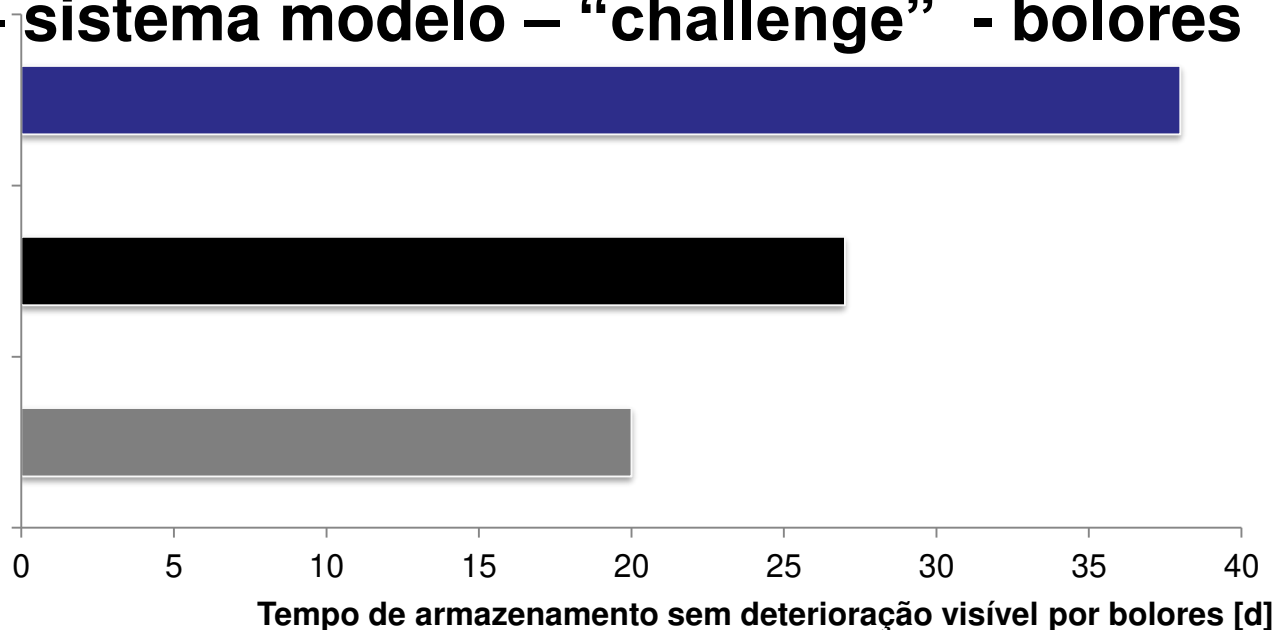
Controlando bolores e leveduras sistema modelo iogurtes / queijos por coagulação ácida

• Iogurte – sistema modelo – “challenge” - bolores

HOLDBAC™ YM-C Plus

Market standard

YO-MIX™ 410

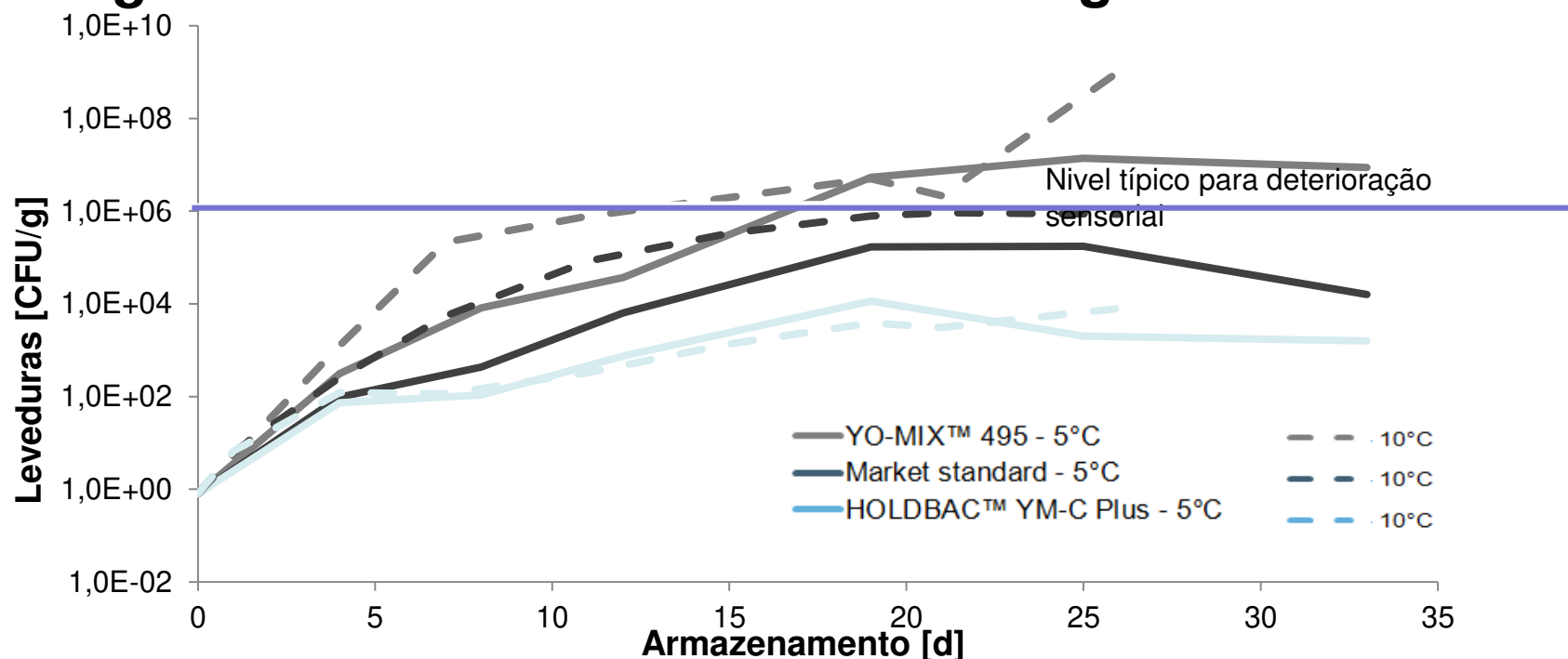


Dose	HOLDBAC™ YM-C Plus ou padrão de mercado com 10 DCU / 100 L de leite
Desafio com bolores	Pool de 3 de cepas de bolores a 15 esporos/g
Cultivo de iogurte	YO-MIX™ 410
Condições do estudo	Armazenamento a 5° C por 38 dias

