Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes

Vanessa Cristina Nogueira

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2010

Vanessa Cristina Nogueira
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservante

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Nogueira, Vanessa Cristina
Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservante / Vanessa Cristina Nogueira. - - Piracicaba, 2010.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias láticas 2. Bacteriocinas 3. Conservação de alimentos 4. Microbiologia de alimentos 5. Probióticos I. Título

CDD 576.163
N778c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. A toda minha família, em especial os meus pais, que sempre deram todo apoio necessário a conquista de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter colocado pessoas especiais em meu caminho.

Ao Prof. Ernani pelo apoio e orientação.

À Izildinha pelos conselhos e orientação.

A Renata Bromberg, CTC, pela realização do projeto.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a todos os professores e funcionários do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição pela minha formação acadêmica.

A todos os membros da banca examinadora.

A toda equipe de pesquisadores e funcionários do TECNOLAT pelo convívio e colaboração que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

As amigas Andressa Vieira e Luciana Magosso pela amizade, pelo companheirismo, por dividirem comigo todos os momentos de execução deste trabalho, principalmente os mais difíceis e cansativos, fazendo com que fosse possível a realização deste por meio da formação da EQUIPE da bacteriocina e também a Juliana Carusi, por todo auxílio, disponibilidade e sua amizade especial.

Às amigas Luciana Kimie e Bruna Nicolosi pela amizade, apoio, incentivo e carinho, por compartilharem meus momentos de alegria e tristezas e também por terem auxiliado, cedendo gentilmente suas casas, para que eu pudesse cursar as disciplinas.

Às amigas Lígia Dozena e Luciane Berno pela amizade por estarem disponíveis, mesmo a distância, para ouvirem meus desabafos e lamentos e se alegrarem comigo com todas as conquistas.

A todos do SENAI/CTSA pelo apoio. Em especial a Eliene Quéren, Sandra Almeida, Grazille Elias, Gisela Pizarro, Karine Theodoro, Paulo Vitor e Elisangela Piva pela amizade e por tornarem meus dias de trabalho mais alegre.

Ao Emilio pelo carinho, dedicação e por me fazer forte nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, José Carlos e Sueli, pelo apoio incondicional.
A toda minha família pelo apoio e carinho sempre.
À FAPESP pelo apoio financeiro.
A todos aqueles que acreditam e torcem por mim.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

Benjamin Disraeli

SUMÁRIO

RESUMO....13
ABSTRACT....15
1 INTRODUÇÃO....17
2 OBJETIVOS....19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA....21
3.1 Biopreservação....21
3.2 Bacteriocinas de bactérias lácticas....22
3.2.1 Classes de bacteriocinas....22
3.3 Espectro de atividade antimicrobiana....25
3.4 Biossíntese e produção....25
3.5 Purificação de bacteriocinas....26
3.6 Fatores que afetam a produção de bacteriocinas....27
3.6.1 Cloreto de sódio....28
3.6.2 Nitrito....28
3.7 Segurança alimentar, conservação e deterioração: aplicações em alimentos....29
3.8 Propriedades probióticas....31
4 MATERIAL E MÉTODOS....35
4.1 Bactérias lácticas e suas origens....35
4.2 Determinantes de patogenicidade e propriedades probióticas....37
4.2.1 Atividade de termonuclease....37
4.2.2 Atividade de citolisinas....37
4.2.3 Atividade de gelatinases....37
4.2.4 Tolerância a baixos valores de pH....38
4.2.5 Resistência a sais biliares....38
4.3 Espectro de atividade e modo de ação....39

4.3.1 Método de diluição crítica 39
4.3.2 Método de antagonismo simultâneo 39
4.3.3 Modo de ação 40
4.4 Características de crescimento e produção de bacteriocinas 41
4.4.1 Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultivos 41
4.4.2 Extração das bacteriocinas aderidas às células produtoras 41
4.4.3 Parâmetros de fermentação 42
4.4.4 Efeito de fatores limitantes do crescimento: NaCl e nitrito 43
4.5 Purificação parcial das bacteriocinas 44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 Determinantes de patogenicidade 45
5.1.1 Atividade de termonucleases, hemolisinas e gelatinase 45
5.2 Propriedades probióticas 47
5.2.1 Tolerância às condições de pH ácido 47
5.2.2 Tolerância à sais biliares 51
5.3 Espectro de atividade e modo de ação 54
5.3.1 Espetro de atividade 54
5.3.2 Modo de ação das bacteriocinas 56
5.4 Características de produção de bacteriocinas 60
5.4.1 Em diferentes meios de cultivo 60
5.4.2 Efeito de fatores limitantes do crescimento: NaCl e nitrito 72
5.5 Purificação parcial das bacteriocinas 76
5.5.1 Parâmetros cinéticos de produção de bacteriocina 76
5.5.2 Extração das bacteriocinas aderidas às células produtoras 80
5.5.3 Espectro de atividade das bacteriocinas cruas e purificadas 81

5.5.4 Espectro de atividade dos dos sobrenadantes bacteriocinas pré-purificadas.....83
6 CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS 87
ANEXOS 97

RESUMO

Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes

Além das características tecnológicas das bactérias lácticas para o processamento de alimentos fermentados, novas propriedades são requeridas, como a produção de bacteriocinas. Vários desses compostos protéicos possuem atividade antimicrobiana direcionada à patógenos e apresentam potencial de uso como bioconservadores naturais de alimentos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a viabilidade de aplicação de cinco culturas lácticas produtoras de bacteriocinas como bioconservantes em alimentos. Avaliaram-se as propriedades de segurança e probióticas dessas culturas e determinaram-se os parâmetros de produção e purificação parcial das bacteriocinas, bem como os efeitos de fatores limitantes de crescimento (cloreto de sódio e nitrito). Os resultados demonstraram que essas linhagens não possuem atividade de enzimas indicadoras de patogenicidade (termonuclease, β-hemolisinas e gelatinases). A tolerância às condições ácidas variou dependendo da linhagem. *Lactobacillus plantarum* CTC 368 e *Enterococcus avium* CTC 469 apresentaram maior tolerância a valores de pH 2,0 e 3,0. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Enterococcus avium* CTC 483 também apresentaram 100% de sobrevivência a pH 3,0 e, mesmo com uma diminuição da tolerância a pH 2,0, a sobrevivência foi cerca de 80%. Com relação à susceptibilidade aos sais de bile, observou-se que a viabilidade variou entre as linhagens em função da concentração e tempo de incubação. *Enterococcus avium* CTC 469 e *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 foram as mais tolerantes e apresentaram sobrevivência de 57% e 58%, respectivamente. As linhagens mostraram excelente sobrevivência tanto a baixos valores de pH, quanto às concentrações de sais biliares indicando potencial probiótico. As características de crescimento e de produção de bacteriocinas foram semelhantes para todas as linhagens e meios avaliados. A viabilidade aumentou durante o período de incubação e a produção de bacteriocinas mostrou uma cinética de metabólito primário. A suplementação do meio MRS com 1,0% de NaCl e 0,1% de $NaNO_2$, não afetou o crescimento de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, mas promoveu a redução da atividade da bacteriocina de 42,5% e 17,5%, respectivamente. O crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 foi afetado com a adição de NaCl e $NaNO_2$ ao meio APT, mas ainda reteve 50% da atividade bacteriocigênica. O espectro de atividade das bacteriocinas variou de acordo com a susceptibilidade da linhagem indicadora, a concentração ou atividade da bacteriocina, a viabilidade e/ou presença das células produtoras e os procedimentos de extração das bacteriocinas. Os resultados revelaram que as bacteriocinas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactococcus. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 promoveram um efeito bactericida contra *Staphylococcus aureus*. Concluiu-se que essas duas culturas produtoras de bacteriocinas apresentam propriedades para utilização como bioconservantes em alimentos e que estudos mais aprofundados, relacionados com a purificação da bacteriocina e avaliação de seu uso em alimentos, devem ser realizados.

Palavras-chave: Bacteriocinas; Bactérias lácticas; Bioconservação; Probióticos

ABSTRACT

Lactic bacteria cultures with probiotic and technological properties for use as biological food preservatives

In addition to the technological characteristics of lactic bacteria for the processing of fermented foods, other properties need to be developed and explored, such as bacteriocin production. Several of these protein-based compounds have antimicrobial activities targeted towards pathogens and have a significant potential for use as natural biopreservatives in processed foods. The objective of this study was to evaluate the viability of using five bacteriocin-producing lactic cultures as biopreservatives in foods. The safety and probiotic properties of these cultures were evaluated, followed by the determination of bacteriocin production and purification parameters and the effect of growth-limiting factors (sodium chloride and nitrite). The results demonstrated that these strains do not show activity of marker enzymes of pathogenicity (thermonuclease, β-hemolysins and gelatinases). Tolerance to acidic conditions varied depending on the specific strain. *Lactobacillus plantarum* CTC 368 and *Enterococcus avium* CTC 469 exhibited greater tolerance to pH values 2,0 and 3,0. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and *En. avium* CTC 483 also presented 100% survival at pH 3,0, and even with reduced tolerance at pH 2,0, the survival rate was 80%. Variation in susceptibility to bile salts was observed between the strains as a function of concentration and incubation time. *En. avium* CTC 469 and *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 were found to be the most tolerant, exhibiting survival rates of 57% and 58%, respectively. The strains demonstrated excellent survival not only at low pH values, but also at high bile salt concentrations, thereby indicating probiotic potential. The growth and bacteriocin-producing characteristics were similar for all the strains and culture media evaluated. Bacterial multiplication increased during the incubation period, while bacteriocin production displayed primary metabolite kinetics. The activity spectrum of the bacteriocins varied with the susceptibility of the indicator strain, the concentration or activity of the bacteriocin, the viability and/or presence of bacteriocin-producing cells and the bacteriocin extraction procedures. The results reveal that the bacteriocins produced by *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 exerted a bactericidal effect against *Staphylococcus aureus*. Supplementation of the MRS medium with 1,0% NaCl and 0,1% $NaNO_2$, did not affect the growth of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, but did reduce by 42,5% and 17,5% the activity of the bacteriocin, respectively. Growth of *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 was affected by the addition of NaCl and $NaNO_2$ to the APT medium, but even so still exerted 50% of its *bacteriocinogenic* activity. It was concluded that *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 exhibited adequate properties for use as biopreservatives in foods and that more extensive studies related to the purification of bacteriocins and assessment of their use in foods should be conducted.

Keywords: Bacteriocins; Lactic acid bacteria; Biopreservation; Probiotics

1 INTRODUÇÃO

Além das propriedades tecnológicas apresentadas pelas bactérias lácticas no processamento de alimentos fermentados, novas propriedades são requeridas, dentre as quais, a produção de peptídeos ou proteínas antimicrobianas. Esses compostos são denominados de bacteriocinas e apresentam potencial de uso como bioconservadores naturais de alimentos, devido a sua atividade antagonística direcionada a uma variedade de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureu*s e *Bacillus cereus*, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos. Até o momento não existem evidências de que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas promovam algum efeito sobre bactérias Gram-negativas, sem o efeito combinado de agente quelante. Esta característica pode ser considerada um fator limitante na aplicação desses compostos na biopreservação de alimentos, mas pode representar determinadas vantagens.

As bacteriocinas podem ser empregadas como antimicrobianos direcionados contra patógenos específicos, sem prejudicar os benefícios da microbiota desejável. De certa forma, as bacteriocinas também podem limitar o uso exacerbado de antibióticos e, desta forma, prolongar a evolução da característica de resistência à antibióticos. Salvo essa preocupação, a crescente consciência dos consumidores do potencial risco à saúde associado ao consumo de conservantes químicos tem gerado um interesse da indústria de alimentos em novas bacteriocinas. Visto que são produzidas por bactérias lácticas GRAS, estes antimicrobianos são mais facilmente aceitos pelos consumidores.

Observa-se, nesta última década, uma intensa procura por bacteriocinas e várias classes já foram caracterizadas, mas até o momento somente a nisina é aprovada para uso comercial. Dentre as maiores desvantagens da utilização da nisina encontram-se a inibição de muitas bactérias lácticas, a existência de culturas resistentes, a enorme variação de sensibilidade apresentada pelas culturas sensíveis e as limitações com relação ao seu espectro de ação e sua baixa solubilidade em pH básico. Nesse contexto, a detecção de novos tipos de bacteriocinas que não apresentem estas mesmas limitações é desejável.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

Caracterizar cinco culturas de bactérias lácticas, anteriormente isoladas de produtos cárneos, quanto ao seu potencial probiótico, inclusive a presença de determinantes de patogenicidade;

Avaliar o espectro de atividade e o modo de ação dessas bactérias produtoras de bacteriocinas contra microrganismos patogênicos e deteriorantes relacionados com alimentos;

Determinar as características de crescimento e a produção de bacteriocinas dessas culturas em quatro meios de cultivo, bem como avaliar o efeito da suplementação com NaCl e nitrito nessas características;

Proceder à concentração e pré-purificação dessas bacteriocinas e determinar o espectro de atividade das bacteriocinas pré-purificadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biopreservação

A utilização de microbiota protetora ou seus peptídeos antimicrobianos, técnica esta denominada bioconservação ou biopreservação, consiste em uma nova alternativa tecnológica para estender a vida útil e aumentar a segurança dos alimentos, tornando-os mais competitivos. Um exemplo desta técnica é a fermentação láctica que apesar de ser antiga, é até hoje, amplamente empregada na indústria de alimentos. A redução de pH devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico, a partir da fermentação de carboidratos disponíveis nos alimentos é responsável pelo principal efeito antagonista contra diferentes microrganismos. Contudo, a competição por nutrientes e a produção de outras substâncias com efeito inibitório (peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas) são importantes mecanismos antimicrobianos exercidos pelas bactérias lácticas (MAGRO et al., 2000).

Para se manter competitiva, a indústria de alimentos deve atender aos requerimentos dos consumidores sendo que, as tendências mais recentes de consumo incluem a preferência por produtos de alta qualidade e que não tenham sido submetidos a processamentos intensos. Importantes implicações microbiológicas derivaram dessa tendência, uma vez que a maioria das alterações realizadas, como por exemplo, produção de alimentos livres de aditivos, com baixos teores de sais e submetidos a tratamentos térmicos mais brandos, comprometem suas condições de preservação, acarretando na diminuição da vida útil satisfatória e de segurança alimentar. É importante que esta perda potencial de preservação e segurança seja, de alguma maneira, compensada e restabelecida e, neste ponto, os agentes antimicrobianos naturais podem desempenhar seu papel (NASCIMENTO, 2008).

3.2 Bacteriocinas de bactérias lácticas

As bactérias lácticas constituem um grupo filogeneticamente diverso, são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, cocos ou bacilos que apresentam como função comum a produção de ácido láctico por meio da fermentação de carboidratos. Essas bactérias ocupam muitos nichos ecológicos como certos alimentos, boca, trato gastrointestinal e urogenital de humanos e animais (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993).

As bactérias lácticas são responsáveis pelo desenvolvimento das características organolépticas, bem como pela preservação de uma ampla variedade de produtos fermentados. Dentre os usos industriais das bactérias lácticas, incluem-se a produção de ácido láctico (usado como aditivo), de dextrana e de silagem. Também são utilizadas como probióticos, ou seja, adjuntos da dieta e terapêuticos, para humanos e animais (NASCIMENTO, 2008).

Esse grupo de bactérias é conhecido como antagonista de outros microrganismos de origem alimentar por meio de vários mecanismos, incluindo-se a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (AGUIRRE; COLLINS, 1993). Dentre essas substâncias antimicrobianas, as bacteriocinas são de grande interesse para utilização como conservadores naturais de alimentos (HERNANDEZ et al., 1993; REQUENA; PELAEZ, 1995). Além da natureza protéica, que possibilita a sua inativação pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, as bacteriocinas não apresentaram toxicidade em experimentos com animais. Atualmente, a produção de bacteriocinas foi descrita para todos os gêneros de bactérias lácticas (KLAENHAMMER, 1988; SCHILLINGER apud BILLS; KUNG 1990; De VUYST; VANDAMME, 1994), incluindo-se as bifidobactérias (MEGHRIUS et al., 1991).

3.2.1 Classes de bacteriocinas

As bacteriocinas são diversas em termos de estrutura, modo de ação, espectro de atividade antimicrobiana e potencial, no entanto, possuem características comuns que possibilitam sua classificação. Todas as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas e caracterizadas foram incluídas em três classes de acordo com suas

propriedades bioquímicas e genéticas (NES et al., 1996; MOLL et al., 1999; DRIDER et al., 2006).

A **classe I** é constituída pelos pequenos peptídeos (<5 kDa) termoestáveis denominados lantibióticos, que constitui a única família de peptídeos dos quais os precursores são ribossomicamente sintetizados seguido por extensiva modificação pós-translacional (KLEEREBEZEM, 2004). A nisina, principal representante deste grupo, possui amplo espectro de ação antagonística contra microrganismos Gram-positivos, incluindo patógenos de importância para segurança dos alimentos, tais como *L. monocytogenes*, *S. aureus* e células vegetativas de *Bacillus* spp., e *Clostridium* spp. (BENKERROUM et al., 2002; RILLA et al., 2004). Ela é produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.). As bacteriocinas, também têm mostrado uma função de peptídeo ferormônio que desempenha um papel essencial como molécula sinalizadora na indução da expressão de sua própria biossíntese, mediante a detecção de uma concentração limiar mínima estimulatória. Este sistema denominado *quorum-sensing* também tem sido implicado no desenvolvimento da bactéria, bem como na secreção de fatores de virulência, formação de biofilmes, produção de biolumenescência, conjugação, esporulação e motilidade (KLEEREBEZEM, 2004).

O modo de ação da nisina foi bastante estudado, e alguns mecanismos para sua atividade antimicrobiana foram propostos. Os lantibióticos que a compõem (A e B) interferem na síntese de peptideoglicano por meio da ligação (alta afinidade) desta molécula com o lipídeo II, o qual tem a função de transportar subunidades de peptidoglicanos do citoplasma para a parede celular (ação bacteriostática). Os lantibióticos do tipo A também apresentam um mecanismo adicional de usar o lipídeo II como uma molécula carreadora para iniciar o processo de inserção e formação de poros na membrana celular. Os poros permitem a difusão de pequenos componentes citoplasmáticos (aminoácidos, ATP), resultando na dissipação da forca protônica (PMF) celular (potencial de membrana e gradiente iônico). A célula perde sua capacidade de sintetizar macromoléculas essenciais (DNA, RNA e proteínas) (ação bactericida). Em adição a inibição da biossíntese da parede celular e formação de poros, foi mostrado que a nisina foi capaz de induzir a autólise de células susceptíveis de estafilicocos por meio da liberação de enzimas da parede celular fortemente catiônicas por um processo

de troca de cátion, resultando em ativação da enzima e lise das células (MUROOKA et al., 2004; WARMINSKA-RADYKO et al., 2004).

A **classe II** é constituída por pequenos peptídeos (<10 kDa) termoestáveis e não modificado pós-translacionalmente. Estes apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular (QUADRI, 2002). São propostas três subdivisões para esta classe, de acordo com Drider et al. (2006). A **classe IIa** é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *L. monocytogenes.* Seus representantes possuem de 37 a 48 resíduos de aminoácidos, com uma porção N-terminal com configuração de folha pregueada e uma porção C-terminal contendo uma ou duas α-hélices (FIMLAND et al., 2005). As bacteriocinas desta classe se inserem na membrana celular do microrganismo alvo pela porção C-terminal, promovendo a formação de poros e conseqüente dissipação da força prótons motriz (KAISER; MONTVILLE, 1996). Na tentativa de manter ou restaurar a força prótons motriz, ocorre uma aceleração no consumo do ATP e, conseqüentemente, morte celular. A pediocina AcH composta por 44 resíduos de aminoácidos é a única bacteriocina da classe IIa sintetizada não apenas por diferentes espécies, como também por diferentes gêneros de bactérias lácticas, apresenta efeito antagônico sobre microrganismos deteriorantes e patogênicos, incluindo *L. monocytogenes, S. aureus* e *C. perfringens* (BHUNIA et al., 1987; LOESSNER et al., 2003). A **classe II**a é composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos. Seu mecanismo de ação também envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade muito baixa se forem empregados individualmente (GARNEAU et al., 2002). As bacteriocinas da **classe IIb** apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica (KAWAI et al., 2004). São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina 6.

A **classe III** é composta por grandes proteínas (>30 kDa) termolábeis, são bacteriocinas complexas quanto a sua atividade e estrutura protéica. Seu mecanismo de ação se diferencia das demais bacteriocinas, promovendo a autólise da parede celular do microrganismo alvo. Apresentam uma porção N-terminal homóloga a uma

endopeptidase, responsável pela autólise da parede celular, e uma porção C-terminal responsável pelo reconhecimento da célula alvo (LAI et al., 2002).

3.3 Espectro de atividade antimicrobiana

Uma grande vantagem da utilização de bacteriocinas como agentes de conservação de alimentos relaciona-se com a garantia da segurança microbiológica aos consumidores. As linhagens produtoras e seus metabólitos, incluindo-se as bacteriocinas, têm sido consumidas nos alimentos fermentados há milhares de anos sem serem causadoras de efeitos nocivos à saúde, sendo que estas são consideradas bactérias com grau de segurança alimentar. Estudos realizados com nisina e pediocina AcH mostraram que essas substâncias não são tóxicas a animais de laboratório e a culturas de células mamárias (RAY, 1993).