HOLDBAC™ YM Plus

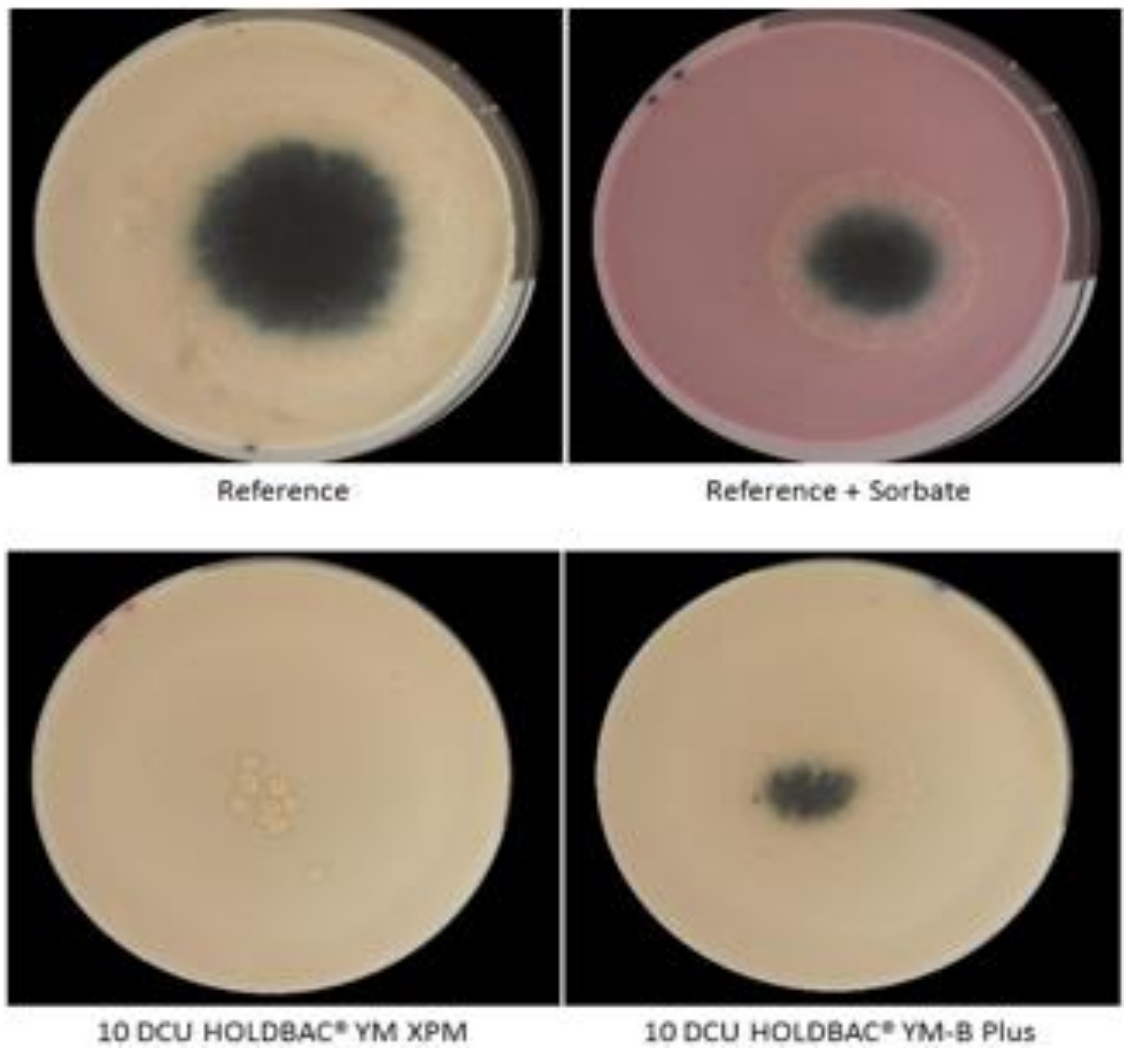
Controlando bolores e leveduras sistema modelo iogurtes / queijos por coagulação ácida

• Iogurte – sistema modelo – “challenge” - leveduras



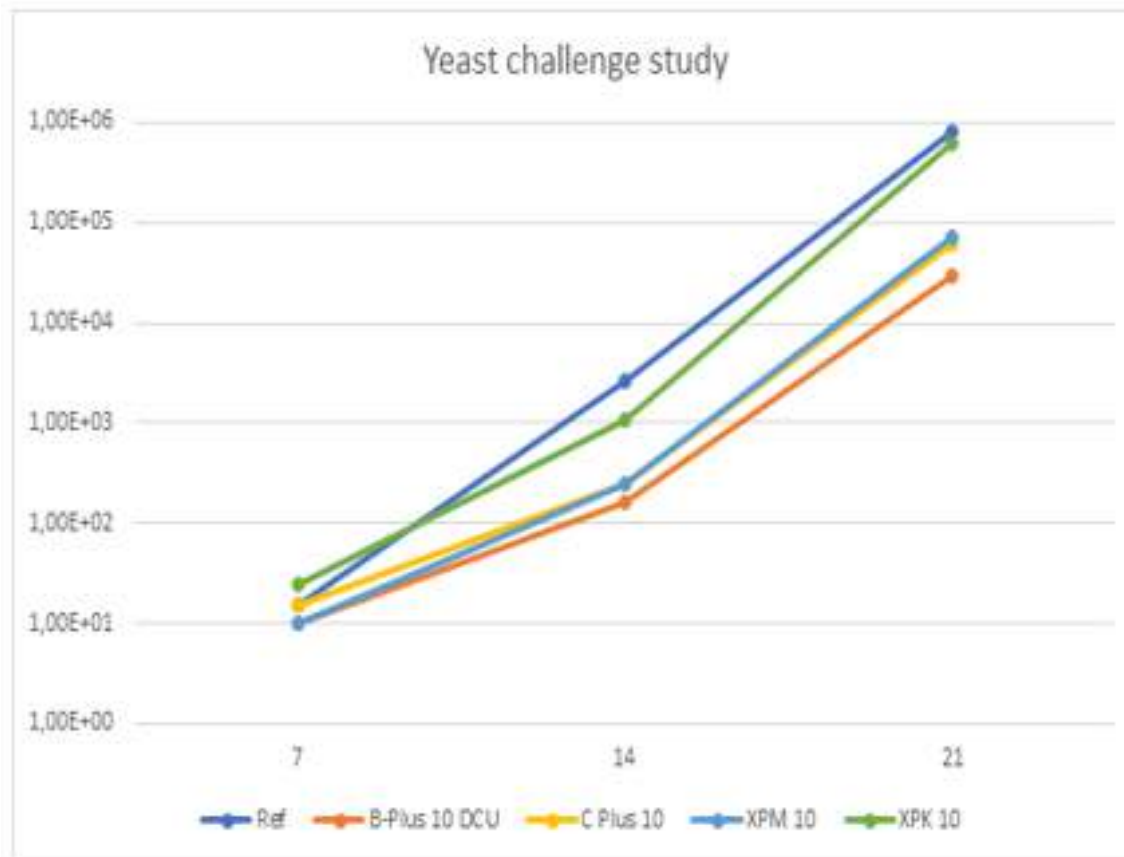
Dose	HOLDBAC™ YM-C Plus ou u padrão de mercado com 10 DCU / 100 L de leite
Desafio com leveduras	Pool de cepas de leveduras com 8 CFU/10 g
Condições do estudo	Armazenamento a 5° C o u 10° C por até 33 dias

HOLDBAC™ YM line – Controlando bolores em fermentados



YO-RAPID - *P. roqueforti*

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
Padrão	-	+ /-	+	+ +
HOLDBAC™ YM-C 5 DCU / 100 lts	-	-	-	+ /-
HOLDBAC™ LC 2,0 DCU / 100 lts	-	-	+ /-	+

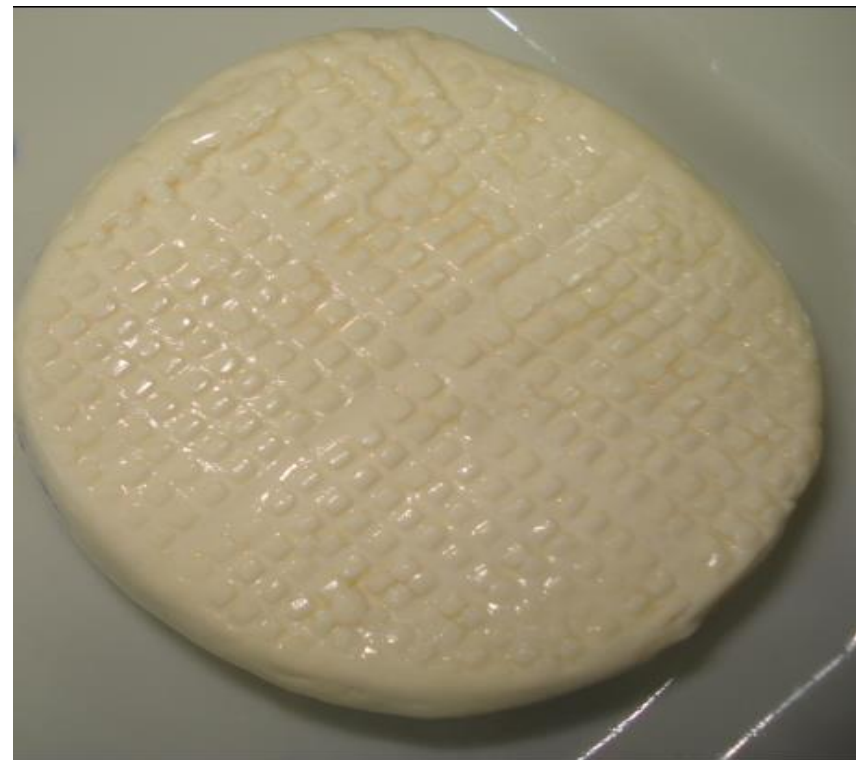


HOLDBAC™ YM e HOLDBAC™ LC

“Minas Frescal”



Padrão
Após 14 dias - início de casca melada

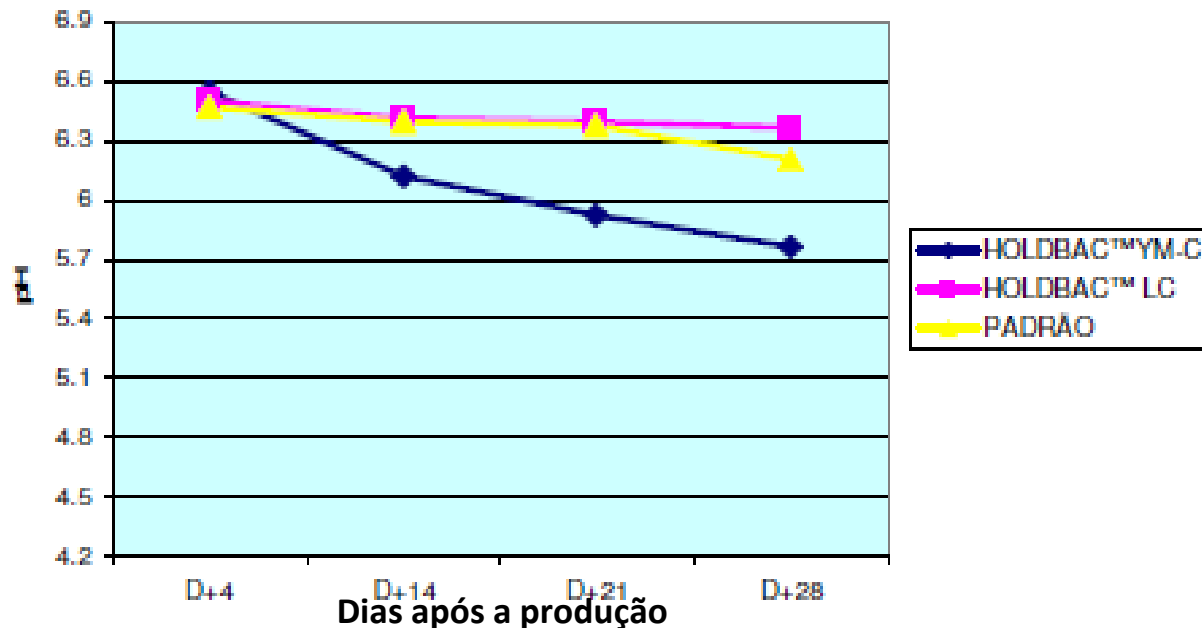


HOLDBAC™ LC
Após 21 dias - início de casca melada
HOLDBAC™ YM-C
Após 28 dias - início casca melada



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)