As bacteriocinas apresentam características inerentes a sua ação antimicrobiana Estes compostos possuem estreita faixa de ação contra hospedeiros, em geral limitada apenas às bactérias Gram-positivas. Observou-se que mesmo as bacteriocinas que apresentam uma faixa mais ampla de ação, não são eficazes contra todas as linhagens de bactérias Gram-positivas patogênicas e deteriorantes. Além disso, uma linhagem sensível possuí células variantes na população, que podem apresentar resistência a bacteriocina podendo, portanto, se multiplicar em sua presença. Dessa forma, sua ineficácia contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas resistentes, bolores e leveduras, os quais podem constituir-se em microrganismos relacionados às doenças de origem alimentar, tem limitado o uso das bacteriocinas já conhecidas (CINTAS et al., 2001). Seu espectro antibacteriano freqüentemente inclui microrganismos deteriorantes e agentes patogênicos de origem alimentar, como a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (NASCIMENTO, 2008).

3.4 Biossíntese e produção

A biossíntese de bacteriocinas ocorre principalmente na fase logarítmica, podendo, porém, atingir sua produção máxima em diferentes fases de crescimento

(TAGG et al., 1976). Estes compostos podem ser produzidos extracelularmente ou permanecerem associados às células (HURST apud SKINNER, 1978). A nisina é produzida durante todas as fases de crescimento microbiano (BUCHMAN et al., 1988). As condições de cultivo podem influenciar sua produção. Algumas espécies Gram-positivas produzem bacteriocinas apenas em meios sólidos. Alguns estreptococos apresentam aumento da produção destes compostos à medida que se aumenta a viscosidade de um meio líquido. Determinados componentes do meio podem ser necessários para a produção de bacteriocinas, tais como: suplementação de proteínas, íons metálicos e açúcares. A temperatura, pH, fase de crescimento, potencial de óxido-redução também podem afetar a produção de bacteriocinas (LEAL-SÁNCHEZ et al., 2002).

3.5 Purificação de bacteriocinas

Por se tratarem de compostos antimicrobianos protéicos por vezes secretados no meio de cultura, para que sejam purificadas, as bacteriocinas devem estar disponíveis em concentrações suficientes nos sobrenadantes livres de células. Independente do procedimento de purificação utilizado, os rendimentos de bacteriocina apresentam redução à medida em que esta é purificada. Portanto, recomenda-se que a produção destes compostos seja otimizada por meio de um ajuste das condições experimentais, considerando-se os fatores de importância, como composição do meio de cultura, temperatura, tempo, pH final, aeração, agitação, concentração do L culo, dentre outros. De acordo com Cintas et al. (2001), algumas bacteriocinas que se apresentam na forma de complexos macromoleculares podem ser desagregadas por meio de agentes dissociantes, tais como uréia, SDS, ultrafiltração, ou pela eliminação do material lipídico por extrações com metanol-clorofórmio ou etanol-dietil-éter. Ao serem recuperadas dos sobrenadantes livres de células, as bacteriocinas podem ser concentradas por técnicas que permitem a separação das frações, de acordo com seu tamanho e natureza físico-química. As técnicas mais utilizadas neste caso incluem: filtração por diálise ou ultrafiltração; precipitação da proteína com sais, como sulfato de

amônio ou ácidos; extração das proteínas com solventes orgânicos, como butanol ou etanol.

3.6 Fatores que afetam a produção de bacteriocinas

Para que as bacteriocinas possam ser aplicadas em alimentos, seu potencial deve ser previsto por meio de avaliação de suas propriedades. Dentre essas propriedades destacam-se estabilidade à temperatura, pH e espectro de ação. Dessa forma, visando obter bacteriocinas úteis para a comercialização, se faz necessária a avaliação das bacteriocinas frente aos principais fatores que serão encontrados nos alimentos, bem como os fatores que proporcionarão uma produção otimizada de bacteriocina (VAUGHAN et al., 1994; NAVARRO et al., 2000).

As condições de cultivo podem influenciar a produção de bacteriocinas Algumas espécies Gram-positivas produzem bacteriocinas apenas em meios sólidos. Alguns estreptococos apresentam aumento da produção destes compostos à medida que se aumenta a viscosidade de um meio líquido. Determinados componentes do meio podem ser necessários para a produção de bacteriocinas, tais como: suplementação de proteínas, íons metálicos e açúcares. A temperatura, pH, fase de crescimento, potencial redox também podem afetar a produção de bacteriocinas(LEAL-SÁNCHEZ et al., 2002).

No alimento, a eficiência das bacteriocinas poderá ser afetada pela ligação das bacteriocinas aos componentes do alimento; inativação das bacteriocinas por proteases. Outros fatores além de afetar a eficiência das bacteriocinas, ainda podem influenciar na difusão das bacteriocinas em alimentos tais como concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, fase aquosa disponível para difusão, conteúdo lipídico e superfície lipídica disponível para solubilização (VAUGHAN et al., 1994; NAVARRO et al., 2000).

De acordo com Kouakou et al. (2009), devem ser considerados diversos fatores na seleção de culturas *starters* produtoras de bacteriocinas aplicadas na fermentação de produtos cárneos, tais como a capacidade da linhagem em produzir bacteriocina *in situ*, difusão da bacteriocina na carne e sua interação com os componentes no alimento (proteínas e gordura), influência de ingredientes adicionados aos produtos cárneos,

como o Cloreto de Sódio e Nitrito. Estes ingredientes são necessários para conferir características únicas de sabor, aroma e coloração aos produtos cárneos, principalmente os embutidos e curados (CANHOS; DIAS, 1985).

3.6.1 Cloreto de sódio

O Cloreto de Sódio (NaCl) é o principal agente de conservação em produtos salgados, e de grande importância em produtos curados. Atua como conservante pela diminuição da atividade de água do produto, desidratação das bactérias e ação tóxica do íon cloro. É também agente flavorizante (valores iniciais de 2,5% a 3%), contribuindo para o sabor típico do produto curado (TYÖPPÖNEN AL et al., 2003). O sal é adicionado normalmente aos embutidos cárneos nas concentrações de 2,5 a 3,0% (VARNAM; SUTHERLAND, 1998)

Segundo Leroy e De Vuyst (1999), o NaCl em determinadas concentrações pode reduzir o crescimento de culturas lácticas e conseqüentemente a produção de bacteriocinas, e também proteger os microrganismos alvos, como as bactérias patogênicas, da ação de bacteriocinas (HUGAS et al., 2002).

3.6.2 Nitrito

O Nitrito de Sódio é o agente de cura, utilizado em produtos curados, sendo assim, um ingrediente obrigatório no processo de cura de produtos cáneos (DE MACEDO et al., 2005). Sua adição à matéria-prima objetiva a formação de coloração avermelhada (mediante cadeia de reações com a mioglobina), a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (principalmente *C. botulinum*), a proteção contra oxidação lipídica e a formação de sabor e aroma típicos no produto (LEROY; DE VUYST, 1999; DE MACEDO et al., 2005).

Para uma cultura de bactéria láctica poder ser aplicada no desenvolvimento de produtos cárneos curados com a finalidade de produzir bacteriocina, esta deve resistir às concentrações de nitrito adicionadas ao produto. Conforme a legislação brasileira

para o uso de aditivos em carnes e produtos cárneos, o uso de nitrito fica limitado a 300 mg/Kg (BRASIL, 1999).

3.7 Segurança alimentar, conservação e deterioração: aplicações em alimentos

Em geral, para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: a linhagem produtora deve ter *status* GRAS (Geralmente reconhecido como seguro); a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente especifica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL et al., 1995).

As bacteriocinas têm aplicação em diversos alimentos. Sua capacidade em inibir o desenvolvimento de microrganismos patógenos de origem alimentar varia de acordo com a linhagem, a bacteriocina produzida e o tipo de alimento (McMULLEN; STILES, 1996). Muriana (1996) relacionou diversas bacteriocinas que apresentam ação inibitória sobre *Listeria* sp., produzidas por bactérias lácticas isoladas de diversos alimentos e suas aplicações. Já foram descritas aplicações em leite e seus derivados, vegetais e frutas enlatadas, carne, pescado e bebidas alcoólicas (ECKNER, 1992). As bacteriocinas podem ser produzidas por bactérias constituintes da cultura *starter* durante a fermentação. Contudo, fatores intrínsecos do alimento, como pH, podem impossibilitar a produção ótima das bacteriocinas pelas culturas *starters* (YEZZI et al, 1993). Além disso, diferentes linhagens de microrganismos de uma mesma espécie podem produzir níveis diferentes da mesma bacteriocina (De VUYST, 1994). A eficácia das bacteriocinas também é dependente da quantidade desse composto, que é inativada pela interação com os componentes do alimento. Degnan et al. (1993) constataram que até 90% da atividade da pediocina aplicada a uma emulsão alimentar pode ser protegida por meio de processo de encapsulação lipossomal. As condições de processamento do alimento também podem influir na ação das bacteriocinas. Foi demonstrado que o pH pode influir na solubilidade da nisina o que, por sua vez, irá contribuir para sua maior ou menor eficiência (LIU; HANSEN, 1990).

Dentre todas as bacteriocinas, a mais conhecida e estudada há mais de 50 anos é a nisina, produzida por inúmeras linhagens de *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Considerada uma substância segura e não tóxica, sua DL_{50} é similar a do cloreto de sódio, 3.330.000UI/Kg (FRAZER et al., 1962). Possui a condição de GRAS atribuída em 1988 pela "Food and Drug Administration". Esta bacteriocina tem sido empregada, em larga escala na indústria de alimentos de vários países, como agente antibotulínico em queijos e ovo líquido, além de molhos e alimentos enlatados (DELVES-BROUGTHON, 1990). Ademais, apresenta amplo espectro antimicrobiano com ação sobre microrganismos patogênicos, dentre os quais, *L. monocytogenes*, *S. aureus, B. cereus*, além de diferentes espécies de bactérias lácticas (BENKERROUM et al., 2002; CONVENTRY et al., 1997; MILLETTE et al., 2004; RILLA et al., 2004).

O uso de bacteriocinas em carnes e derivados pode ser dividido em várias subcategorias. É comum serem encontradas bactérias lácticas constituintes da microbiota natural desses alimentos. Assim, a inoculação de carne fresca com linhagens produtoras de bacteriocinas pode prevenir ou impedir a deterioração ou o crescimento de bactérias patogênicas, como *L. monocytogenes*. Chung et al. (1989) demonstraram que a nisina possui um efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Lactococcus lactis spp*. presentes na superfície da carne, sendo que o mesmo efeito não foi verificado sobre bactérias Gram-negativas, como *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. McMullen e Stiles (1996) destacaram a possibilidade de se utilizar bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas para controlar a microbiota contaminante de carnes frescas e processadas embaladas com atmosfera modificada, o que se constituiria numa barreira adicional para extensão da vida útil desses produtos. Existe um potencial para o uso de culturas *starters* produtoras de bacteriocinas em produtos cárneos secos ou semi-secos, nos quais pediococos, lactobacilos e outras bactérias lácticas são utilizados. Essas culturas alteram beneficamente as qualidades organolépticas características dos produtos, como cor, aroma, textura e vida útil.

São apontadas algumas deficiências quanto ao uso de bacteriocinas em carnes (ECKNER, 1992). A principal diz respeito a sua limitada eficácia, uma vez que a maioria das bacteriocinas é apenas efetiva contra espécies Gram-positivas.

Conseqüentemente, várias bactérias deteriorantes e patogênicas Gram-negativas não são afetadas. Outra questão é que a carne, por se tratar de um alimento sólido, pode restringir a difusão das bacteriocinas no produto, o que torna sua ação limitada a determinadas áreas do alimento. Finalmente, existe a possibilidade de que as proteases produzidas pelas culturas *starters* ou nativas da carne possam inativar a proteína antimicrobiana. Assim, a obtenção de bacteriocinas mais eficazes, que solucionem as dificuldades de ação dos compostos já estudados, pode resultar em progressos significativos para a produção de alimentos mais seguros.

3.8 Propriedades probióticas

Com respeito às propriedades probióticas, diversos gêneros e espécies de microrganismos têm apresentado os requerimentos necessários para uso como culturas probióticas. Destacam-se as bactérias lácticas, sobretudo *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Pediococcus* sp., além de *Bifidobacterium* sp. e leveduras como *Saccharomyces* sp. Os probióticos constituem microrganismos viáveis utilizados como suplementos dietéticos, que ao serem ingeridos em quantidades adequadas apresentam potencial para melhorar a saúde ou nutrição do hospedeiro. “Pro-biótico”, termo que significa “para vida”, indica a propriedade mais essencial das culturas probióticas. Com uma freqüência cada vez maior, os probióticos têm sido incorporados em alimentos como adjuntos dietéticos, de modo a colaborar, sobretudo, com a manutenção de um saudável balanço intestinal, com influência positiva à saúde humana ou animal. No caso dos animais criados para o consumo humano, um maior aumento de peso para a mesma quantidade de alimento consumida, faz com que a aplicação de probióticos seja de grande relevância, uma vez que estes microrganismos favorecem a absorção de nutrientes (SANDERS, 1999).

Diversos efeitos favoráveis à saúde são associados ao uso de probióticos. Tendo como base evidências científicas, para que sejam conferidos os benefícios à saúde, o processador de alimentos deve especificar a dose mínima recomendada na dieta e duração de uso para cada linhagem de microrganismo ou tipo de produto. Algumas das diversas alegações de saúde já comprovadas ou potenciais, relacionadas

ao consumo de culturas probióticas incluem: melhora da função intestinal por meio da aderência e colonização a este tecido; proteção contra doenças infecciosas e não-infecciosas; modulação do sistema imune; alívio à intolerância à lactose; melhora da digestão e absorção de nutrientes; regulação da mobilidade intestinal (constipação); redução do risco de alergias e doenças do trato urinário; efeito redutor dos níveis de colesterol e anti-hipertensivo; atividades anticancerígenas e antimutagênica; aumento da disponibilidade de vitaminas ao hospedeiro. Deve-se considerar que cada linhagem probiótica apresentará apenas alguns dos benefícios à saúde, sendo que até o presente não foram identificados microrganismos que apresentem todas essas vantagens. Além do mais, quando uma linhagem probiótica apresenta um determinado benefício, não se pode assumir que outra linhagem, mesmo quando da mesma espécie, apresentará propriedades similares (MERCENIER et al., 2002; O´SULLIVAN et al., 2005).

Um dos principais requisitos para uma linhagem ser considerada probiótica é a ausência de traços de patogenicidade (FAO/WHO, 2001). Normalmente, as células viáveis e os metabólitos de bactérias lácticas têm sido consumidos, há muito tempo, em alimentos fermentados sem ocasionarem problemas à saúde humana. Até o momento, a segurança das linhagens integrantes desse importante grupo ainda não foi questionada e nem foram descritas propriedades de patogenicidade e de virulência (AGUIRRE; COLLINS, 1993). O relato do isolamento de determinadas linhagens de *Lactobacillus* spp. de pacientes com bacteremia pode ser, provavelmente, o resultado de uma interação oportunista desses microrganismos no processo de infecção (SALMINEM et al., 2006).

Uma cultura probiótica considerada bem sucedida tem que preencher alguns requisitos. Estes vão proporcionar uma melhora na funcionalidade do organismo após seu consumo e irão intensificar sua sobrevivência no produto. Os principais critérios, segundo os quais um microrganismo pode ser considerado um probiótico, são os seguintes: (i) comprovação clínica dos efeitos benéficos da linhagem com potencial probiótico, (ii) segurança ao consumidor: as linhagens probióticas, seus produtos de fermentação ou componentes celulares liberados após sua morte, não podem produzir infecções ou reações tóxicas, alergênicas, mutagênicas ou carcinogênicas, (iii)

sobrevivência ao suco gástrico, tolerância a altas concentrações de sais biliares e resistência a lisozima, (iv) capacidade, ao menos temporária, de colonização do trato intestinal, (v) produção de agentes antimicrobianos, como bacteriocinas, ácidos, peróxido de hidrogênio, etc..., (vi) resistência aos antibióticos normalmente presentes em alimentos, porém não por meio de plasmídios que codificam a resistência a estes antibióticos, (vii) adequação tecnológica: não ocasionar alterações negativas nas propriedades organolépticas dos alimentos; rápida ativação, além de crescimento e recuperação adequados; resistência ao congelamento, desidratação, condições de armazenamento e distribuição; viabilidade em altas concentrações; estabilidade das propriedades desejáveis durante os estágios de processamento; estabilidade genética (FAO/WHO, 2002; GRAJEK et al., 2004).

Para resistir às condições do trato gastrintestinal as culturas probióticas devem apresentar tolerância à bile e capacidade de hidrólise de sais biliares, além de resistir às condições ácidas do estômago. A bile, secretada no fígado e lançada no intestino delgado, reduz a sobrevivência das bactérias por destruir sua membrana celular, cujos principais componentes são os lipídeos e ácidos graxos. Bactérias probióticas variam consideravelmente em seus níveis de tolerância a bile. A resistência aos sais biliares varia muito entre as espécies de *Lactobacillus* e entre as linhagens individuais, o que torna difícil definir a concentração máxima a que um microrganismo deva suportar para ser considerado resistente à bile. Vale ressaltar que a concentração desta substância no intestino não é estática, ela varia em função do tempo e em diferentes partes do trato intestinal Além disso, a linhagem probiótica deve sobreviver ao baixo valor de pH do suco gástrico que geralmente varia de 2,0 e 3,5, tolerar altas concentrações de sais biliares e ser resistente a atividade da lisozima, para chegar viva e ativa ao seu sítio de ação e colonizá-lo temporalmente (FAO/WHO, 2002),

Uma vez que as propriedades probióticas de uma bactéria são amplamente dependentes de sua capacidade em permanecer viável e colonizar a superfície das células intestinais, um número suficiente de células viáveis deveria estar presente no momento do consumo. Neste sentido, existe a sugestão de que contagens de 10^7 a 10^9 de células viáveis a serem ingeridas por dia são necessárias para produzir os efeitos benéficos ao consumidor. Desta forma, devido à necessidade da ingestão diária de

culturas probióticas na dieta, é solicitado da indústria de alimentos o desenvolvimento de uma ampla gama de alimentos fermentados com tais propriedades. Atualmente, dentre os diversos alimentos funcionais disponíveis no mercado, os probióticos têm papel de destaque, em especial em produtos lácteos, porém novos produtos funcionais contendo microrganismos probióticos devem ser incluídos em fórmulas infantis, sucos de frutas fermentados, produtos contendo soja e outros cereais e, porque não, em produtos cárneos fermentados. Evidências demonstram que pode ser possível desenvolver culturas *starters* que apresentem propriedades probióticas específicas e que consigam atender aos requerimentos tecnológicos e sensoriais dos produtos cárneos (HUGAS; MONFORT, 1997).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias lácticas, bactérias sensíveis e suas origens

As linhagens de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas usadas neste estudo foram previamente isoladas de produtos cárneos *in natura* (BROMBERG et al., 2004) e estão apresentadas na Tabela 1. Estas culturas foram mantidas inoculadas em caldo MRS (DIFCO™, Detroit, EUA) suplementado com 15% de glicerol (Synth., Brasil) (v/v), a -20ºC (para uso rotineiro) e a -80ºC (manutenção por tempo prolongado). Antes dos experimentos, estas linhagens foram ativadas, neste mesmo meio e em condições (tempo/temperatura) de 37°C/24h. Culturas ativas são definidas como células em atividade máxima, obtidas pela transferência de 1 a 2% de inóculo em meios de cultivos adequados, por 3 vezes consecutivas.

Tabela 1 - Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e suas origens

Linhagem	Origem	Condições de cultivo
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CTC 204[1]	Moela de frango	MRS/37ºC/24h
Lactobacillus plantarum CTC 368[1]	Lingüiça de javali	MRS/37ºC/24h
Enterococcus avium CTC 469[1]	CMS[2]	MRS/37ºC/24h
Enterococcus avium CTC 483[1]	Fígado de frango	MRS/37ºC/24h
Lactococcus lactis subsp. hordinae CTC 484[1]	Fígado de frango	MRS/37ºC/24h

[1]Linhagens isoladas por Bromberg et al (2004); [2]CMS: Carne mecanicamente separada de frango.

Os demais microrganismos usados, como culturas sensíveis, em diversas etapas deste estudo, suas origens e seus meios e condições de cultivos são apresentados na Tabela 2. Antes dos experimentos, estas linhagens foram ativadas, nos meios e condições adequadas às espécies.