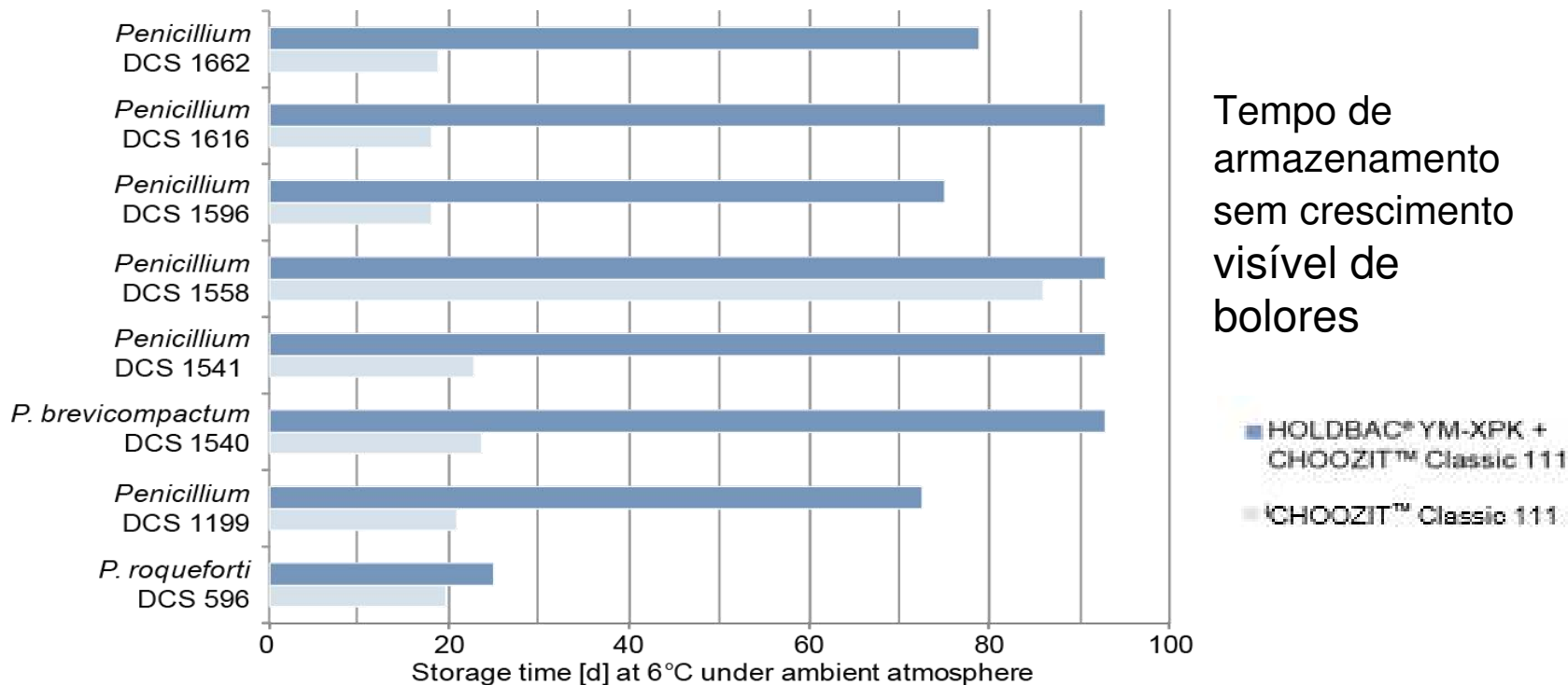
HOLDBAC™ YM-XPB

Nova proteção de bolores e leveduras para seus queijos



HOLDBAC™ YM-XPK

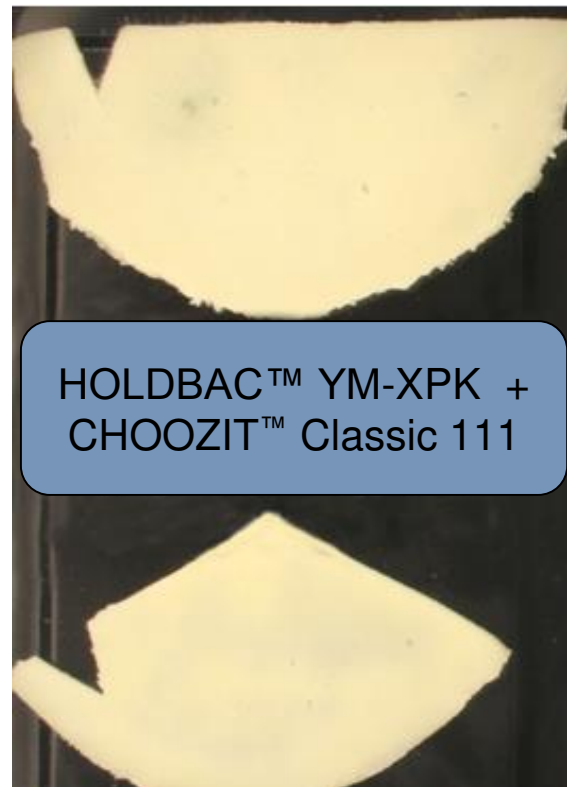
Controlando bolores e leveduras para minimizar perdas – queijos semi-duros



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

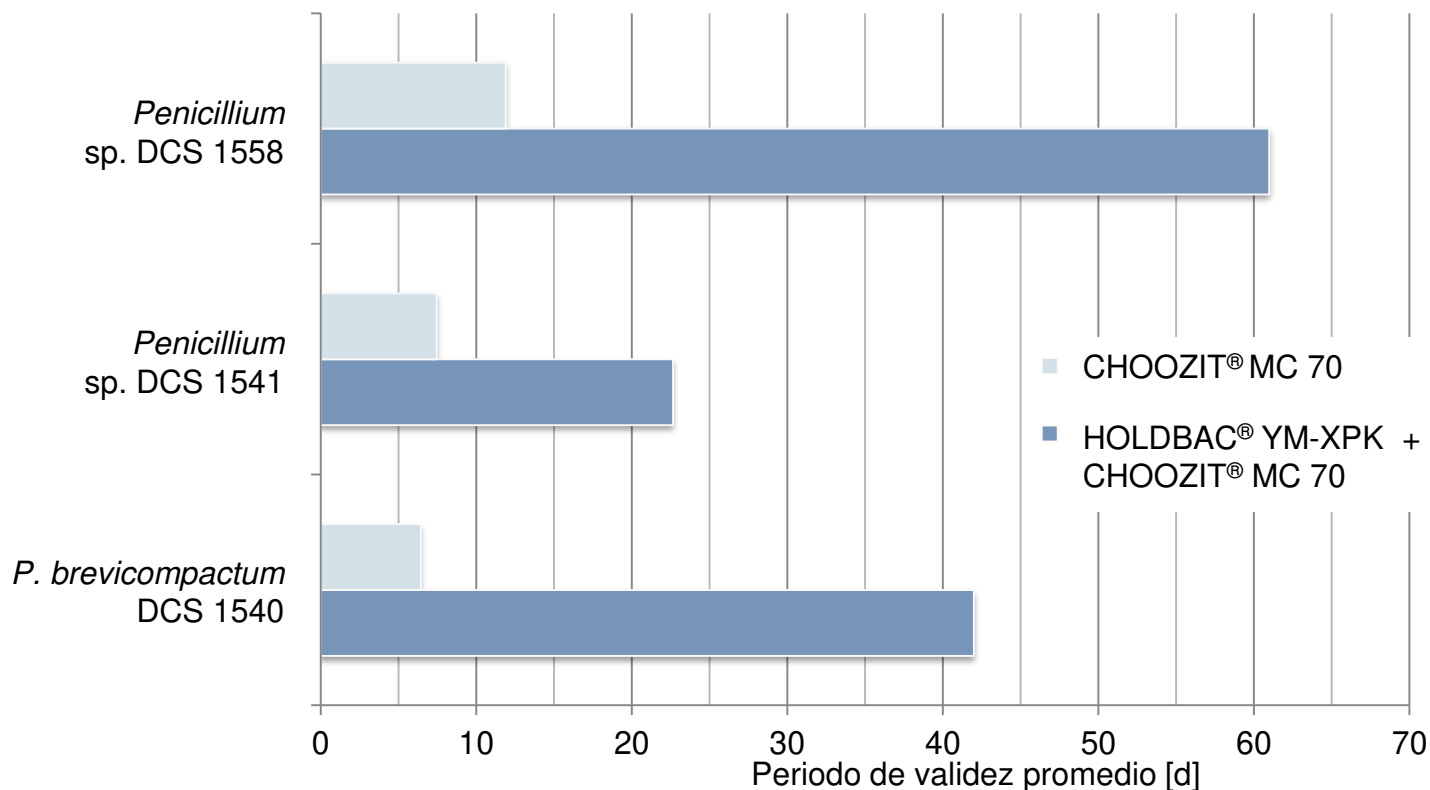
Controlando bolores e leveduras - queijos semi-duros



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**

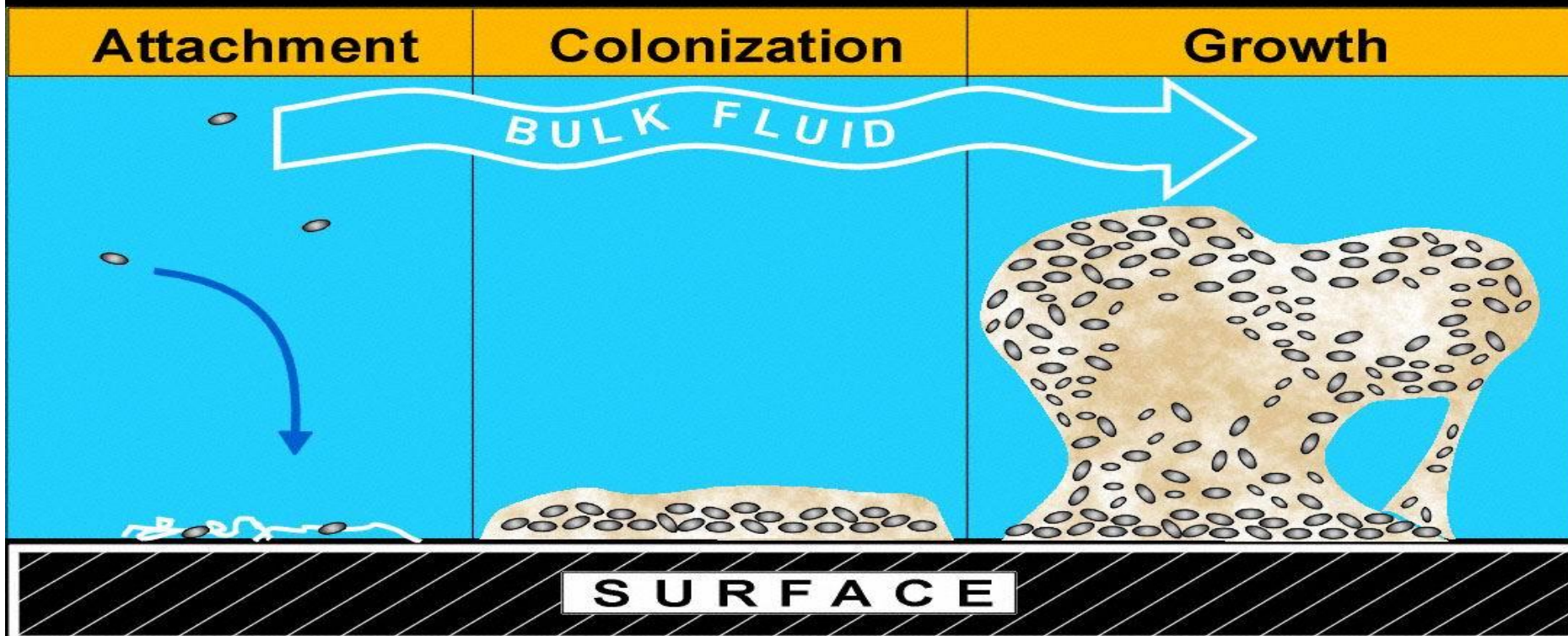


HOLDBAC™ LC e as NSLAB - BIOFILMES



HOLDBAC™ LC e as NSLAB - BIOFILMES

Biofilm formation:





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





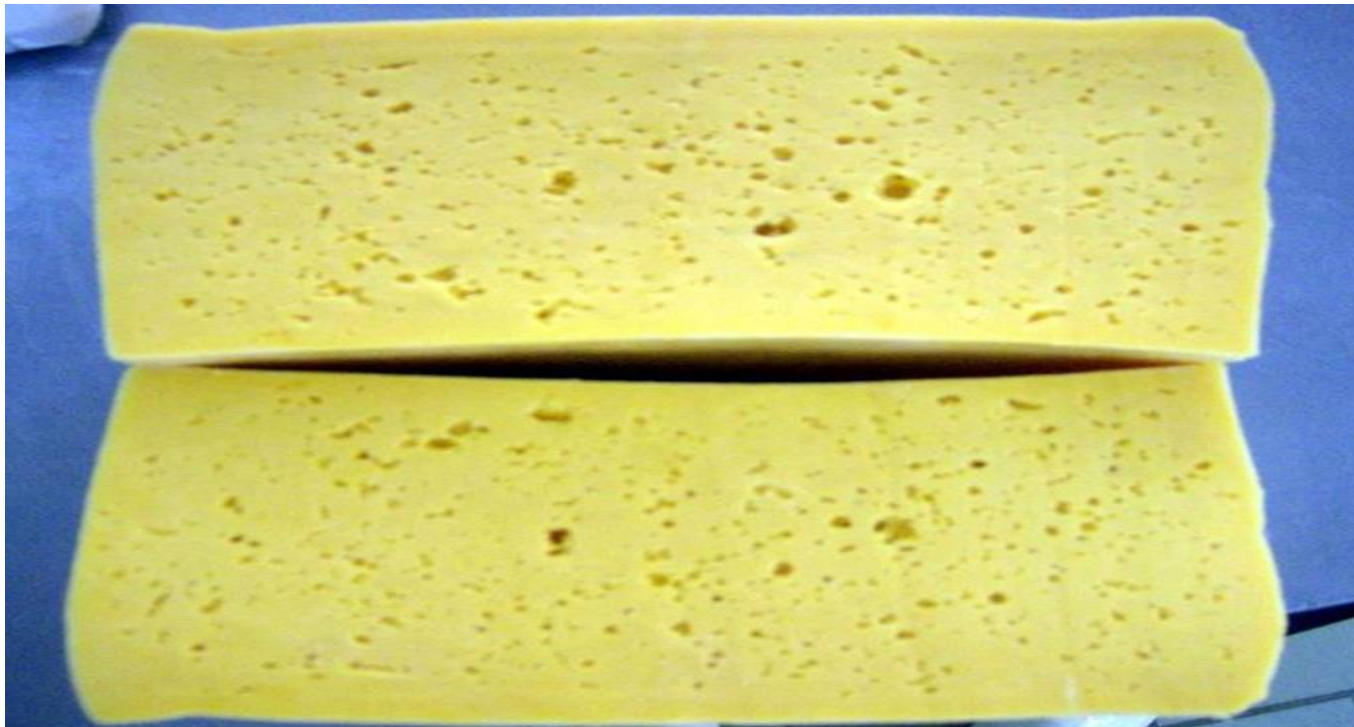
HOLDBAC™ LC e as NSLAB **queijo de coalho**