Tabela 2 - Outros microrganismos utilizados, meios e condições de cultivos

Microrganismos	**Meios e condições de cultivo**
Bacillus cereus ATCC[a] 14579	TSB/48h/30ºC
Bacillus cereus CTC[b] 011	TSB/48h/30ºC
Clostridium perfringes CTC 042	TSB/48h/30ºC
Clostridium sulfito redutos 005	
Enterococcus faecalis ATCC 19433	TSB/48h/30ºC
Eschericia coli ATCC 25422	TSB/24 h/37ºC
Salmonella typhymurium ATCC 14028	TSB/24 h/37ºC
Lactococcus lactis subsp. *hordniae* CTC[b] 484	MRS/24 h/37ºC
Lactococcus lactis subsp. lactis CE 016	MRS/24 h/37ºC
Lactobacillus helveticus ATCC[a] 15009	MRS/24 h/37ºC
Lactobacillus helveticus Wiesby	MRS/24 h/37ºC
Lactobacillus plantarum ITLAL-TL 434	MRS/24 h/37ºC
Leuconostoc mesenteroides ATCC 10830	MRS/24 h/37ºC
Listeria innocua Lin 11 (INRA[d])	TSB/24 h/37ºC
Listeria innocua CCQA	TSB+EL/24 h/37ºC
Listeria monocytogenes ATCC 7644	TSB/24 h/37ºC
Listeria monocytogenes SA(ESALQ[f])	TSB+EL/24 h/37ºC
Listeria monocytogenes CF(ESALQ[f])	TSB+EL/24 h/37ºC
Listeria monocytogenes AL(ESALQ[f])	TSB+EL/24 h/37ºC
Micrococcus luteus ATCC 4698	TSB/24 h/37ºC
Staphylococcus aureus CTC[b] 033	TSB/24 h/37ºC
Staphylococcus aureus UNICAMP[e] S6	TSB/24 h/37ºC
Staphylococcus aureus ATCC[a] 12600	TSB/24 h/37ºC
Staphylococcus aureus IAL 1602	TSB/24 h/37ºC
Streptococcus mutans ATCC 25175	TSB/24 h/37ºC
Streptococcus epidermidis ATCC 149905	TSB/24 h/37ºC
Streptococcus salivarius ssp. TR[c] 570	MRS/24 h/37ºC
Pseudomonas aeruginosa CTC 032	TSB/24 h/37ºC
Weisella viridescens CTC0849	MRS/24 h/37ºC

[a]ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; [b]CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [c]TR – Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínios, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [d] INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France; [e] UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. [f] ESALQ – Escola superior de agricultura "Luiz de Queiros", Piracicaba, SP, Brasil.

4.2 Determinantes de patogenicidade e propriedades probióticas

4.2.1 Atividade de termonuclease

O Ágar azul de toluidina DNA foi depositado em placas de Petri conforme descrito por Silva et al. (1997). Após a solidificação e secagem do ágar, este foi perfurado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* esterilizada. Cada poço foi inoculado com 50μL das linhagens ativas em caldo BHI, previamente tratadas com água fervente por 15 minutos. *Staphylococcus aureus* S6 e *S. aureus* ATCC 12600 foram utilizados como controle positivo e *S. epidermidis* ATCC 14990 como controle negativo. Após incubação a 50°C por 2 horas, os meios foram analisados quanto à presença de zonas de coloração rosa ao redor dos poços, indicativas de atividade de termonuclease.

4.2.2 Atividade de citolisinas

A produção de citolisinas hemolíticas foi detectada sobre ágar BHI suplementado com 5% de hemácias de carneiro desfibrinadas. O meio foi inoculado por esgotamento de 100μL das linhagens ativas, seguido de secagem dos inóculos e incubação aeróbica a 37°C por 48 horas (HARRIGAN, 1998). A presença de citolisina foi indicada pela formação de zonas claras de hemólise ao redor das colônias crescidas ou abaixo das colônias (α-hemólise: parcial e β-hemólise: total). *S. aureus* CTC 033 e *Lc. lactis* ssp. *lactis* CE 016 foram avaliadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

4.2.3 Atividade de gelatinases

As linhagens foram inoculadas em tubos contendo ágar gelatina (30 g/L) e incubadas a 21°C por 7 dias (HARRIGAN, 1998). A presença de gelatinase foi indicada pela visualização da liquefação do meio. Como controle positivo foi utilizado uma linhagem produtora de gelatinase *B. cereus* CTC 011 e, como controle negativo, meio de cultivo não inoculado.

4.2.4 Tolerância a baixos valores de pH

A tolerância à acidez foi determinada pela verificação da manutenção da viabilidade das linhagens após um tempo de exposição em soluções com diferentes valores de pH (MISHRA; PRASAD, 2005). As soluções foram preparadas, em volume de 100 mL, ajustando-se o ácido clorídrico (HCl) com água bidestilada a pH 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, e o controle a pH 5,0. Estas soluções foram esterilizadas a 121ºC por 20 minutos, seguido de estocagem a temperatura ambiente. Antes da utilização, cada solução foi fortemente misturada, seguido de distribuição, em alíquotas de 10 mL, em tubos estéreis. Em seguida, uma suspensão ativa contendo cerca de 10^{10} UFC mL^{-1} da bactéria láctica produtora de bacteriocina foi adicionada e misturada às soluções de diferentes valores de pH. Amostras de 1,0mL foram retiradas imediatamente (0 hora) e após 1, 2 e 3 horas de incubação para a determinação da viabilidade celular. Esta foi determinada pelo método de inoculação das diluições preparadas em 9,0mL de solução salina 0,85% em profundidade de Ágar MRS. A incubação foi realizada a 37°C por 16-18 horas.

4.2.5 Resistência a sais biliares

A tolerância a bile das linhagens produtoras de bacteriocinas foi determinada pela verificação da viabilidade destas após um tempo de exposição aos sais biliares, de acordo com Mishra e Prasad (2005). Foram preparadas soluções de sais biliares (Ox-bile, Oxoid) a concentração final de 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/v) com água bidestilada. As soluções foram esterilizadas a 121ºC por 20 minutos e mantidas sob refrigeração até seu uso. Alíquotas de 1 0mL de cada solução foram transferidas para tubos estéreis. Suspensão de células das linhagens produtoras de bacteriocinas, de aproximadamente 10^{10} UFC mL^{-1}, foi adicionada a cada solução, seguido de incubação aeróbica a 37°C. Amostras de 1,0mL foram retiradas imediatamente (0 hora) e após 3 e 12 horas de incubação para a determinação da viabilidade celular. Esta foi determinada pelo método de inoculação das diluições preparadas em 9,0 mL de salina

0,85% em profundidade de Ágar MRS. A incubação foi realizada a 37°C por 16-18 horas.

4.3 Espectro de atividade e modo de ação

4.3.1 Método de diluição crítica

O método utilizado foi descrito por Mayr-Harting et al. (1972). As amostras foram centrifugadas a 7.500g, 10 minutos, 4°C. O pH dos sobrenadantes resultantes foi neutralizado a 6,5 com solução de NaOH 5N, seguido de tratamento a 95ºC por 5 minutos. Estes sobrenadantes foram sucessivamente diluídos (1:2; v/v) com solução-tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,0 em placas de microtitulação. Alíquotas de 10μL destas diluições foram inoculadas no ágar MRS semi-sólido (0,75% Ágar) inoculado com 1% das linhagens indicadoras ativas a 37°C por 18 horas (10^8 UFC/mL), este meio foi previamente depositado em Ágar MRS (29mL) contido em placas de Petri estéreis. Após 24 e 48 horas de incubação, em condições adequadas às espécies, os meios foram analisados quanto à formação de halos de inibição. O título da bacteriocina foi expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL), sendo este definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição, multiplicada por 100, para a obtenção da preparação original.

4.3.2 Método de antagonismo simultâneo

O método de antagonismo simultâneo em poços descrito por Tagg e Mcgiven (1971) e modificado por Benkerroum et al. (1993) foi usado para avaliar a atividade antimicrobiana das linhagens BAL. As linhagens sensíveis ativas a 37°C por 18 horas (10^8 UFC/mL) foram inoculadas (2%) em 20mL de ágar MRS acrescentado de 2% de β-glicerofosfato de sódio. Estes meios foram vertidos sobre placas de Petri estéreis, obtendo-se uma camada de 5mm de altura, seguido de solidificação e secagem do ágar. Poços de 4mm de diâmetro foram perfurados no ágar com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada. Cada poço foi inoculado com 50μL da cultura produtora de

bacteriocina ativa a 37°C por 18 horas. Após secagem dos inóculos, com placas abertas em câmara de fluxo horizontal, estas foram incubadas em temperaturas adequadas às espécies durante 24 horas. A formação de halos de inibição ao redor dos poços inoculados foi indicativa da atividade de bacteriocinas.

4.3.3 Modo de ação

Com a finalidade de investigar a ação bacteriostática ou bactericida, a linhagem indicadora *S. aureus* foi inoculada a 2% em 100 mL de caldo LAPTG. A incubação foi realizada a 37ºC por 9 horas. Após 4 horas de incubação foram adicionados 2mL dos sobrenadantes das culturas produtoras de bacteriocinas. O crescimento celular foi determinado a intervalos de 2 horas durante o período de incubação. Foram determinados a biomassa celular, que foi medida pela densidade óptica a 650nm (DO650nm) em espectrofotômetro Micronal, e a contagem de células viáveis, por meio do plaqueamento em MRS ágar, e expressas como número logarítmico da unidade formadora de colônia obtida por mililitro da amostra (Log $UFCmL^{-1}$). Linhagens apresentando valores de DO $\geq$ 0,4 foram diluídas com o mesmo meio, que foi reservado para tal finalidade. As linhagens selecionadas, *L. lactis* subsp. *cremoris* (CTC 204) e *L. lactis subsp.* hordinae (CTC 484) foram cultivadas em caldo MRS a 37°C por 18 horas. Estas foram inoculadas a 2% em caldo APT para CTC 204 e caldo MRS para CTC 484. Após 7 e 8 horas de incubação a 37ºC para CTC 204 e CTC 484, respectivamente, foram centrifugadas a 7.500g por 10 minutos a 4°C. Os valores de pH dos sobrenadantes obtidos foram ajustados à 6,5-7,0 com solução de NaOH 5N. Estes sobrenadantes foram adicionados na proporção de 2 mL em 100 mL de cultivo de *S. aureus* após 4 horas de incubação em caldo LAPTG a 37ºC.

4.4 Características de crescimento e produção de bacteriocinas

4.4.1 Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultivos

Os meios foram APT, MRS, TSB e o Rogosa SL foram suplementados com 2% (p/v) de ß-glicerofosfato de sódio (meio tamponado) e esterilizados a 121ºC por 15 minutos. Porções de 200mL do meio de cultivo foram inoculados com as cultura ativas (1%, v/v), seguido de incubação a 37ºC por 24 horas, em condições aeróbicas. As amostras para análise foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e em intervalos regulares de 2 horas até 12 horas, e após 24 horas de incubação. O crescimento celular foi determinado por meio da diluição decimal seriada das amostras em água peptonada 0,1% (m/v), seguido de inoculação pela técnica de profundidade em Ágar MRS e incubação a 37°±2ºC por 72 horas, em jarras de anaerobiose. As contagens foram expressas em número logarítmico das unidades formadoras de colônia por mL do produto (Log UFC g^{-1}). A densidade óptica a 650nm (DO_{650nm}) foi medida em espectrofotômetro Micronal. Para esta análise, as amostras apresentando valores de DO $\geq$ 0,4 foram diluídas com o mesmo meio, que foi reservado para tal finalidade. A produção de ácido láctico foi determinada como a medida do pH, que foi obtida em um potenciômetro Micronal. A atividade das bacteriocinas livres nos sobrenadantes e adsorvidas à biomassa celular, que foram obtidos após centrifugação das amostras a 7.500g, 4°C, 15 minutos, foi determinada pelo método de diluição crítica de Mayer-Harting et al. (1972). As linhagens utilizadas como indicadoras da atividade foram: *B. cereus* CTC 011, *L. helveticus* ATCC15009, *L. innocua* Lin 11, *S. aureus* ATCC 12600 e *S. salivarius* ssp. TR 570. A atividade foi expressa como a média da unidade arbitrária por mililitro (UAmL-1) apresentada pelas 5 linhagens indicadoras utilizadas.

4.4.2 Extração das bacteriocinas aderidas às células produtoras

A extração das bacteriocinas adsorvidas às células produtoras foi realizada de acordo com o método de Yang et al. (1992). As biomassas celulares foram ressuspendidas em solução de NaCL 100mM pH 2,0 (ajustado com ácido fosfórico a

5%) e mantidos nesta condição por 1 hora a 4°C, sob agitação (em agitador magnético), para extração das proteínas adsorvidas às células. Os sobrenadantes resultantes (S2) da centrifugação a 7.500g, 4°C, 15 minutos foram misturados aos sobrenadantes S1, seguido de ajuste do pH a 6,5 com soluções de NaOH de 5N e 1N.

4.4.3 Parâmetros de fermentação

A partir dos dados obtidos foram calculados os seguintes parâmetros de fermentação: número de gerações (n), tempo de geração (g) e taxa específica de crescimento bacteriano (μ), utilizando-se as equações 1, 2 e 3 que estão apresentadas a seguir (PELCZAR et al., 2005).

$$n = (\ln Z - \ln Z_0) / \ln 2 \qquad (1)$$

$$g = \Delta t / n \qquad (2)$$

$$\mu = \ln 2 / g \qquad (3)$$

Onde: Z representa o crescimento final e Z_0 o crescimento inicial, que foram calculados por meio da análise de regressão linear do crescimento das linhagens em $UFC.mL^{-1}$ durante a fase exponencial. O Δt é o intervalo de tempo entre o inicio e fim do crescimento bacteriano

A atividade acidificante foi expressa como a diferença entre o valor de pH obtido em 0 e 12 horas de crescimento (ΔpH_{12h}).

O rendimento da produção de bacteriocina ou atividade especifica, que é o rendimento da bacteriocina por unidade de massa celular, foi calculado pela equação 4 apresentada a seguir (PARENTE;RICCIARDI, 1994):

$$B - B_0 = Y_{B/X} \cdot (X - X_0) \quad (4)$$

Onde:

B e B_0 são, respectivamente, a atividade final e inicial da bacteriocina (UA L^{-1}).

X e X_0 são, a concentração de biomassa celular final e inicial (g CMC L^{-1}).

$Y_{B/X}$ é o rendimento máximo da bacteriocina por unidade de biomassa produzida

O rendimento máximo de bacteriocina por unidade de biomassa produzida ($Y_{B/X}$) foi calculada pela substituição de $B - B_0$, pelo título máximo da bacteriocina observado durante o crescimento da bactéria, ou seja, utilizando $(B-B_0)_{max}$, e $X-X_0$ correspondente com a biomassa cuja atividade máxima de bacteriocina foi observada.

4.4.4 Efeito de fatores limitantes do crescimento: NaCl e nitrito

As linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* (CTC 204) e *L. lactis* subsp. *hordinae* (CTC 484) e diferentes concentrações dos ingredientes NaCl (1%, 2% e 3%) e nitrito de sódio (0,1%, 0,2% e 0,3%), que são utilizados na produção de embutidos cárneos, foram avaliados neste estudo. Os ingredientes foram adicionados em proporções determinadas aos meios APT, MRS e TSB tamponados com 2% de β-glicerolfosfato, que foram em seguida autoclavados a 121°C/15 minutos. Para o teste, os meios foram inoculados com 2% (v/v) das culturas ativas e a fermentação foi realizada a 37°C por 4 e 6 horas para as linhagens CTC 484 e CTC 204, respectivamente. As amostras para avaliação foram retiradas logo após a inoculação (0 h) e ao final da fermentação, de 4 ou 6 horas dependendo da linhagem, para determinação do aumento do número de células (D_{O650}nm e UFCmL^{-1}) e produção de ácido láctico (pH) e de bacteriocina (UAmL^{-1}). A linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como indicadora da atividade das bacteriocinas.

O aumento do número de células foi determinado pela contagem de células viáveis, após plaqueamento em profundidade das diluições apropriadas das amostras de Ágar MRS tamponado, e expressas como número logarítmico da unidade formadora de colônia obtida por mililitro da amostra (Log UFCmL^{-1}). A acidificação do meio foi

avaliada pela medida do pH que foi obtida em um potenciômetro Micronal A produção de bacteriocina foi avaliada pelo método de diluição crítica de Mayr-Harting (1972) e a atividade foi expressa como unidade arbitrária por mililitro ($UAmL^{-1}$).

O experimento foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey com nível de significância ($P<0,05$) pelo programa estatístico STATISTICA 5.0, Statsoft.

4.5 Purificação parcial das bacteriocinas

As linhagens produtoras de bacteriocinas foram ativadas e inoculadas (2%; v/v) em 900 mL de MRS tamponado suplementado com 2% de β-gicerofosfato de sódio), seguido de incubação a 37°C por 12 horas. Após esse período, os meios foram centrifugados a 7.500g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes resultantes foram reservados para ser misturados ao sobrenadante originado da extração de bacteriocinas das biomassas conforme o item 4.4.1. A precipitação com sulfato de amônio foi realizada em câmara fria, sob agitação por 12horas. O sulfato de amônio foi lentamente adicionado aos sobrenadantes até alcançar a faixa de concentração de saturação de 60-80%. A supensão foi centrifugada a 7.500g por 40 minutos a 4ºC. O precipitado e as películas formadas foram separadas dos sobrenadantes e ressuspendidos em 20 mL de Tampão Sørensen 25mM pH 6,0, e estocados a -18ºC. As bacteriocinas foram filtradas em membranas Amicom Ultra de 3 Kda (celulose regenerada, Millipore) a 4.000 g por 40 min. a 4°C. A concentração de proteína nas frações obtidas foi avaliada usando o "*Total Protein (Micro Lowry) Peterson's Modification*" (SIGMA®), desenvolvido com base no método de Lowry et al. (1951). Nesta determinação, a absorbância da mistura é medida a 725 nm e a determinação da concentração proteínas (µg/mL) é obtida a partir da comparação dos dados com uma curva padrão de soro de albumina bovina (SAB). A atividade das bacteriocinas em diferentes etapas da purificação foi determinada pelo método de diluição crítica de Mayr-Harting et al. (1972).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinantes de patogenicidade

5.1.1 Atividade de termonucleases, hemolisinas e gelatinase

As cinco linhagens produtoras de bacteriocinas não apresentaram atividade de termonuclease (Tabela 3 e Figura 1). Esses resultados também foram observados para a *S. epidermidis* ATCC 14990 (controle negativo). Por outro lado, *S. aureus* ATCC 12600 (controle positivo) e *S. aureus* UNICAMP S6 apresentaram halo róseo, indicativo de atividade desta enzima.

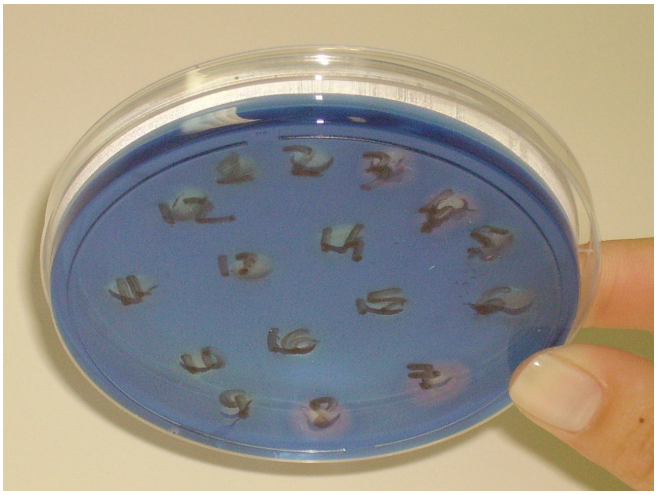


Figura 1 - Teste de verificação da atividade de termonucleases

Tabela 3 - Atividade de termonucleases

Linhagens	**Atividade**
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CTC 204	Negativa
Lactobacillus plantarum CTC 368	Negativa
Enterococcus faecium CTC 469	Negativa
Enterococcus avium CTC 483	Negativa
Lactococcus lactis subsp. *hordinae* CTC 484	Negativa
Staphylococcus aureus UNICAMP S6	Positiva
Staphylococcus aureus ATCC 12600 (Controle)	Positiva
Staphylococcus epidermidis ATCC 14990 (Controle)	Negativa

Com relação à atividade de hemolisinas, verificou-se que as cinco linhagens apresentaram resultados negativos (Tabela 4), conforme indicado pela ausência de anel de lise nas colônias inoculadas no ágar BHI suplementado com hemácias de carneiro. O mesmo resultado foi verificado para *L. lactis* subsp. lactis sp. CE 016 (controle negativo). Por outro lado, a linhagem *S. aureus* CTC 033 (controle positivo) apresentou anel de lise, indicativo da hemólise das hemácias.

Tabela 4 - Atividade de hemolisinas

Linhagens	**Atividade**
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CTC 204	Negativo
Lactobacillus plantarum CTC 368	Negativo
Enterococcus faecium CTC 469	Negativo
Enterococcus avium CTC 483	Negativo
Lactococcus. Lactis subsp. *hordinae* CTC 484	Negativo
Staphylococcus aureus CTC 033 (controle)	Positivo
Lactococcus lactis subsp. *lactis* CE 016 (controle)	Negativo

Quanto à atividade de gelatinases, as cinco linhagens avaliadas também apresentaram resultados negativos para esta enzima. Ao contrário, a *B. cereus* CTC 011, utilizada como controle positivo, apresentou intensa liquefação do Ágar Gelatina, indicativo da atividade de gelatinase.

Tabela 5 - Atividade de gelatinases

Linhagens	**Atividade**
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CTC 204	Negativo
Lactobacillus plantarum CTC 368	Negativo
Enterococcus faecium CTC 469	Negativo
Enterococcus avium CTC 483	Negativo
Lactococcus lactis subsp. *hordinae* CTC 484	Negativo
Bacillus cereus CTC 011	Positivo
Ágar gelatina	Negativo

Esses resultados demonstraram que as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas avaliadas neste estudo não possuem potencial de patogenicidade relacionada com a presença de termonucleases (capacidade de degradar o DNA), de β-hemolisinas (lise de hemácias) e de gelatinases (atividade sobre substratos, tais como cadeia β-insulina e materiais colágenos em tecidos).

Em outro estudo, *E. faecium* FAIR-E 198 produtor de bacteriocina também não apresentou atividade dessas enzimas, sendo, portanto, considerado sem potencial de patogenicidade, e sua utilização em tecnologia de alimentos foi recomendada (SARANTINOPOULOS et al., 2002). Destacou-se que a atividade da α-hemolisina é uma característica comum em algumas espécies, como por exemplo, *E. faecium*, e que a patogenicidade relaciona-se com a β-hemólise (EATON; GASSON, 2001; MUNDT, 1986).

5.2 Propriedades probióticas

5.2.1 Tolerância às condições de pH ácido

As Figuras 1, 2, 3, 4 e 5 mostram o efeito de diferentes valores de pH na viabilidade das linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, *L. plantarum* CTC 368, *E. avium* CTC 469, *E. avium* CTC 483 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, respectivamente. Observa-se que *L. plantarum* CTC 368 e *E. avium* CTC 469 (Figuras 2 e 3, respectivamente) apresentaram comportamento similar de sobrevivência às soluções pH 2,0, pH 3,0, pH 4,0 e pH 5,0. *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, *E. avium* CTC 483 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 (Figuras 1, 4 e 5, respectivamente), também apresentaram sobrevivência à pH 3,0, pH 4,0 e pH 5,0, porém a viabilidade diminuiu, gradativamente, ~2,0 ciclos logarítimicos durante 3 horas de incubação a pH 2,0. Esses resultados demonstraram que as linhagens *L. plantarum* CTC 368 e *E. avium* CTC 469 (Figuras 2 e 3) foram as mais tolerantes a valores de pH 2,0 e pH 3,0, e que mesmo apresentando uma diminuição da tolerância a pH 2,0, a redução da viabilidade das demais linhagens foi de 2,45 Log UFC mL^{-1} durante 3 horas de

incubação. Constatou-se a susceptibilidade das cinco linhagens a pH 1,0 pela redução de 100% da viabilidade logo após a exposição à solução pH 1,0.

Com base nesses resultados “in vitro”, pode-se aventar a hipótese de que as linhagens de bactérias lácticas estudadas, principalmente *L. plantarum* CTC 368 e *E. avium* CTC 469 podem sobreviver à condição de baixa ácidez estomacal (~pH 2,0), no qual os ácidos clorídricos e gástricos são secretados, bem como após a ingestão de uma refeição quando o pH aumenta para 3,0 (HILL et al., 1990; ERKKILA; PETAJA, 2000; GUYTON; HALL, 2006). A capacidade de produção de bacteriocinas nesta condição, e conseqüente inibição de microrganismos patogênicos em condições gastrointestinais, precisa ser avaliada.

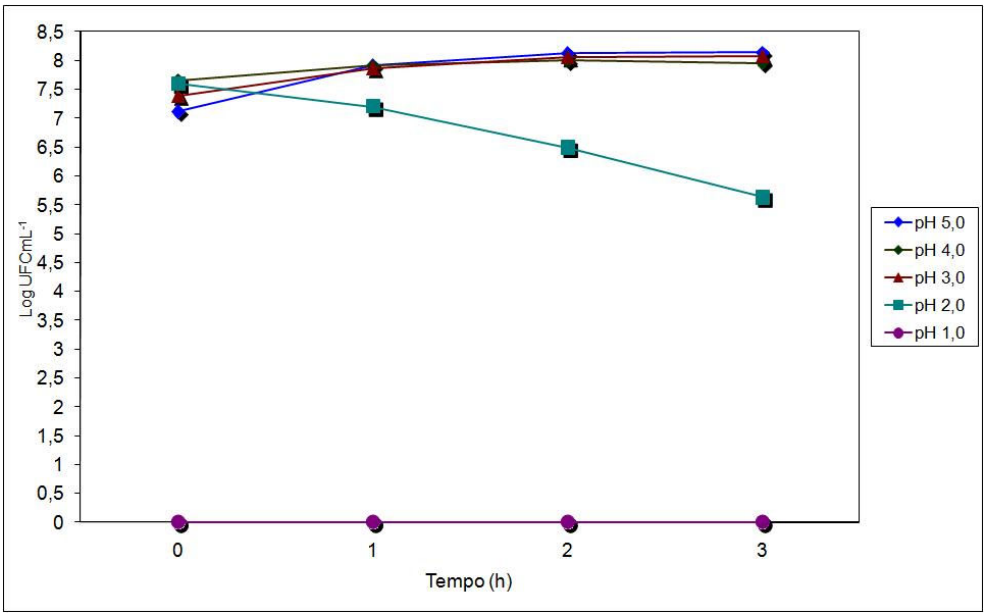


Figura 1 - Efeito das condições ácidas (pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) na viabilidade da linhagem *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

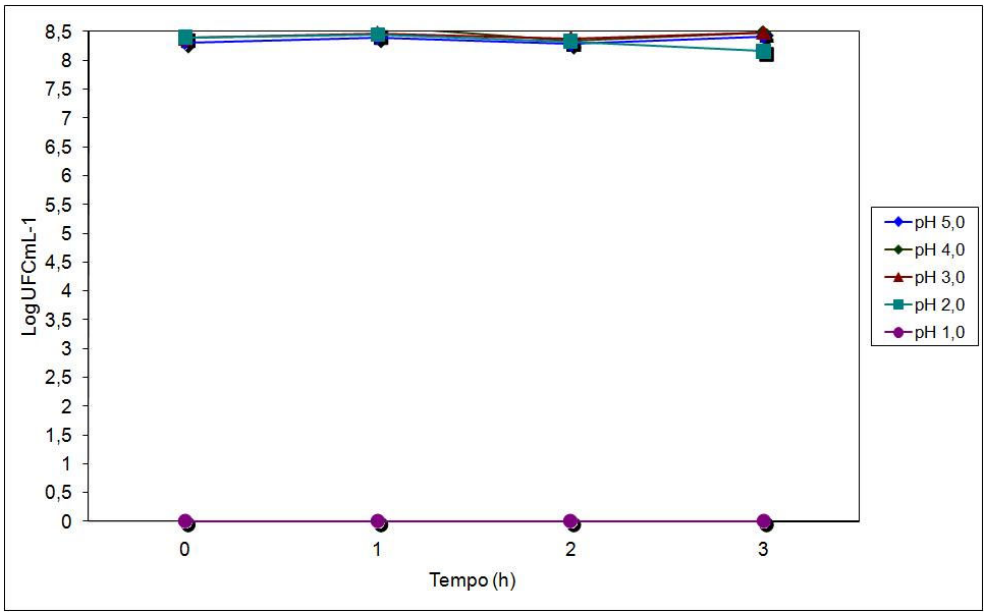


Figura 2 - Efeito das condições ácidas (pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) na viabilidade da linhagem *L. plantarum* CTC 368

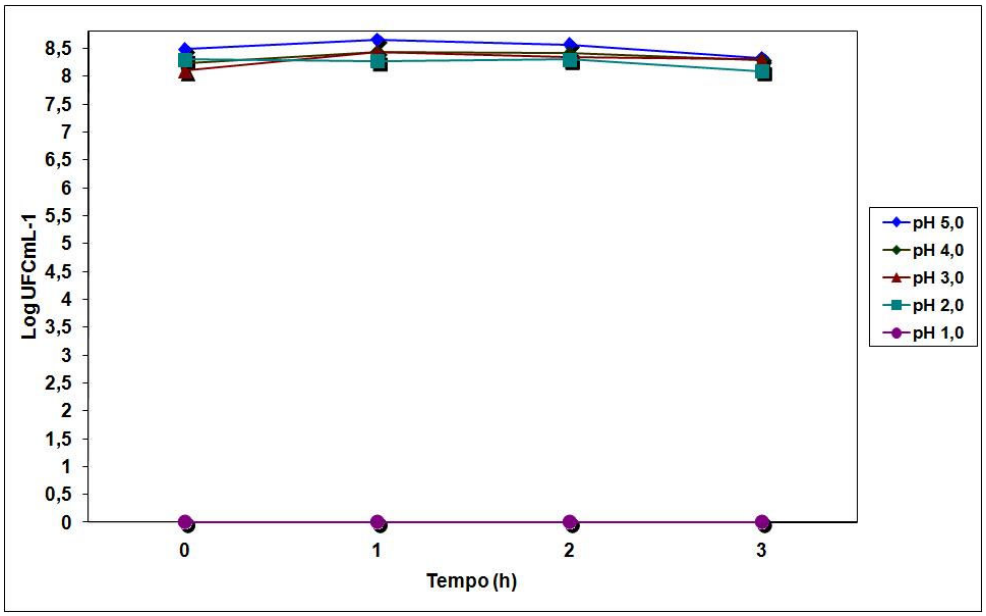


Figura 3 - Efeito das condições ácidas (pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) na viabilidade da linhagem *E. faecium* CTC 469

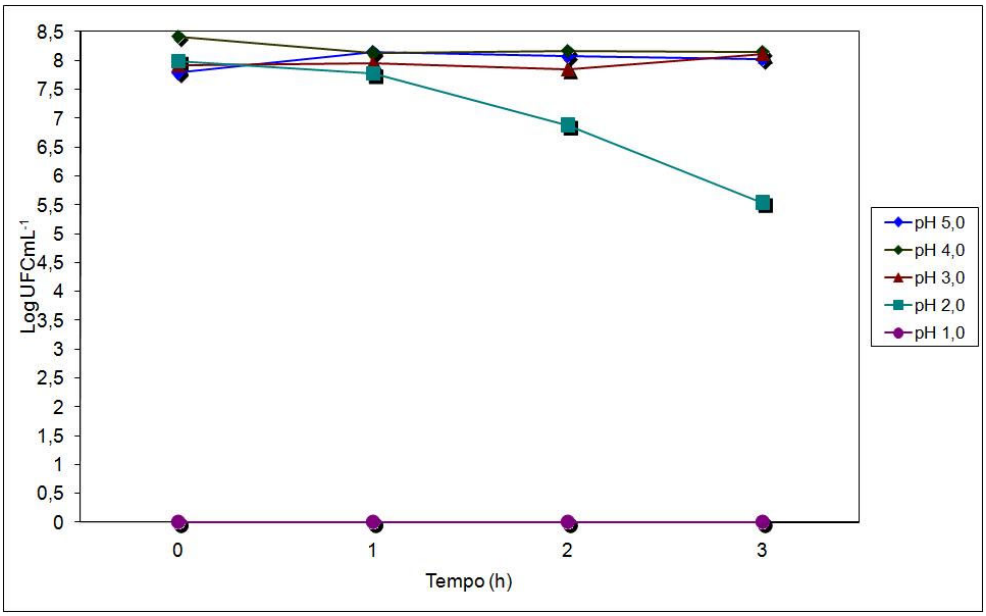


Figura 4 - Efeito das condições ácidas (pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) na viabilidade da linhagem *E. avium* CTC 483

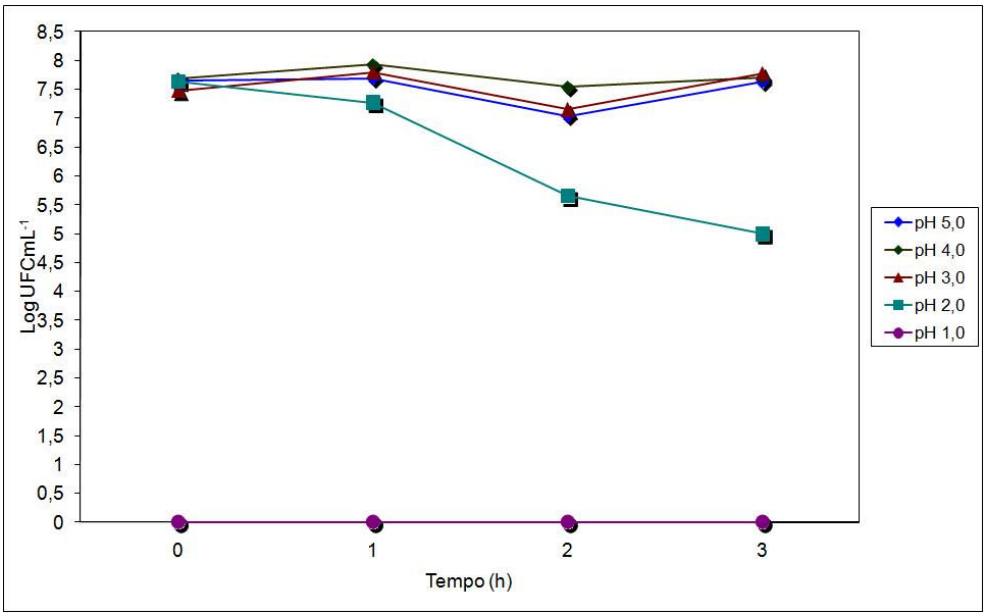


Figura 5 - Efeito das condições ácidas (pH 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) na viabilidade da linhagem *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484

5.2.2 Tolerância à sais biliares

As Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 mostram a o efeito de diferentes concentrações de sais biliares na viabilidade de *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, *L. plantarum* CTC 368, *E. avium* CTC 469, *E. avium* CTC 483 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, respectivamente. Verifica-se uma redução de viabilidade de 4,0 e 5,0 ciclos logarítmicos para todas as linhagens de bactérias lácticas avaliadas. A tolerância à sais biliares variou de acordo com a concentração e o tempo de incubação. *E. avium* CTC 469 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 (Figuras 8 e 10) são as linhagens mais tolerantes aos sais biliares, estas tiveram, respectivamente, uma queda de 3,5 log $UFCmL^{-1}$ e 3,35 log $UFC.mL^{-1}$ em presença de 0,1% de sais biliares. Entre estas duas linhagens, a *E. avium* CTC 469 (Figura 8) foi capaz de tolerar concentração de até 2%, mantendo sua população constante, ou seja, 100% de sobrevivência nesta condição. Para a *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 (Figura 10), à medida que se aumentou a concentração de sais biliares de 0,1 a 1%, houve uma redução de 3 ciclos logaritimos da população desta cultura. Com relação ao tempo de incubação, observa-se entre as linhagens avaliadas uma extensa variação (12% e 75%) de tolerância às concentrações de sais biliares.

A tolerância à sais biliares é um importante critério na seleção de bactérias lácticas probióticas. Quanto mais elevado for o grau de tolerância da linhagem, maior será sua possibilidade de colonizar o intestino (GILLILAND et al., 1985). Como a bile possui propriedade detergente (WIJAYA, 2003), a susceptibilidade da linhagem é determinada pela composição de lipídeos e ácidos graxos de sua membrana celular. Diferenças de composição de membranas entre linhagens de *L. oenus* resistentes e sensíveis à bile foram observadas por Kole e Altossar (1984). Em presença de bile foi observado um aumento da permeabilidade celular de *L. acidophillus* (NOH; GIKILAND, 1993).

Esses resultados “in vitro” demonstraram a capacidade de sobrevivência das linhagens produtoras de bacteriocinas avaliadas em presença de sais de bile. Deve-se ressaltar que a funcionalidade de um probiótico deve ser confirmada por testes *in vivo*,

incluindo tolerância as condições gástricas, aderência a mucosa ou células epiteliais humanas e inibição de microrganismos patogênicos.

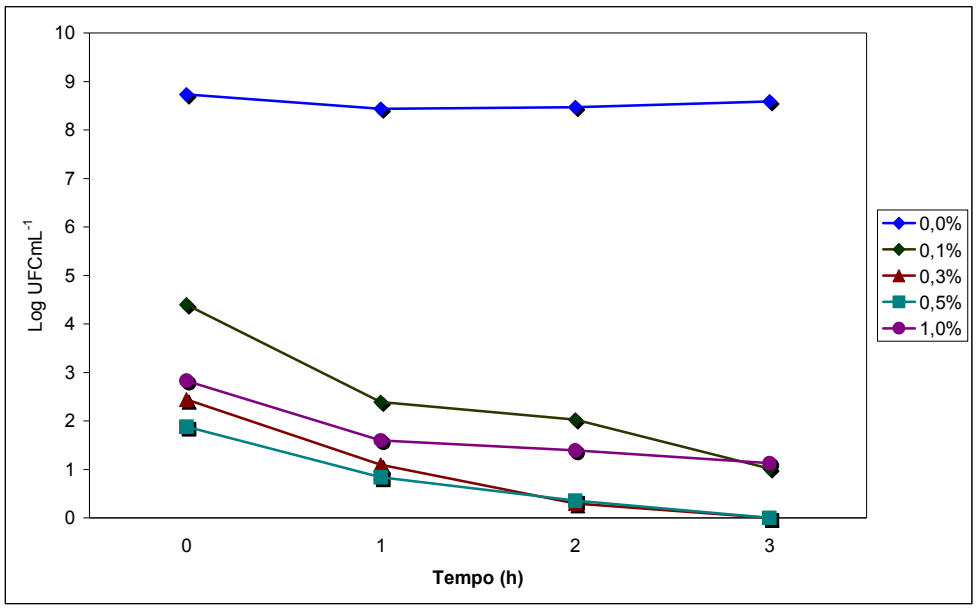


Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações de sais biliares (0,1; 0,3; 0,5 e 1%) na viabilidade da linhagem *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

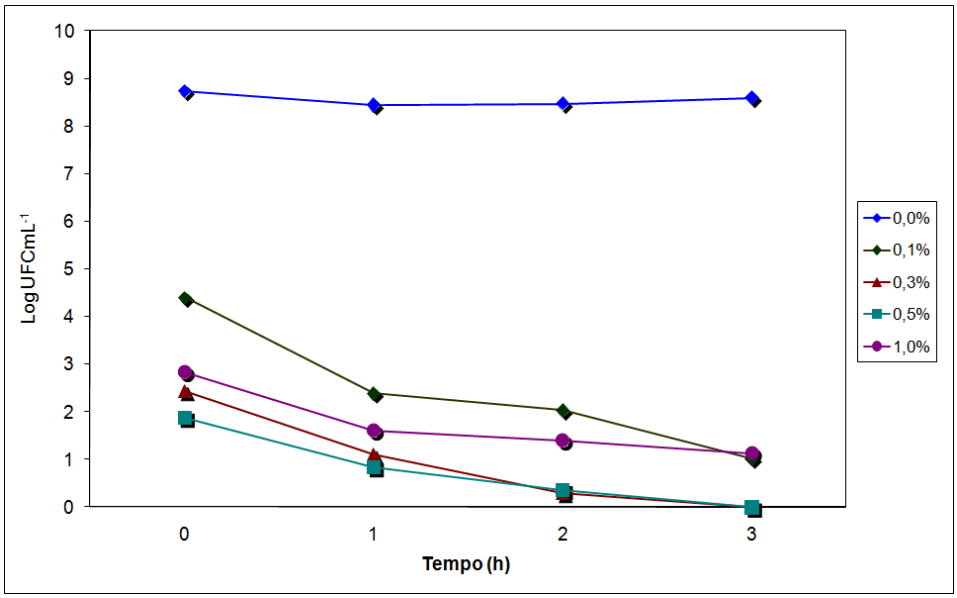


Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações de sais biliares (0,1; 0,3; 0,5 e 1%) na viabilidade da linhagem *L. plantarum* CTC 368

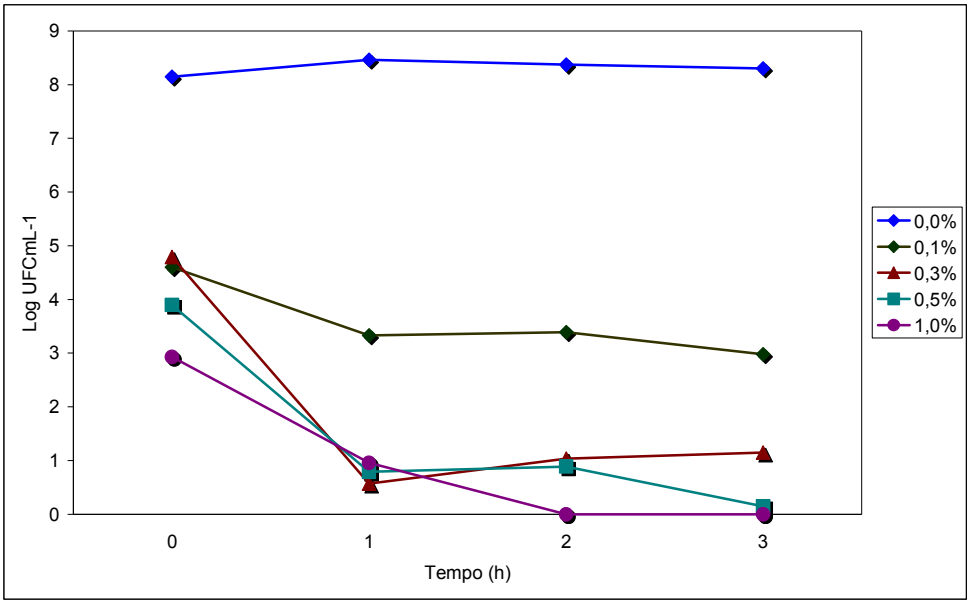


Figura 8 - Efeito de diferentes concentrações de sais biliares (0,1; 0,3; 0,5 e 1%) na viabilidade da linhagem *E. faecium* CTC 469