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

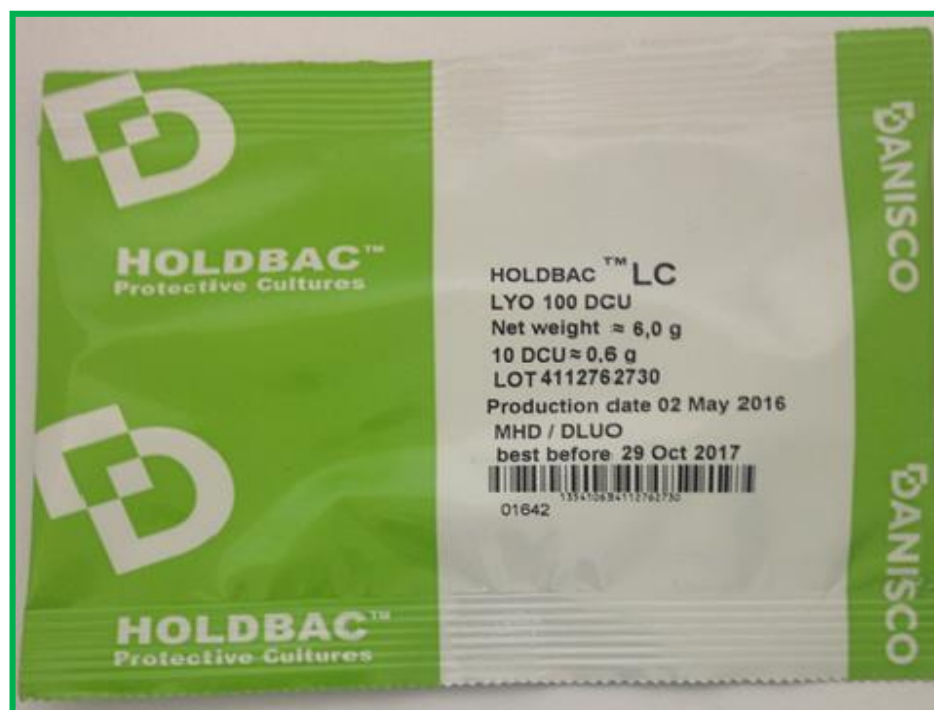




HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijos semi-duros e duros

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





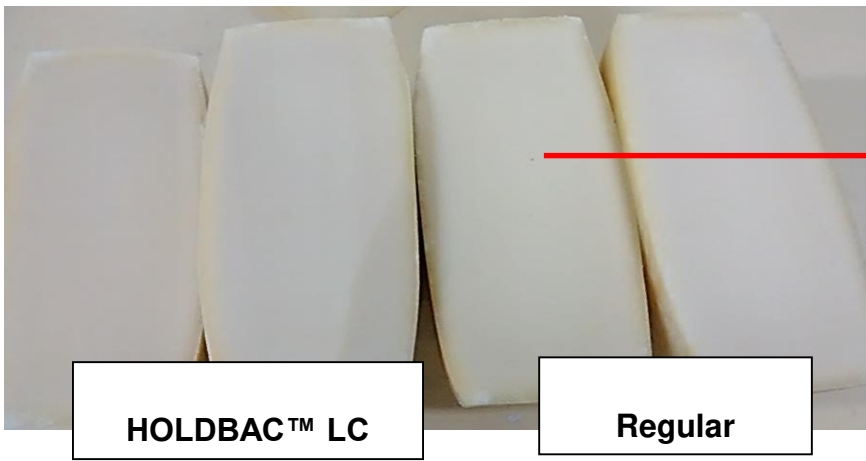
HOLDBAC™ LC e as NSLAB

Queijos na saída da salmoura – 3 dias de elaboração



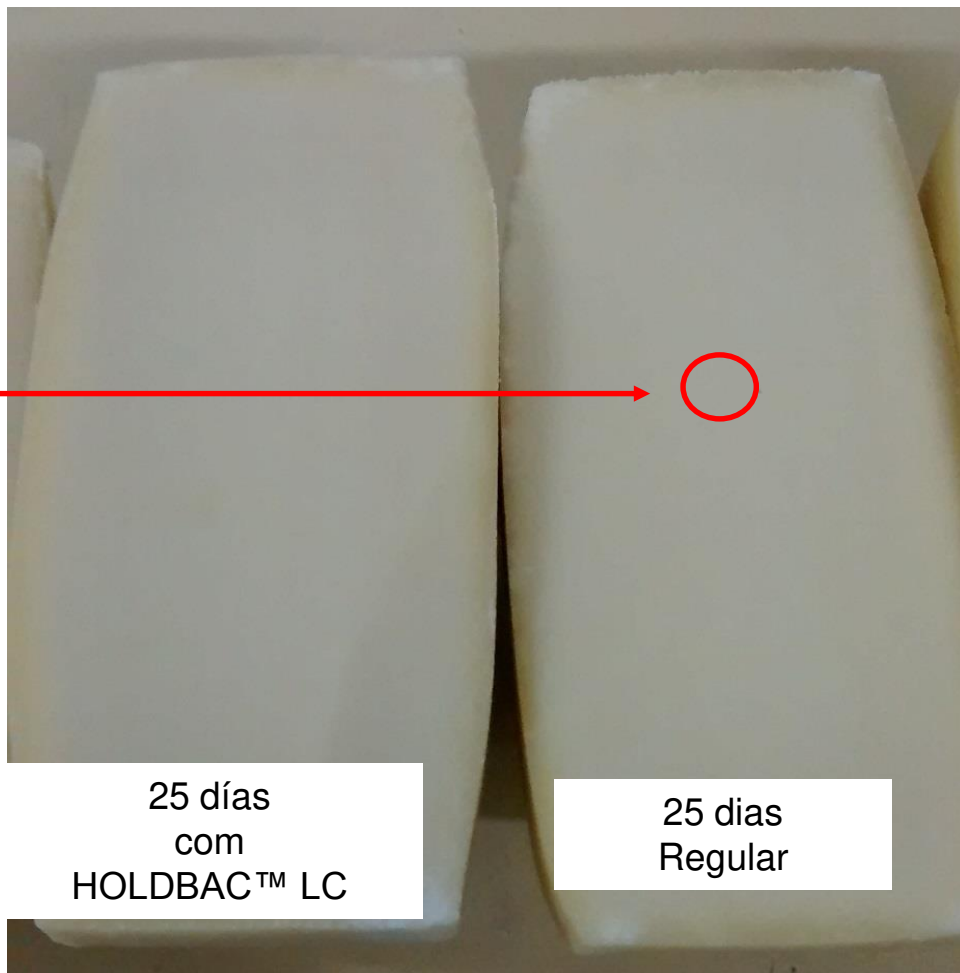
HOLDBAC™ LC e as NSLAB

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

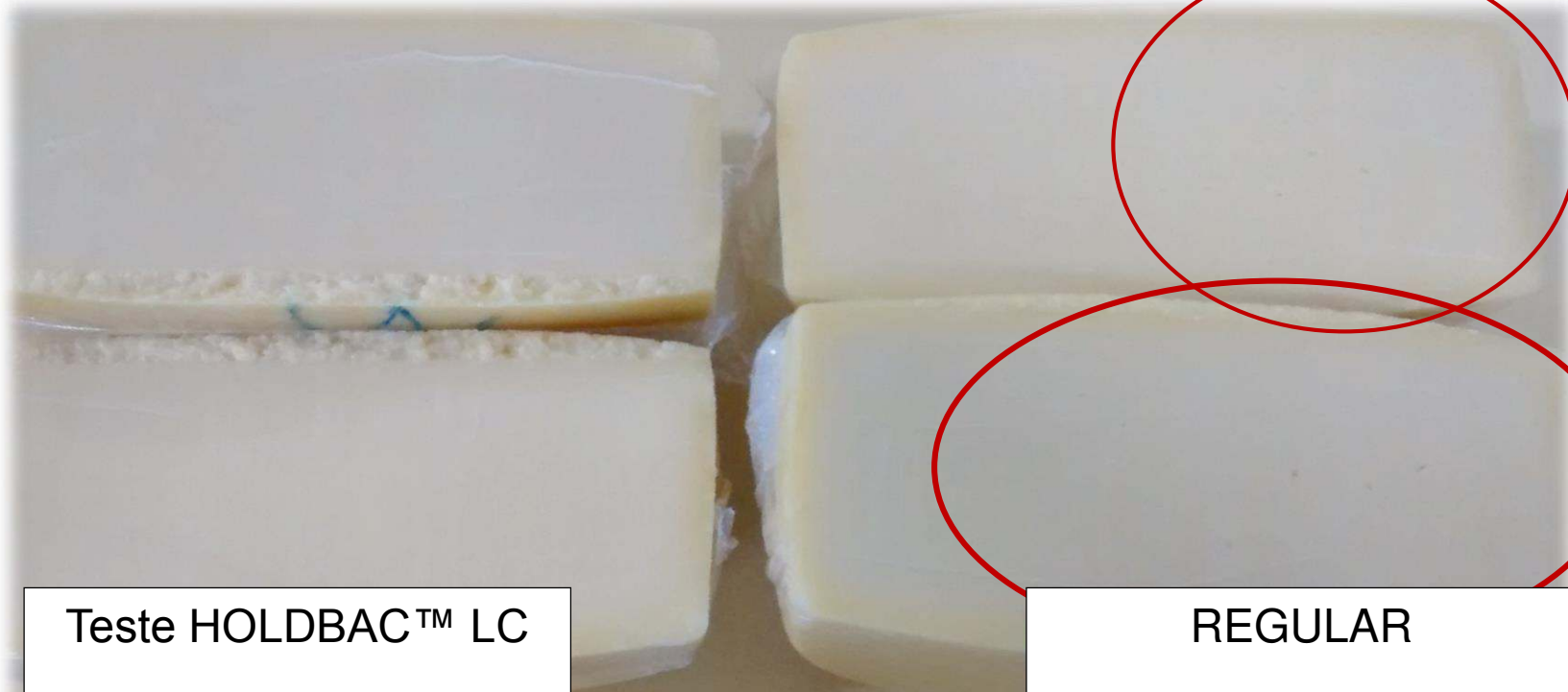




HOLDBAC™ LC e as NSLAB

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

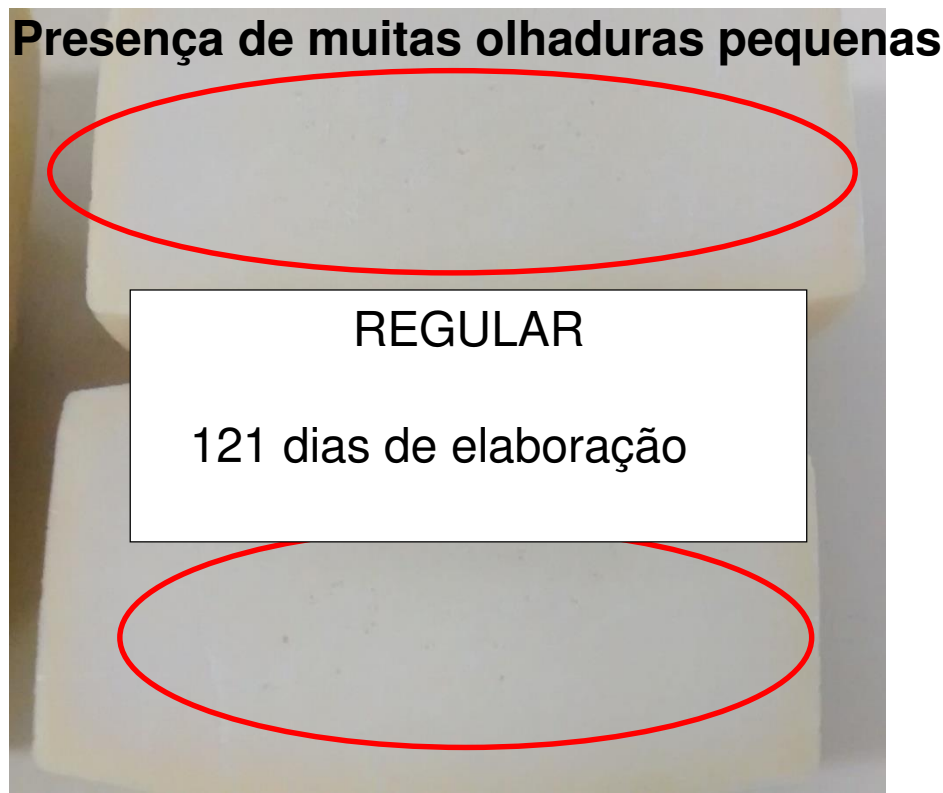
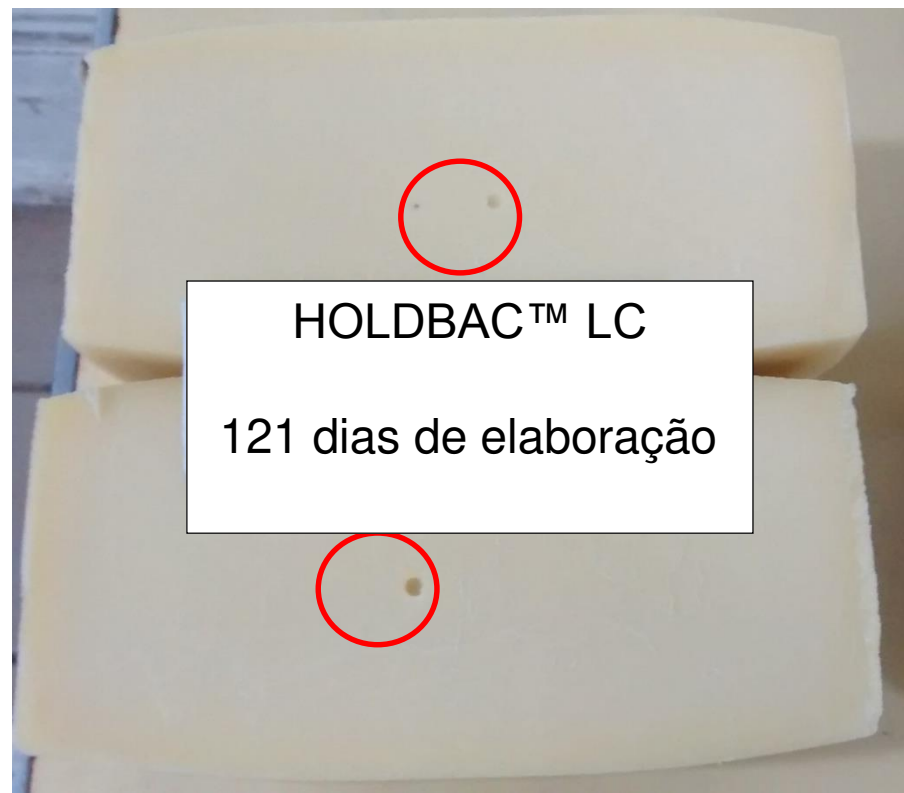
64 dias de elaboração



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			NUMBER OF	L. MONO-	OTHER	AUTHORS
CHEESE	YEAR	CHEESE*	SAMPLES	CYTOGENES	LISTERIA	
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 m² 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

	HOLDBAC™ YM-B e YM-B Plus	HOLDBAC™ YM-C e YM-C Plus	HOLDBAC™ LC
Composição	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Doses (DCU/100 l leite)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iogurte, leite fermentado, creme ácido : 10-20 DCU ▪ Cottage: 5-10 DCU ** 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iogurte e leites fermentados: 10 DCU-20 DCU ▪ Creme ácido: 10-30 DCU ▪ Minas Frescal: 2.5 a 5 DCU ▪ Cottage: 5-10 DCU ** 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Minas Frescal: 2.5 a 5 DCU ▪ Queijo de coalho: 2.5 a 5 DCU ▪ Queijos duros e semi duros – 10-15 DCU
Modo de uso	▪ 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

	HOLDBAC™ YM-XPM	HOLDBAC™ YM-XPk	HOLDBAC™ Listeria dairy
Composição	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Doses (DCU/100 l leite)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ iogurte, leite fermentado, creme ácido : 10-20 DCU ▪ Cottage: 5-10 DCU ** 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Queijos semi-duros e duros – 10 DCU/100 litros ▪ Cottage: 5-10 DCU ** 	Sob consulta
Modo de uso	▪ 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.