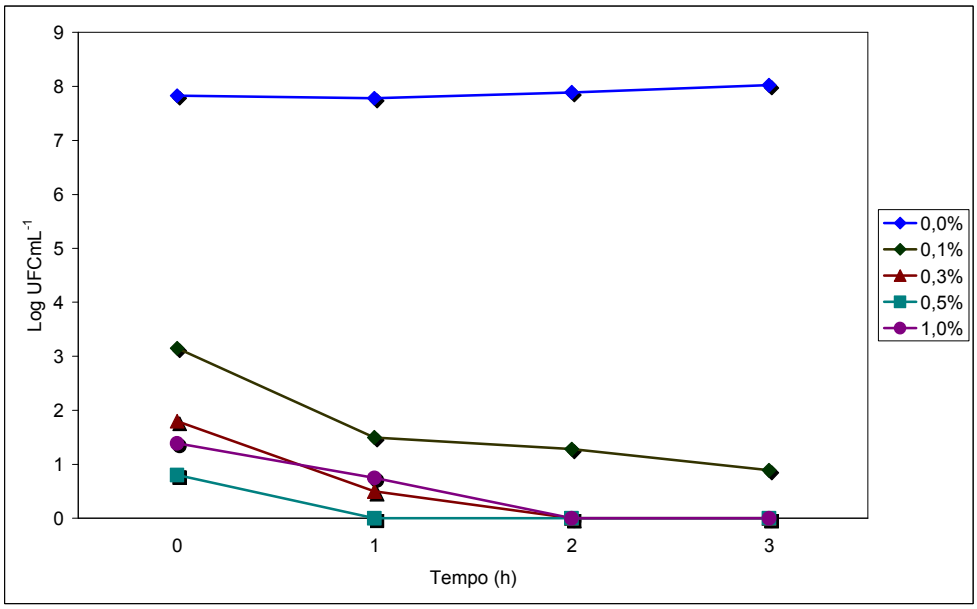


Figura 9 - Efeito de diferentes concentrações de sais biliares (0,1; 0,3; 0,5 e 1%) na viabilidade da linhagem *E. avium* CTC 483

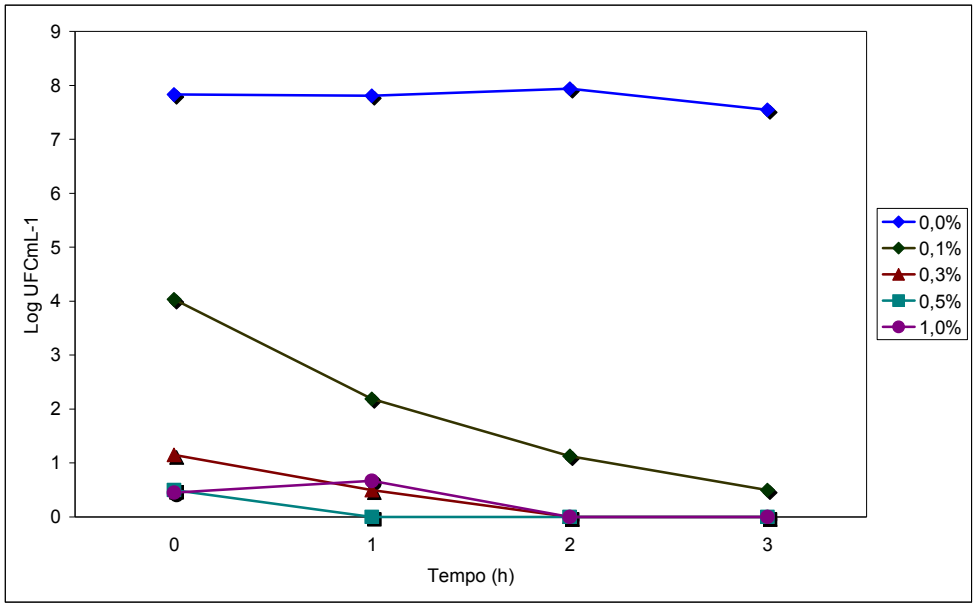


Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações de sais biliares (0,1; 0,3; 0,5 e 1%) na viabilidade da linhagem *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484

5.3 Espectro de atividade e modo de ação

5.3.1 Espetro de atividade

O espectro de atividade antimicrobiana das cinco linhagens de bactérias lácticas avaliadas neste estudo é apresentado na Tabela 6. Verifica-se que as cinco linhagens de bactérias lácticas avaliadas apresentaram atividade antagonística direcionada a diferentes gêneros e espécies de microrganismos Gram-positivos. O número de microrganismos alvo inibidos foi maior no método de antagonismo simultâneo em poços (Figura 11) que no método de diluição crítica. Isto pode ser explicado pela diferença entre esses dois métodos. No método de diluição crítica, pode-se avaliar somente a atividade das bacteriocinas, enquanto que no método de antagonismo simultâneo as células viáveis de ambos os microrganismos (produtores e sensíveis) estão em contato. Dessa forma, outros tipos de atividade antimicrobiana podem ocorrer, por exemplo, a competição pelo substrato.

Tabela 6 - Espectro de atividade das linhagens de bactérias lácticas pelo método de antagonismo simultâneo em poços (AS) e o de diluição crítica (DC)

Linhagens sensíveis	Linhagens produtoras de bacteriocinas									
	204		368		469		483		484	
	AS	DC	AS	DC	AS	DC	AS	DC	AS	DC
Bacillus cereus ATCC14579	+	0,8	+	0,4	+	1,6	+	1,6	++	0,2
Bacillus cereus CTC 011	+	-	-	-	++	-	+	0,4	+	0,4
Clostridium perfringes CTC 042	+	0,2	-	-	+	-	+	0,2	+	0,2
Clostridium sporogenes CTC 6	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Clostridium sulfito redutor CTC 5	+	-	-	-	+	0,4	+	-	-	-
Enterococcus faecalis ATCC 19433	-	-	-	-	+	1,6	-	-	++	0,2
Escherichia coli ATCC 25422	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Lactobacillus plantarum ITAL434	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Lactobacillus helveticus Wiesby	+++	0,8	-	-	+++	0,8	+++	0,8	+++	0,8
Leuconostoc mesenteroides ATCC 10830	-	0,0	-	-	+	0,2	+	0,2	+	-
Listeria innocua INRA	+	0,4	+	0,8	+	0,4	+	0,2	+	-
Listeria monocytogenes CTC21	+	0,4	+	0,8	+	0,2	+	0,0	+	0,2
Micrococcus luteus ATCC 4698	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Pseudomonas sp. CTC 032	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Staphylococcus aureus CTC 33	+	0,4	+	0,8	+	0,2	+	0,2	+	0,2
Salmonella typhimurium ATCC 14028	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Streptococcus mutans ATCC 25175	-	-	-	-	+	0,2	-	0,2	+	-
Weissella viridescens CCT 0849	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

[1] Resultado expresso em atividade arbitrária (unidade x $10^3 mL^{-1}$); (-) não formou halo de inibição; (+) halo de até 3mm; (++) halo de 3 a 5mm; (+++) halo maior que 5mm. (-) ausência de halo de inibição; (+) halo até 3 mm (++) entre 3 e 5 mm; (+++) maior que 5 mm 1 ATCC: American Type Culture Collection, Baltimore, MD, USA; CNRZ and INRA: Centre de Recherches Agronomiques de Jouy-en-Josas, France; FEA: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P.; CTC: Centro de Tecnologia de Carnes - ITAL, Campinas, Brasil; TECNOLAT: Centro de Tecnologia de Laticínios - ITAL, Campinas, Brasil

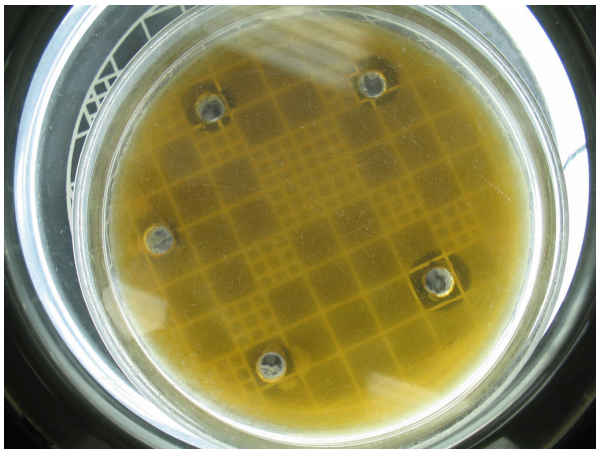


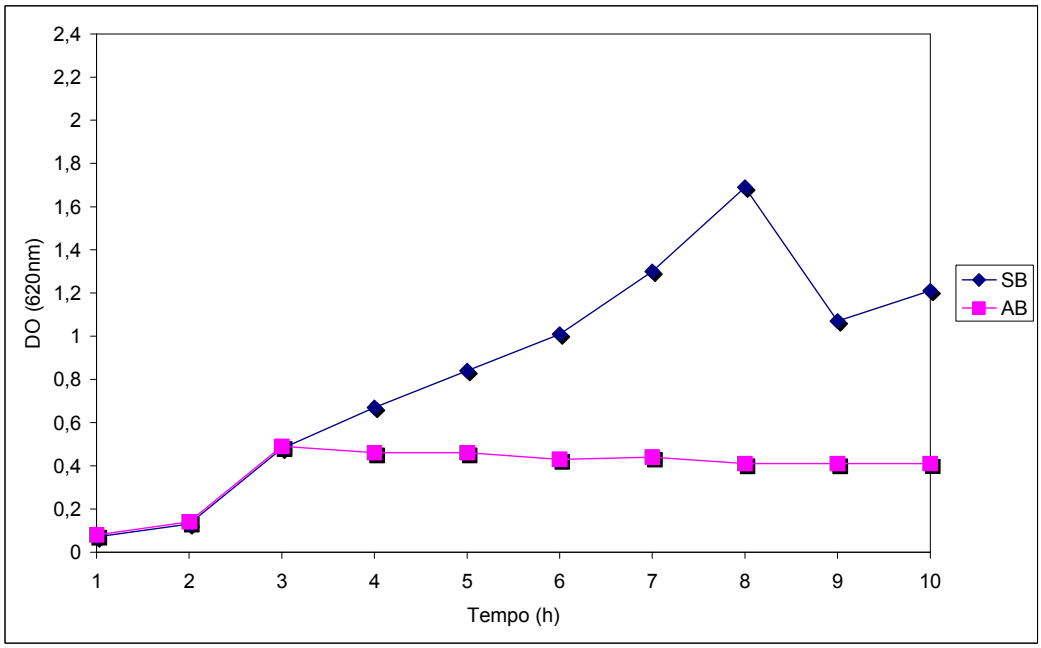
Figura 11 - Ilustração da inibição de *B.cereus* CTC 011 por linhagens produtoras de ebacteriocinas pelo método de difusão em poços

Deve-se considerar também a capacidade de adsorção das bacteriocinas às células produtoras, o que pode contribuir a redução da atividade da bacteriocina no método de diluição crítica. Com relação aos microrganismos Gram-negativos avaliados, verifica-se ainda na tabela 8 que *E. coli* ATCC 25422 e *Pseudomonas* sp. CTC 032 foram inibidas pelas linhagens *E. avium* ITAL 469 e *L. lactis* subsp. *hordinae* ITAL 484. Como este efeito antagônico foi detectado no método de antagonismo simultâneo pode-se deduzir que outros fatores que não as bacteriocinas podem ter contribuído para a inibição desses microrganismos, ou que os mesmos apresentem alguma alteração de estrutura da parede celular que permita a ação da bacteriocina na membrana celular bacteriana.

5.3.2 Modo de ação das bacteriocinas

O efeito das bacteriocinas das linhagens CTC *L. lactis* subsp. *cremoris* 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 sobre células de *S.aureus* CTC 033 durante crescimento é apresentado na do anexo G e nas Figuras 12 e 13. Verifica-se que após a adição da bacteriocina (4 horas), a viabilidade de *S. aureus* CTC 033 diminuiu gradativamente, de 8,2 à 4,6 $UFCmL^{-1}$ (após 9 horas) e de 8,2 à 7,0 $UFCmL^{-1}$ (após 5 horas) para as linhagens CTC 204 e CTC484, respectivamente. As células

sobreviventes retomaram o crescimento, alcançando praticamente a mesma população inicial com 9 horas nas mesmas condições. As diferenças máximas entre a população de *S.aureus* CTC 033 controle (sem adição de bacteriocina) e a população teste (adicionada de bacteriocina) foram de 4,4 e 1.2 Log UFC mL^{-1} para CTC204 e CTC484, respectivamente. Os valores de DO permaneceram praticamente constantes após a adição das bacteriocinas aos cultivos de *S.aureus* 033. Estes resultados demonstraram o efeito bactericida dessas bacteriocinas, com um impacto mais forte observado com a linhagens CTC204.



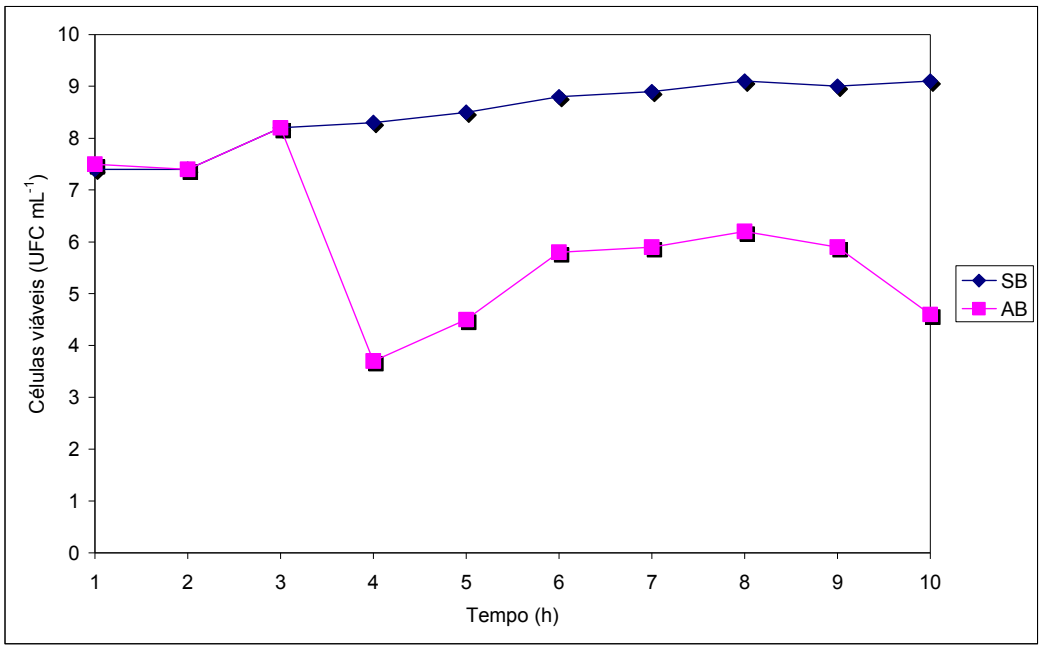


Figura 12 - Efeito do sobrenadante livre de células de CTC204 em meio APT células de *S. aureus* CTC033 após 4 horas de crescimento em caldo LAPTG a 37°C (SB=sobrenadante=controle e AB=adição de bacteriocinas ou seja sobrenadante adiocionado de bacteriocina)

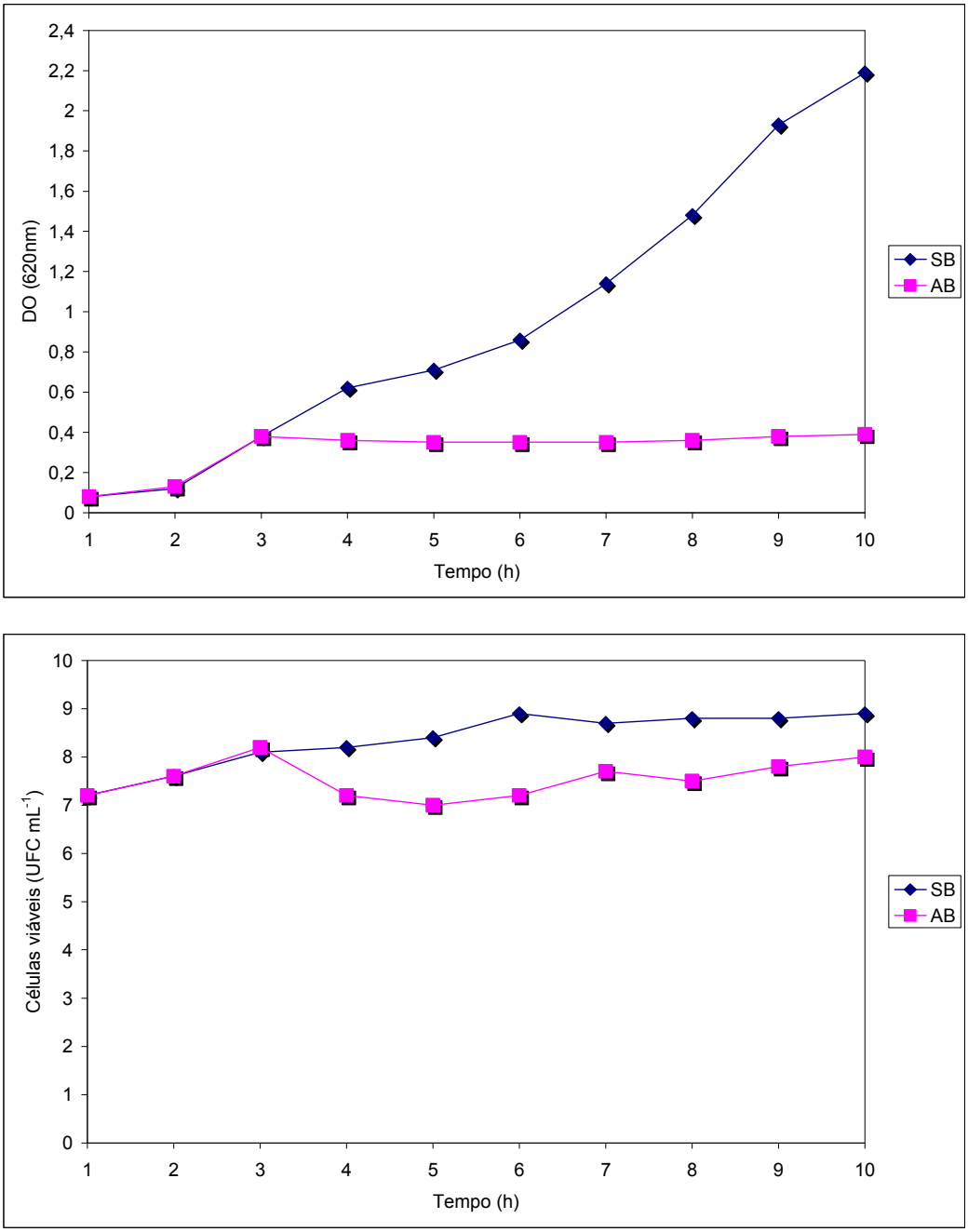


Figura 13 - Efeito da adição das bacteriocinas produzidas pela linhagem CTC484 em meio MRS e CTC 484 em meio MRS sobre células de *S. aureus* CTC033 após 4 horas de crescimento em caldo LAPTG a 37°C (SB=sobrenadante=controle e AB=adição de bacteriocinas ou seja sobrenadante adiocionado de bacteriocina)

5.4 Características de produção de bacteriocinas

5.4.1 Em diferentes meios de cultivo

Os resultados do crescimento celular (Log.UFCmL^{-1}) e DO (A_{650}nm), produção de ácido láctico (pH) e de bacteriocinas (UA.mL^{-1}) em diferentes meios de cultivo (APT, MRS, TSB e Rogosa) são mostrados nas Figuras de 14 a 33, cujos dados também podem ser verificados nas tabelas encontradas nos Anexos A, B, C, D e E respectivamente. Verificou-se que as características de crescimento e de produção de bacteriocinas foram semelhantes para todas as linhagens e meios avaliados. A multiplicação bacteriana aumentou durante o período de incubação e a produção de bacteriocinas mostrou uma cinética de metabólito primário, a atividade aumentou com o crescimento celular e alcançou seu máximo quando o crescimento cessou, correspondendo à maior biomassa formada ao final da fase exponencial de reprodução. Isto pôde ser claramente observado com a linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 (Figuras 14, 15, 16 e 17).

Esses resultados estão de acordo com Tagg et al. *(*1976), que enfatizaram que a biossíntese de bacteriocinas ocorre principalmente na fase logarítmica de crescimento, podendo, porém, atingir sua produção máxima em diferentes fases de crescimento. Buchman et al. (1988) verificaram a produção de nisina em todas as fases de crescimento microbiano. Além da fase de crescimento celular, outros fatores podem afetar a produção de bacteriocinas, dentre os quais citam-se o pH, a viscosidade, o potencial redox e a presença de determinados componentes do meio (proteínas e carboidratos), bem como as condições de temperatura (SÁNCHEZ et al., 2002).

Considera-se a produção de bacteriocinas uma cinética de metabólito primário, ou seja, a formação dos produtos depende apenas da taxa de crescimento da bactéria produtora. Entretanto, algumas bacteriocinas, tais como a pediocina AcH e a propionicina, foram consideradas como metabólitos secundários (CABO et al., 2001), visto que a produção do peptídeo continuou durante a fase estacionária da cultura. Esta característica pode estar associada à diminuição do pH no final da fermentação,

que pode ativar as enzimas envolvidas nas alterações pós-translacionais da molécula (WILLIAMS et al., 2007).

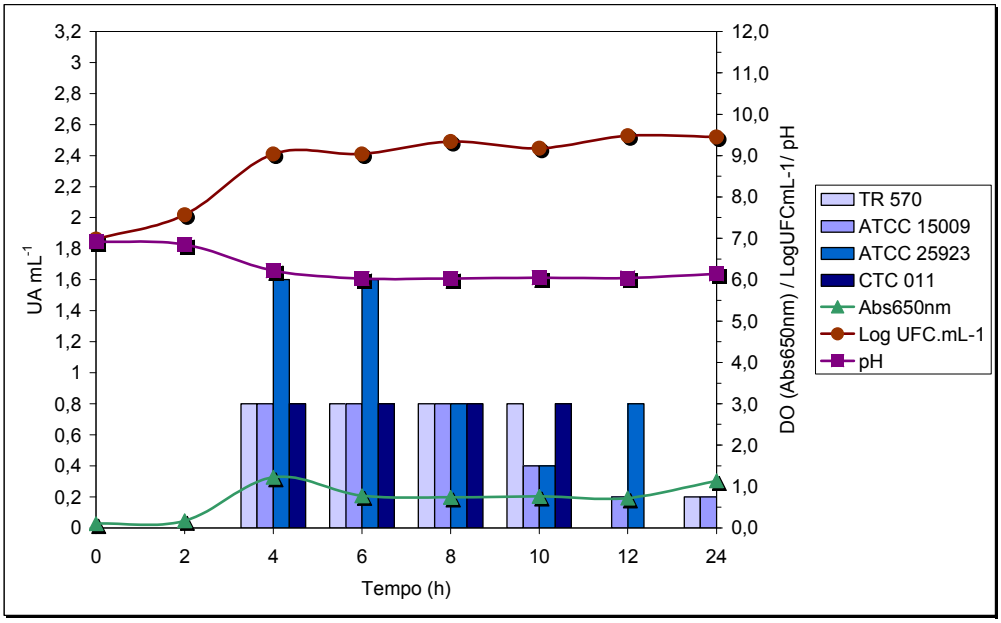


Figura 14 - Crescimento celular e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 isolado de moela de frango *in natura* em APT a 37ºC por 24 horas

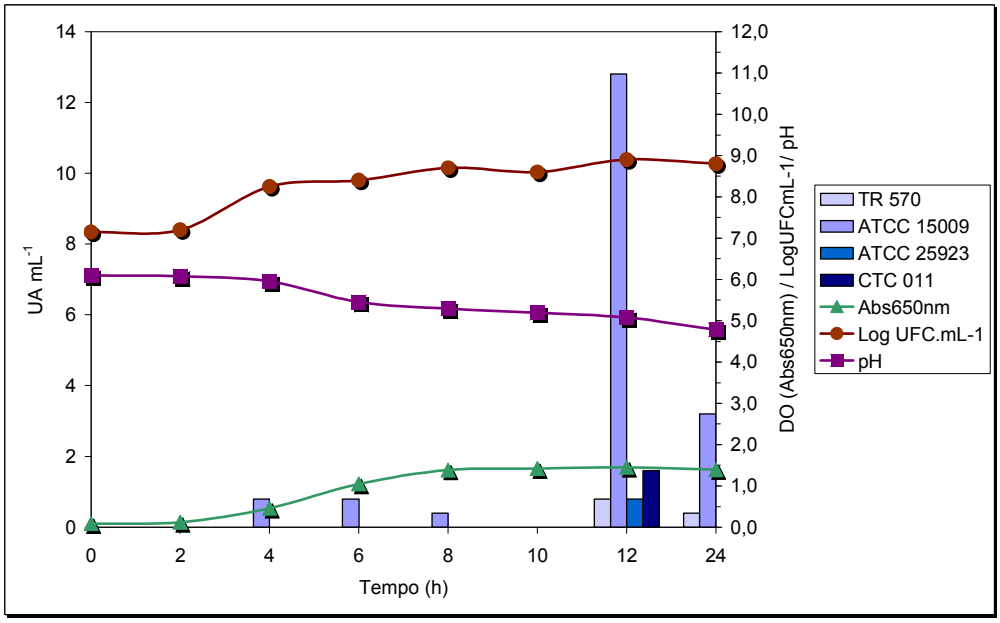


Figura 15 - Crescimento celular e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 isolado de moela de frango *in natura* em MRS a 37ºC por 24 horas

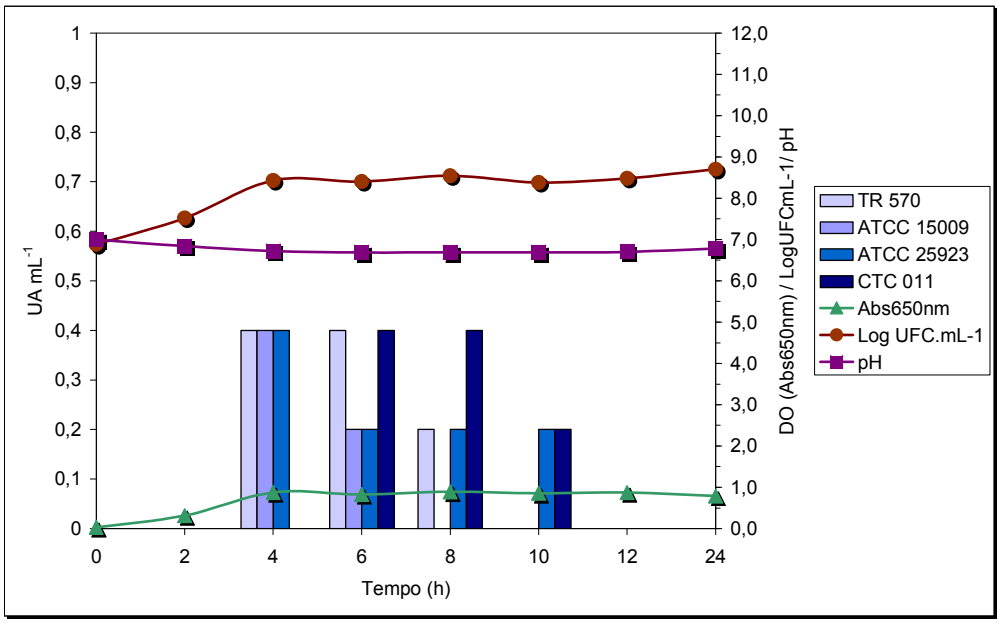


Figura 16 - Crescimento celular e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 isolado de moela de frango *in natura* em TSB a 37ºC por 24 horas

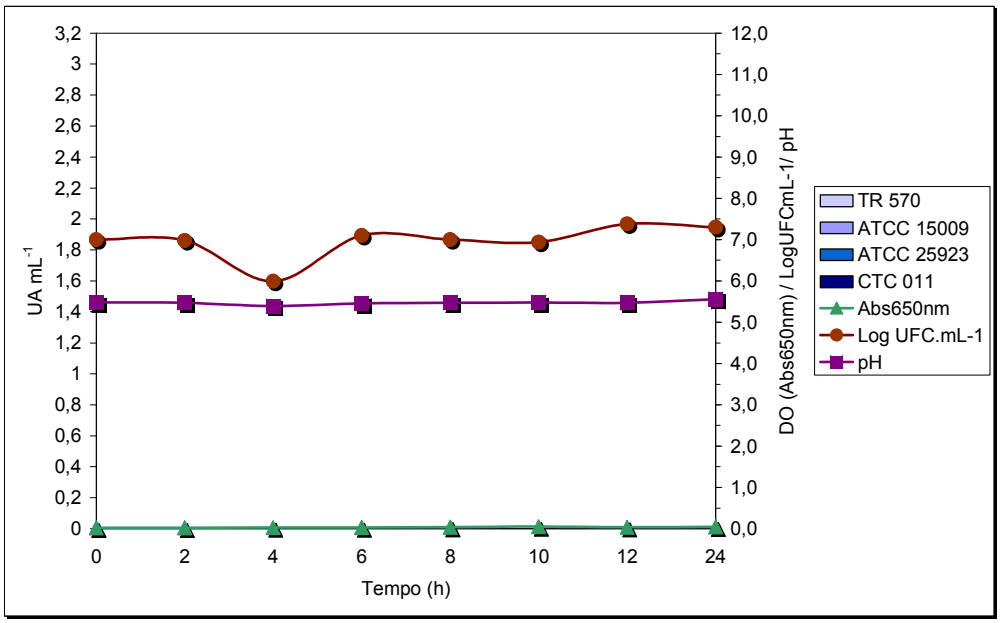


Figura 17 - Crescimento celular e produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 isolado de moela de frango *in natura* em ROG a 37ºC por 24 horas

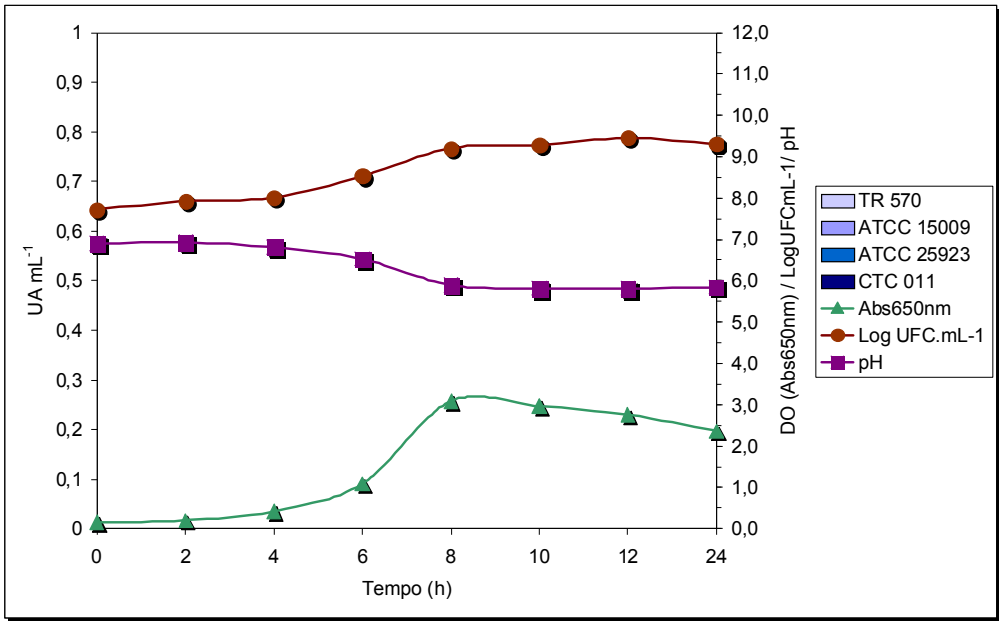


Figura 18 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. plantarum* CTC 368 isolado de lingüiça de javali *in natura* em *natura* em APT a 37ºC por 24 horas

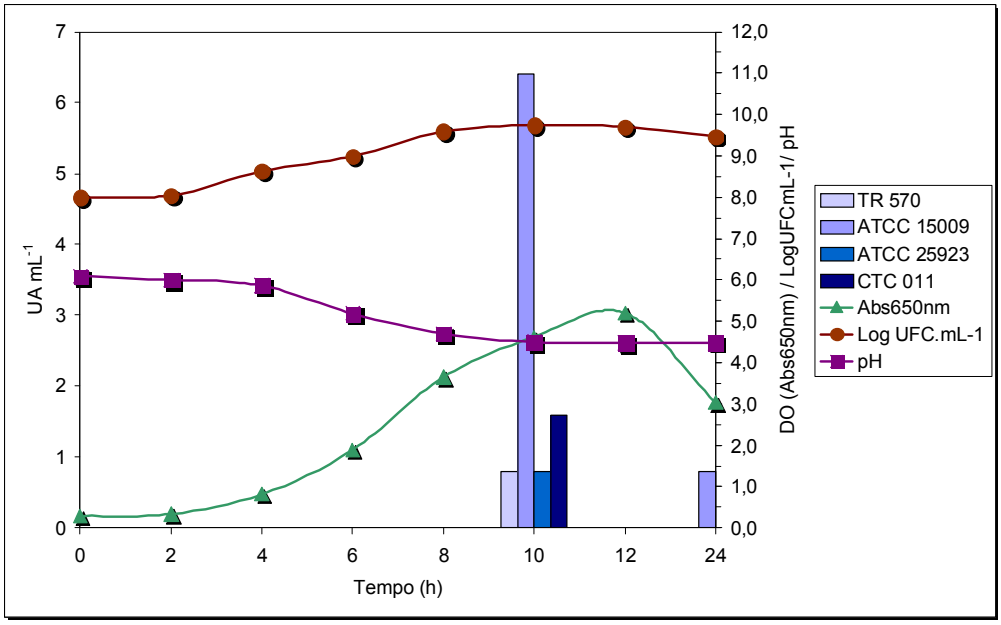


Figura 19 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. plantarum* CTC 368 isolado de lingüiça de javali *in natura* em *natura* em MRS a 37ºC por 24 horas

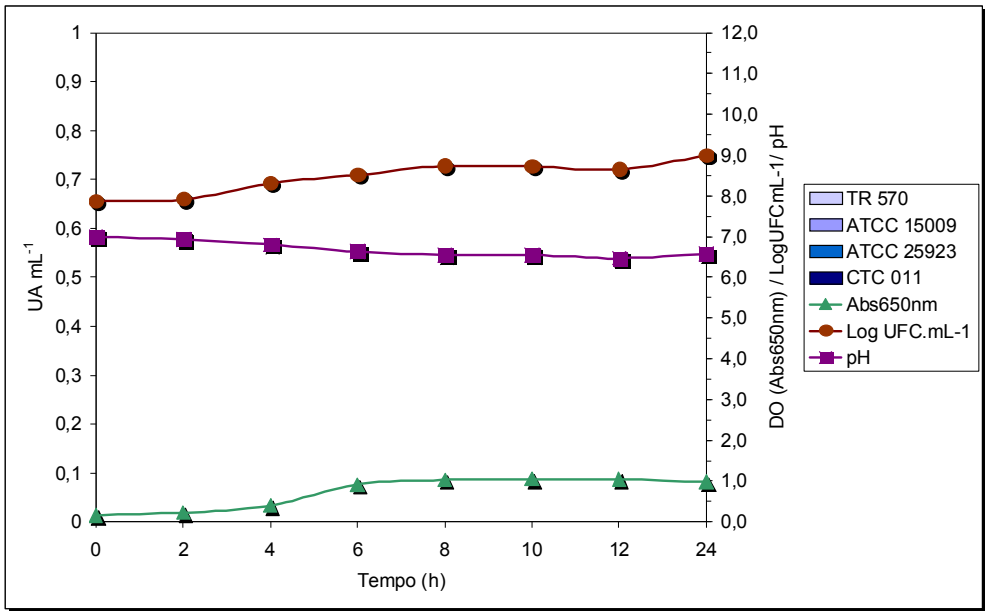


Figura 20 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. plantarum* CTC 368 isolado de lingüiça de javali *in natura* em *natura* em TSB a 37ºC por 24 horas

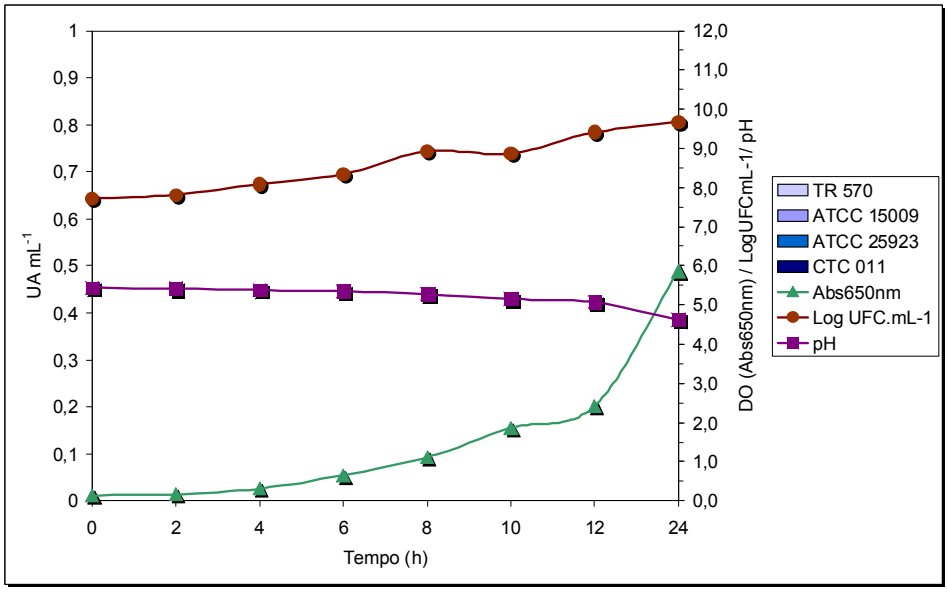


Figura 21 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. plantarum* CTC 368 isolado de lingüiça de javali *in natura* em *natura* em ROG a 37ºC por 24 horas

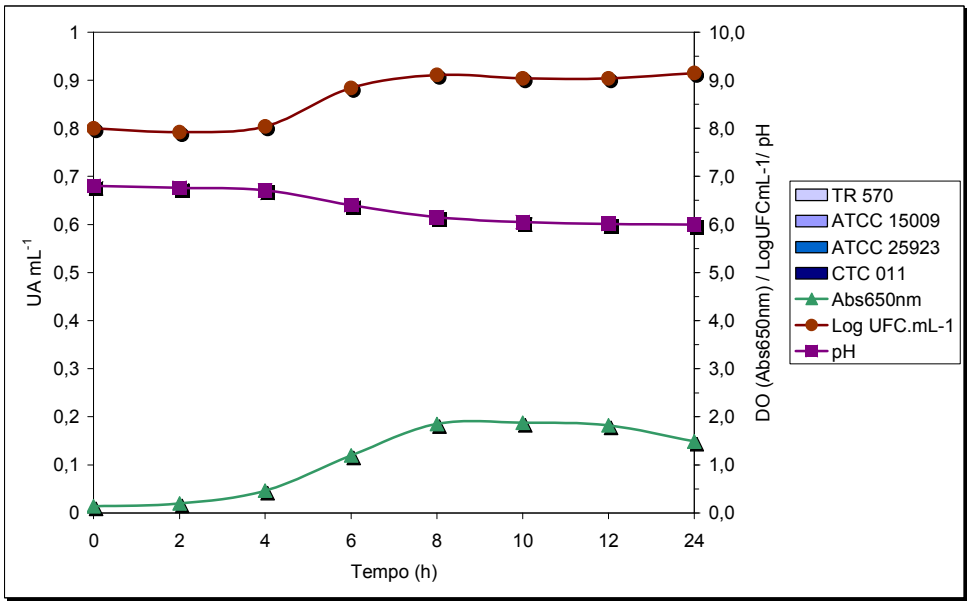


Figura 22 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas e produção de bacteriocinas por *E. avium* CTC 469 isolado de carne de frango mecanicamente separada (CFMS) *in natura* em meios tamponados Caldo APT a 37ºC por 24 horas

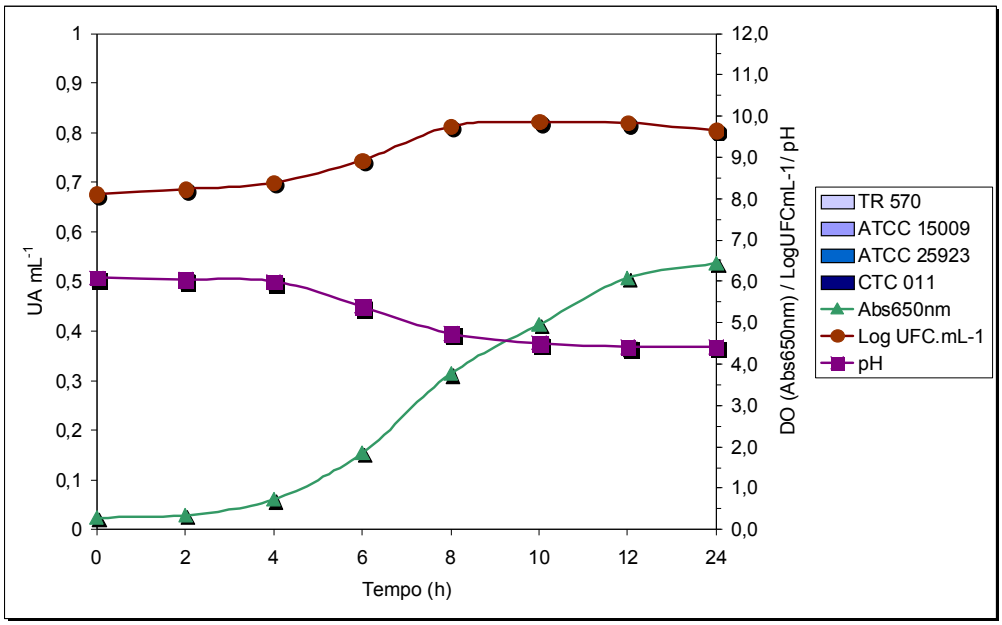


Figura 23 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas e produção de bacteriocinas por *E. avium* CTC 469 isolado de carne de frango mecanicamente separada (CFMS) *in natura* em meios tamponados Caldo MRS a 37ºC por 24 horas

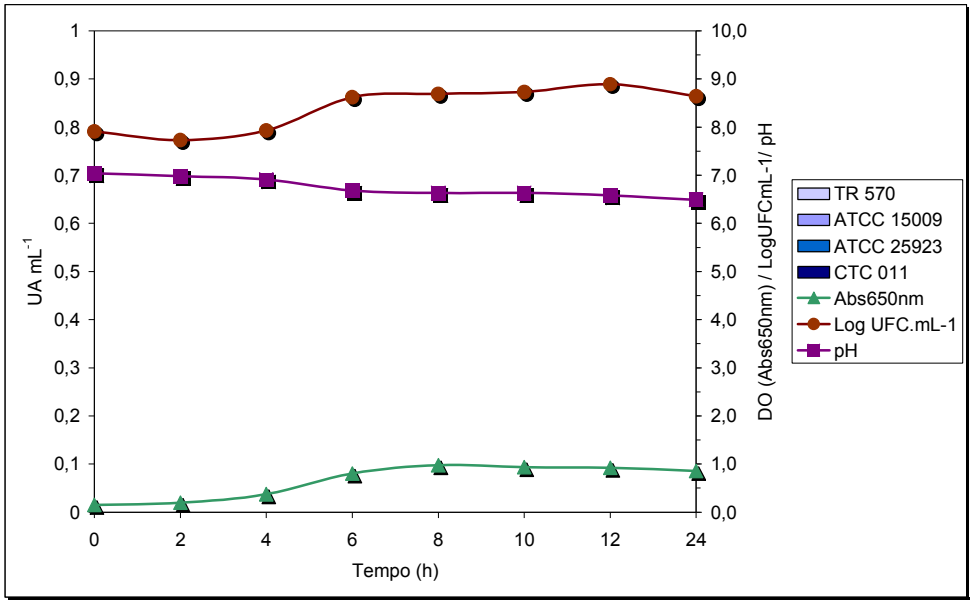


Figura 24 - Crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas e produção de bacteriocinas por *E. avium* CTC 469 isolado de carne de frango mecanicamente separada (CFMS) *in natura* em meios tamponados Caldo TSB a 37ºC por 24 horas

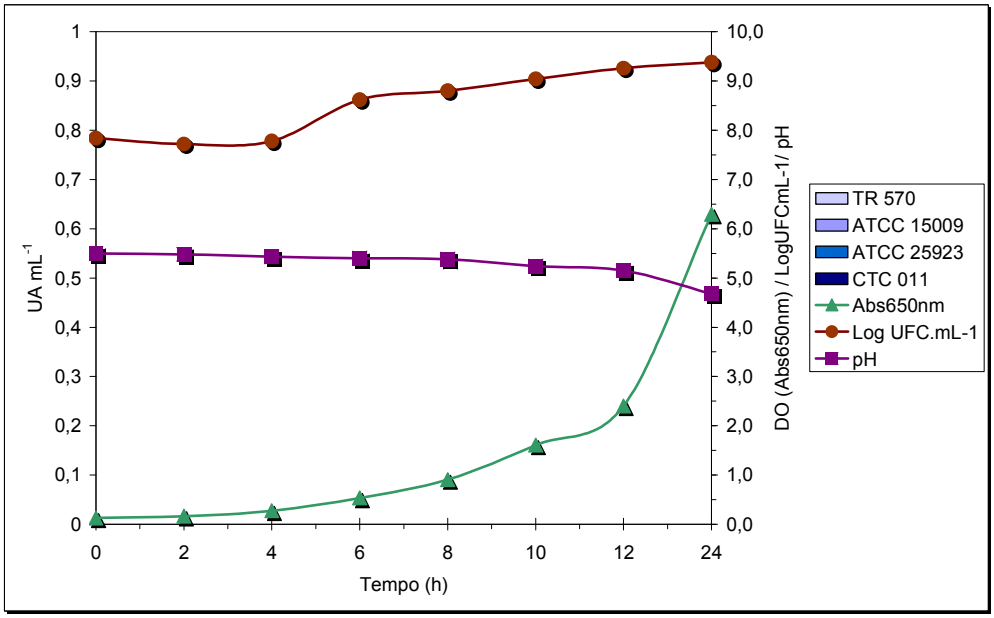


Figura 25 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas e produção de bacteriocinas por *E. avium* CTC 469 isolado de carne de frango mecanicamente separada (CFMS) *in natura* em meios tamponados Caldo ROG a 37ºC por 24 horas

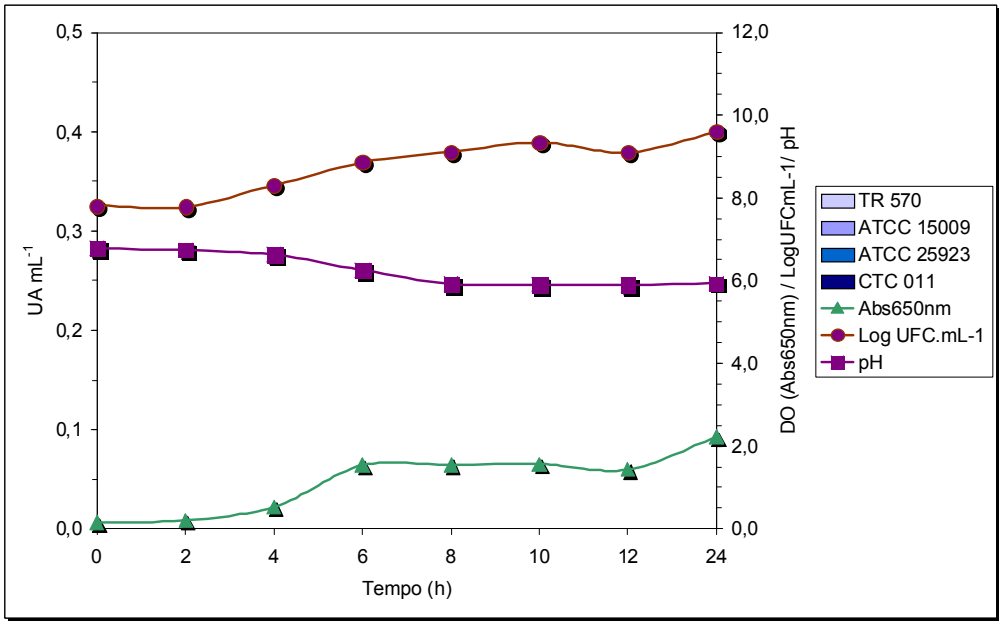


Figura 26 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *E. avium* CTC 483 isolado de fígado de frango *in natura* em APT a 37ºC por 24 horas

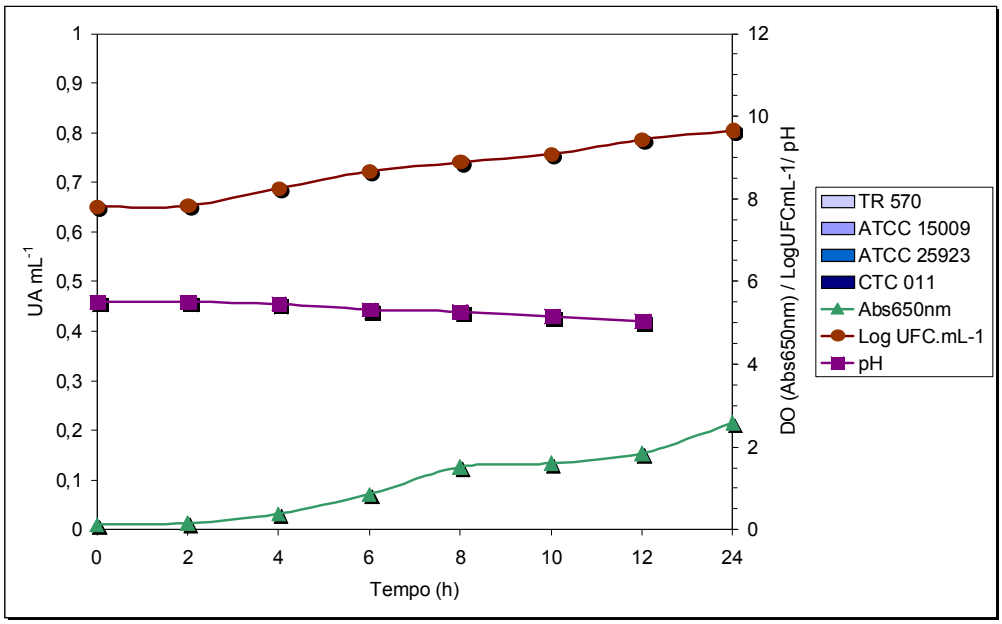


Figura 27 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *E. avium* CTC 483 isolado de fígado de frango *in natura* em MRS a 37ºC por 24 horas

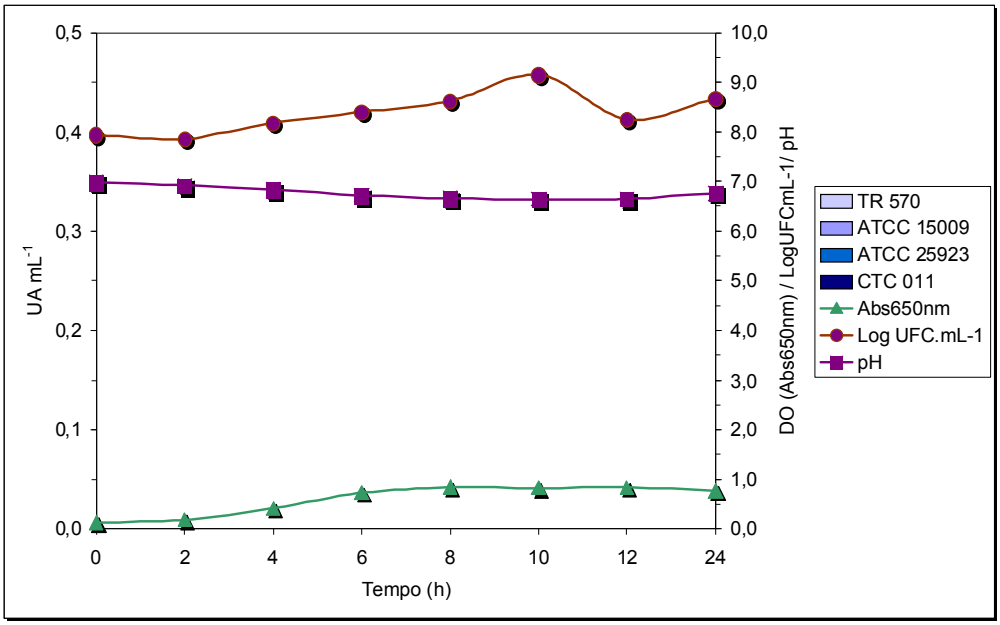


Figura 28 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *E. avium* CTC 483 isolado de fígado de frango *in natura* em TSB a 37ºC por 24 horas

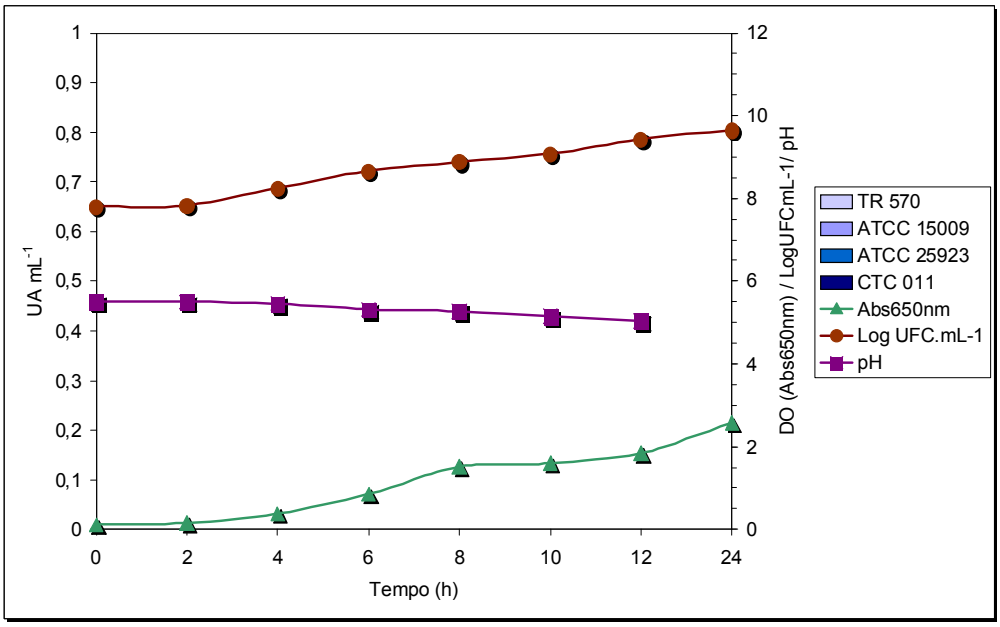


Figura 29 - Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *E. avium* CTC 483 isolado de fígado de frango *in natura* em ROG a 37ºC por 24 horas

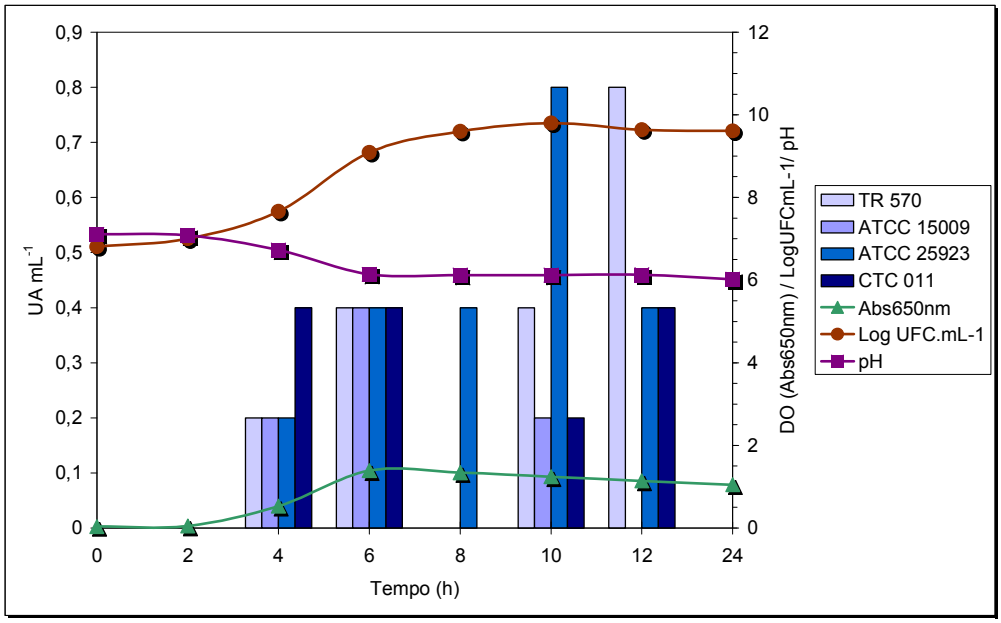


Figura 30 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 isolado de fígado de frango *in natura*, em APT a 37ºC por 24 horas

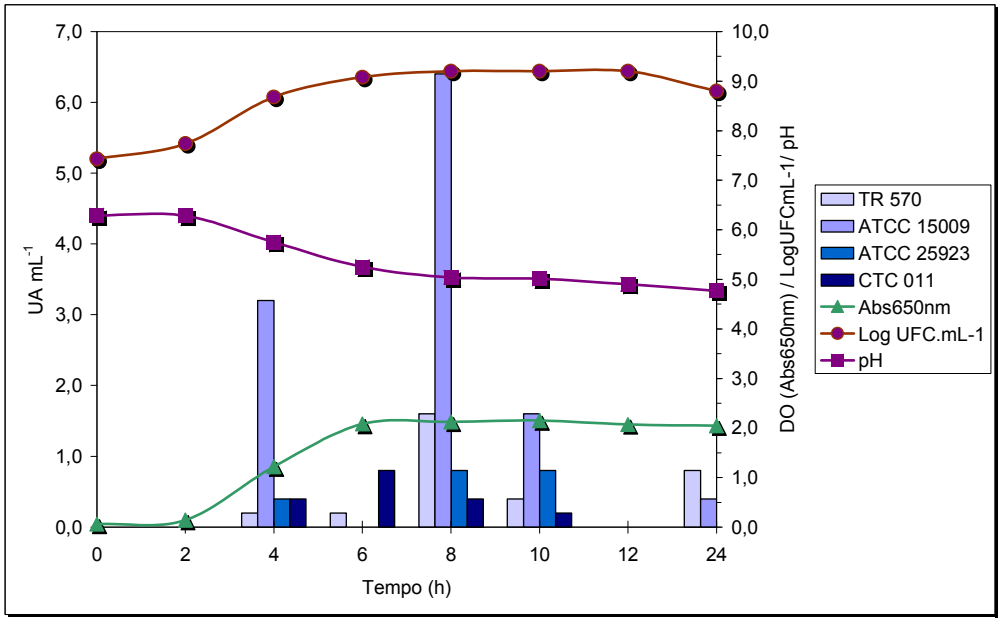


Figura 31 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 isolado de fígado de frango *in natura*, em MRS a 37ºC por 24 horas

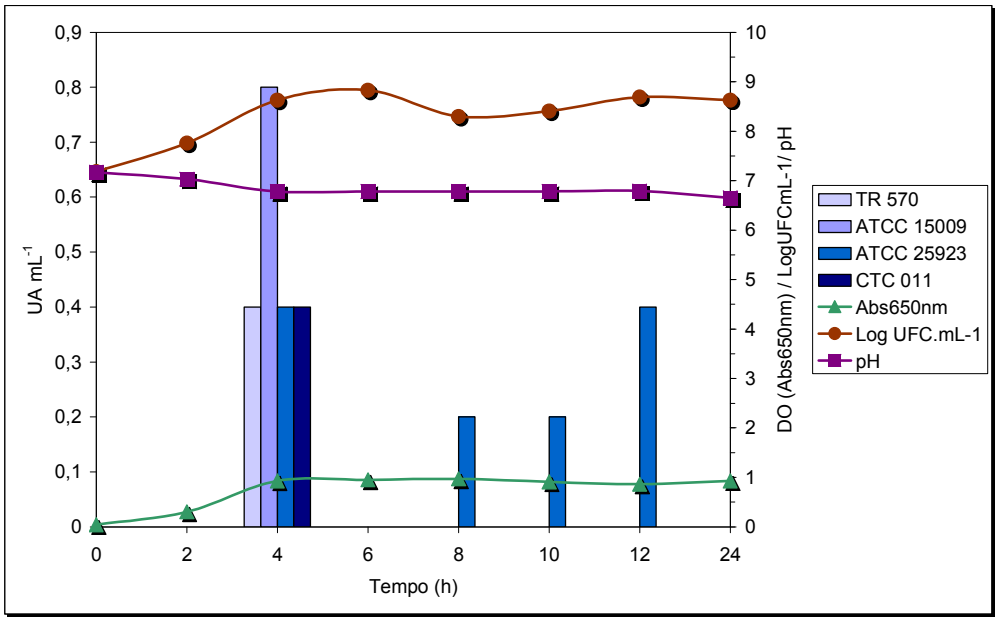


Figura 32 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 isolado de fígado de frango *in natura*, em TSB a 37ºC por 24 horas

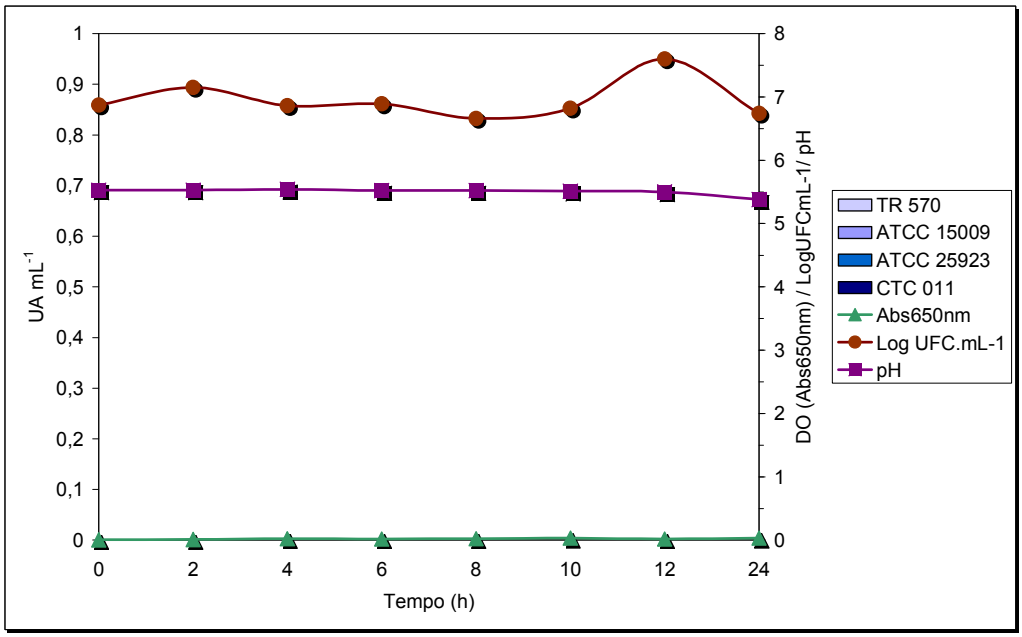


Figura 33 - Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 isolado de fígado de frango *in natura*, em Rogosa a 37ºC por 24 horas

Os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de bacteriocinas das cinco linhagens avaliadas em quatro diferentes meios de cultivo são apresentados na Figura 34 e Anexo F. A análise destes parâmetros revelou dois grupos distintos, um deles constituído pelas linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 e o outro pelas linhagens *E. faecium* CTC 469, *E. avium* CTC 483 e *L. plantarum* CTC 368.

As linhagens do primeiro grupo apresentaram crescimento mais rápido (CTC204=0,08 h^{-1}, CTC484= 0,09 h^{-1}) e maior rendimento de biomassa (CTC 204=2,5, CTC 484=2,8) em APT que nos demais meios. Em meio MRS estas linhagens tiveram crescimento mais lento (CTC204=0,05 h^{-1}, CTC484= 0,06 h^{-1}) e menor rendimento de biomassa (CTC 204=1,7, CTC 484=1,8), porém este meio proporcionou um maior rendimento da produção de bacteriocina (de Ymax=1,4) para ambas as linhagens. Em TSB, tanto o crescimento, de 0,06 h^{-1} para ambas as linhagens, quanto o rendimento de biomassa (CTC 204=1,8, CTC 484=1,5) foram similares aos observados em MRS, porém o rendimento de bacteriocina neste meio foi bem menor (CTC 204=0,05, CTC 484= 0,08). Maior variação do pH ocorreu em MRS (1,4) que em APT (0,9) e TSB (0,3). O meio Rogosa não suportou o crescimento dessas linhagens, provavelmente devido ao seu pH inicial ser mais baixo (pH=5,5) que os dos demais meios (APT=7,0, MRS=6,2 e TSB=7,1).

As linhagens incluídas no segundo grupo apresentaram velocidade de crescimento (CTC368=0,02, CTC469=0,05, CTC483=0,03) e rendimento em biomassa mais baixos (CTC368=1,7, CTC469=1,2, CTC483=1,3) que os verificadas em APT para as linhagens do primeiro grupo.

Os meios complexos MRS e APT são normalmente utilizados para cultivos bactérias lácticas em geral, o meio de cultura Rogosa é específico para lactobacilos e o TSB um meio usado para bactérias em geral. Os resultados demostraram que as bacteriocinas podem ser produzidas em meios complexos ou não, como por exemplo, a *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, que foi capaz de produzir bacteriocina tanto nos meios MRS e APT quanto no meio TSB. Verificou-se também que, mesmo com tamponamento dos meios com ß-glicerofosfato de sódio (2%), os valores de pH dos meios MRS e APT foram reduzidos durante a fermentação, principalmente o do MRS.

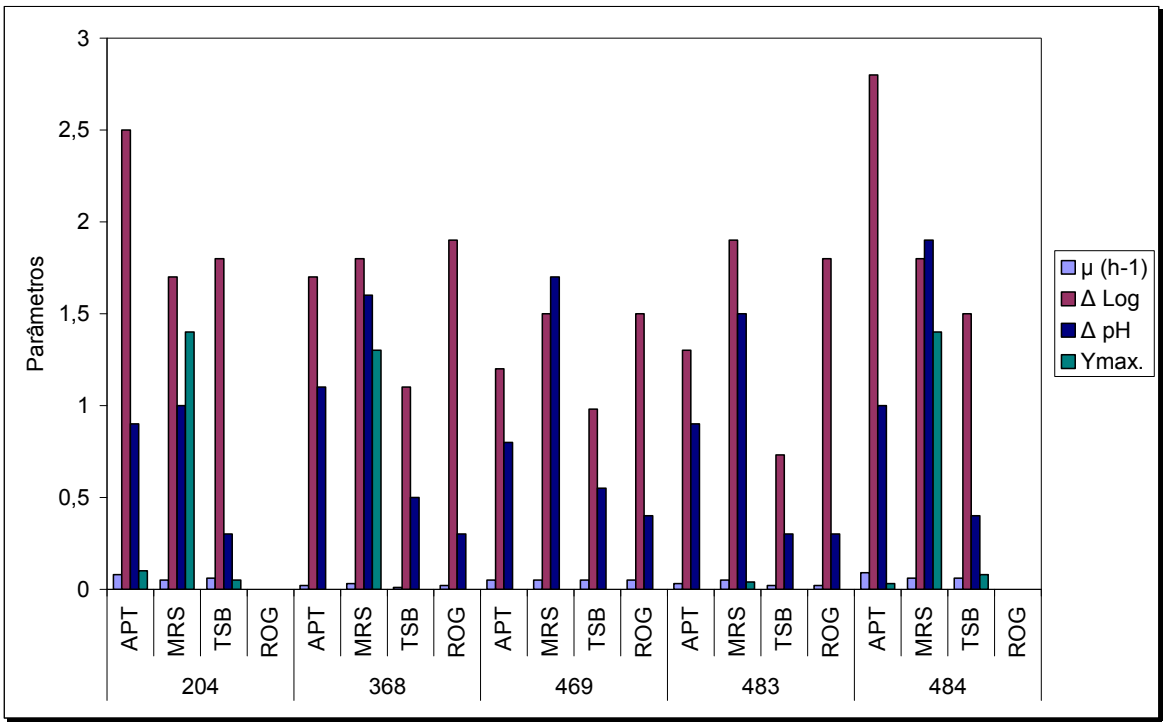


Figura 34 - Indicativo dos parâmetros cinéticos de crescimento (Δ máximo LogUFCmL^{-1}), taxa específica de crescimento bacteriano (μ), acidificação (Δ máximo de pH) e Rendimento máximo de produção de bacteriocinas (Y_{max} em UA.mL^{-1}) pelas linhagens em diferentes meios de cultivo a 37°C

5.4.2 Efeito de fatores limitantes do crescimento: NaCl e nitrito

As Tabelas 7 e 8, e Figuras 35 e 36, apresentam os resultados do crescimento celular, da acidificação e da atividade de bacteriocina produzida pelas linhagens por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 em meio MRS suplementado com diferentes concentrações de NaCl e $NaNO_2$. Não houve variação significativa ($p<0,05$) nas contagens iniciais médias de células viáveis, para ambas as culturas, entre os tratamentos e nem entre as diferentes concentrações de ingredientes adicionados, o que significa que o inóculo inicial da cultura foi o mesmo em todas as situações.

A linhagem CTC204 foi mais resistente ao NaCl que a linhagem CTC484, a suplementação do meio MRS com 1% de NaCl não afetou significativamente o

crescimento da linhagem CTC 204, enquanto concentrações mais elevadas, de 2,0 e 3,0%, promoveram efeito antagônico. Efeitos semelhantes foram observados para esta linhagem nos meios suplementados com $NaNO_2$, neste caso, a suplementação do meio com 0,1% de $NaNO_2$ não afetou significativamente o crescimento da linhagem CTC204, enquanto o aumento da concentração para 0,2% e 0,3% promoveu um efeito deletério mais pronunciado que o observado com o NaCl.

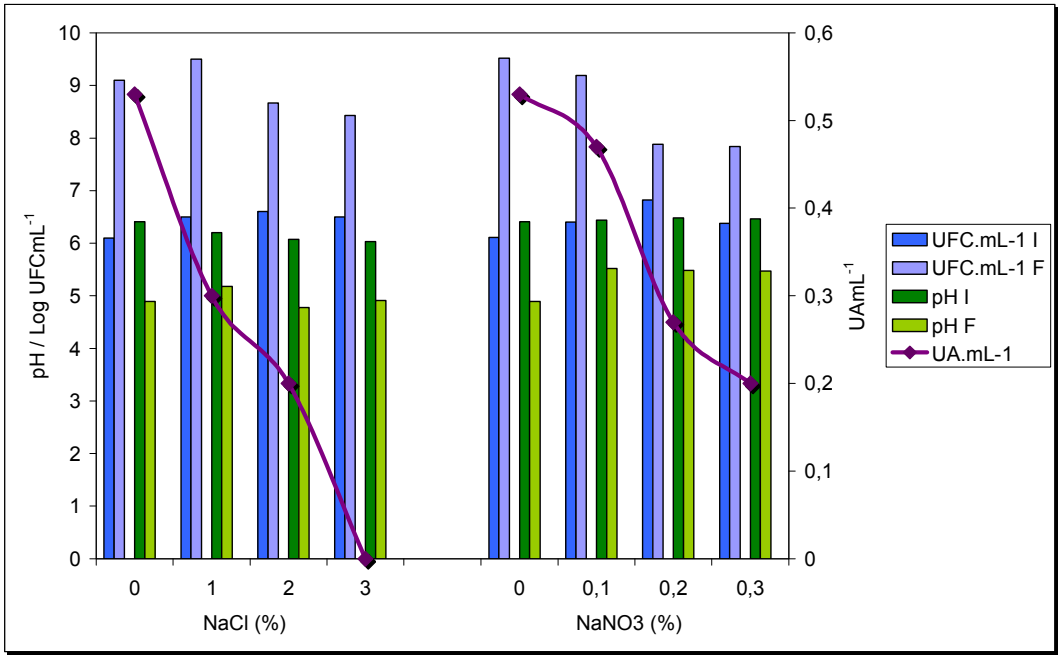
Com relação a linhagem CTC484, diferentemente da linhagem CTC 204, ela foi inibida na menor concentração de NaCl adicionada e $NaNO_2$ teve um efeito mais marcante na inibição do crescimento desta linhagem comparativamente a CTC 204. A produção de bacteriocinas pelas duas linhagens foi inibida na presença de ambos os ingredientes, efeito maior foi observado para o $NaNO_2$. Possivelmente isso ocorreu devido às propriedades bactericidas apresentadas pelo íon Cl^- e nitrito. A inibição do crescimento celular afetou a produção de bacteriocinas, independentemente do valor de pH. Assim, o crescimento celular de CTC 204 não foi afetado em meio MRS suplementado com 1% de NaCl e 0,1% de $NaNO_2$, mas nestas concentrações a produção da bacteriocina foi reduzida, em 42,5% e 17,5%, respectivamente, após fermentação a 37°C por 6 horas, independentemente do valor do pH.

Zamfir e Grosu-Tudor (2009) avaliaram a influência de diferentes concentrações de NaCl (5-30 g/L) adicionadas ao meio MRS no crescimento de *Lb. acidophillus* IBB 801 e produção da acidophilina 801. Eles observaram que esta linhagem foi capaz de crescer em até 30 g/L de sal e que a adição de pequenas quantidades de NaCl (5 g/L) ao meio de cultivo estimulou (quase dobrou) a atividade antimicrobiana da acidofilina 801. Elevadas concentrações de sal inibiram o crescimento celular e produção de bacteriocina. Segundo os autores, a biossíntese de nisina parece ser estimulada sob certas condições de estresse. Uma possível explicação seria que, nestas condições o crescimento bacteriano é muito mais lento o que significa menos energia para crescimento e mais energia disponível para produção de bacteriocina. Em um ecossistema complexo, uma maior produção de bacteriocina sob condições menos favoráveis pode compensar a deficiência de produção de ácido láctico, devido ao menor crescimento bacteriano e pode ajudar a competição da bactéria com outros microrganismos presentes no ambiente (PARENTE et al., 1994).

Tabela 7 - Efeito de diferentes concentrações de NaCl (1%, 2% e 3%) e $NaNO_2$ (0,1%, 0,2% e 0,3%) no crescimento, acidificação e atividade de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em meio de cultivo MRS

Concentração (%)	Contagem de células viáveis (Log $UFCmL^{-1}$)		Valor de pH		Atividade da bacteriocina ($UAmL^{-1}$)**
	Inicial*	Final*	Inicial*	Final*	
NaCl					
0,0	6,1a	9,10 ab	6,41 a	4,89 a	0,53
1,0	6,5 a	9,50 a	6,20 b	5,18 a	0,30
2,0	6,6 a	8,67 bc	6,07 c	4,78 a	0,20
3,0	6,5 a	8,43 c	6,03 d	4,91 a	0,00
$NaNO_2$					
0,0	6,11 a	9,52 a	6,41 a	4,89 a	0,53
0,1	6,40 a	9,19 a	6,44 ab	5,52 b	0,47
0,2	6,82 a	7,88 b	6,48 b	5,48 b	0,27
0,3	6,38 a	7,84 b	6,46 ab	5,47 b	0,20

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância.** Cultura sensível utilizada: B. cereus



I= Inicial F= Final

Figura 35 - Efeito de diferentes concentrações de NaCl (1%, 2% e 3%) no crescimento e produção de ácido láctico e de bacteriocina por *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em MRS

Tabela 8 - Efeito de diferentes concentrações de NaO_2 (1%, 2% e 3%) e $NaNO_2$ (0,1%, 0,2% e 0,3%) no crescimento, acidificação e produção de bacteriocina por *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 em meio de cultivo APT

Concentração (%)	Contagem de células viáveis Log ($UFCmL^{-1}$)		Valor de pH		Atividade da bacteriocina ($UAmL^{-1}$)**
	Inicial*	Final*	Inicial*	Final*	
NaCl					
0,0	6,94a	8,76a	6,97a	6,17a	0,4
1,0	6,86a	8,25b	6,88a	5,98b	0,4
2,0	6,92a	8,19b	6,79a	6,08c	0,2
3,0	6,78a	7,44c	6,86a	6,51d	0,0
$NaNO_2$					
0,0	6,94a	8,76a	6,97a	6,17a	0,4
0,1	7,02a	2,16b	7,15a	6,62b	0,2
0,2	7,17a	1,27b	7,24a	6,90b	0,2
0,3	7,09a	1,22b	7,09a	6,85b	0,4

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância. ** Cultura sensível utilizada: B. cereus

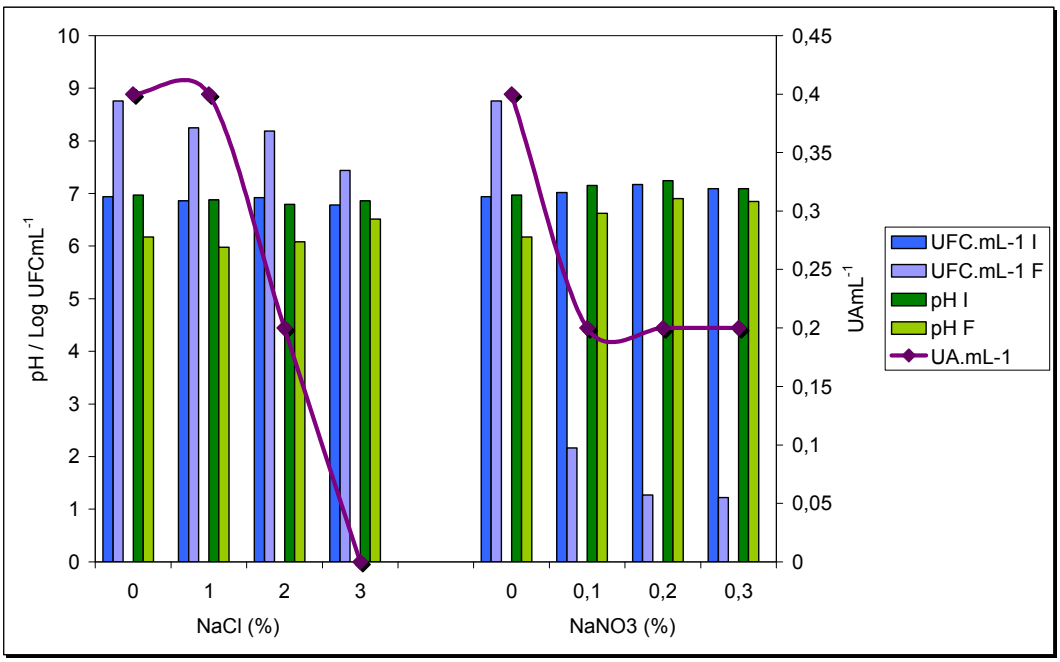


Figura 36 - Efeito de diferentes concentrações de $NaNO_2$ (0,1%;0,2% e 0,3%) no crescimento e produção de ácido láctico e de bacteriocina por *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 em MRS

5.5 Purificação parcial das bacteriocinas

5.5.1 Parâmetros cinéticos de produção de bacteriocina

As Figuras 37, 38, 39, 40 e 41 apresentam, respectivamente, a população final, (UFC e DO) e produção de bacteriocinas em meio MRS a 37ºC durante 12 horas, e após as etapas de extração das moléculas aderidas às células (E), de concentração com sulfato de amônio 80% (C) e de purificação em membrana de 3 KDa (P). Para as linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 (Figuras 37 e 41) a produção de bacteriocina foi associada ao crescimento celular, a atividade foi detectada após 4 horas e ocorreu junto com a fase de crescimento destas linhagens, mas oscilações de atividade foram verificadas até 8 horas para *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e 12 horas para *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 quando foram obtidos os maiores valores. Para as linhagens *L. plantarum* CTC 368 e *E. avium* CTC 483 (Figuras 38 e 40), a atividade foi detectada somente com 10 e 12 horas, respectivamente. Nenhuma atividade de bacteriocina foi detectada para a *E. avium* CTC 469 (Figura 39).

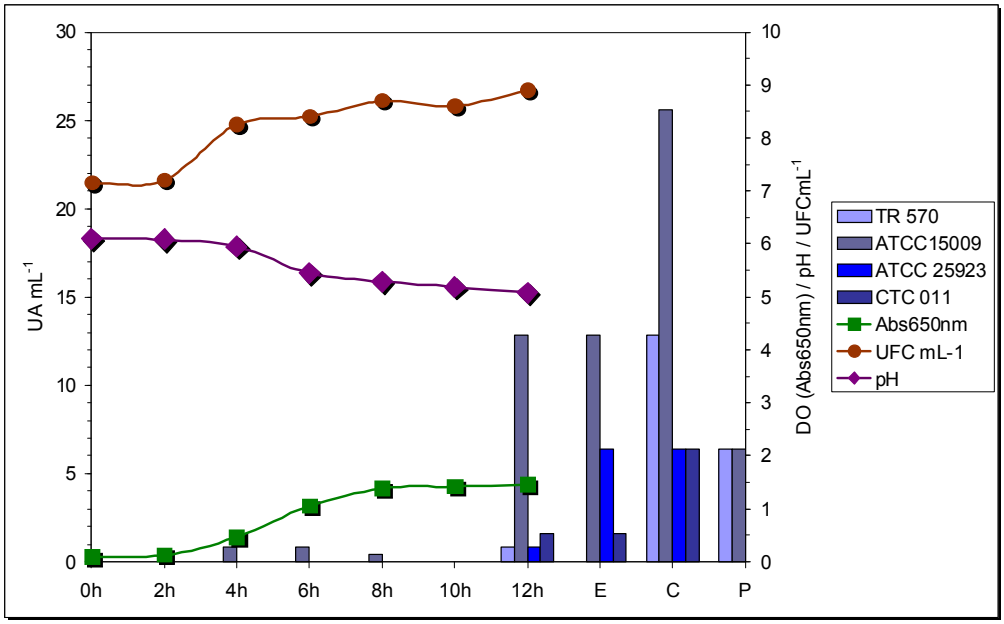


Figura 37 - Produção de bacteriocina em MRS, *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204

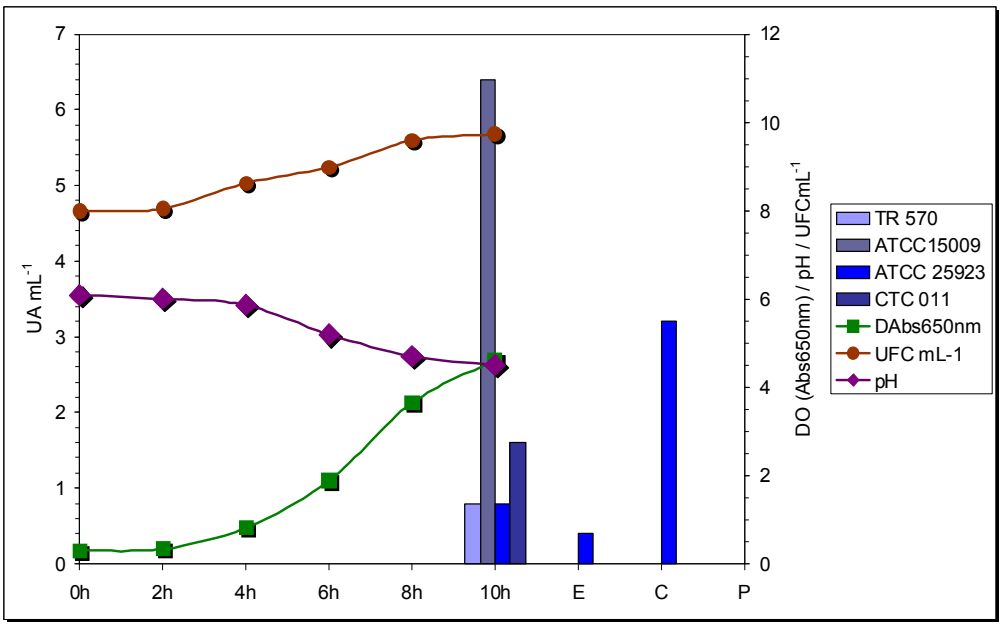


Figura 38 - Produção de bacteriocina em MRS, *L. plantarum* CTC 368

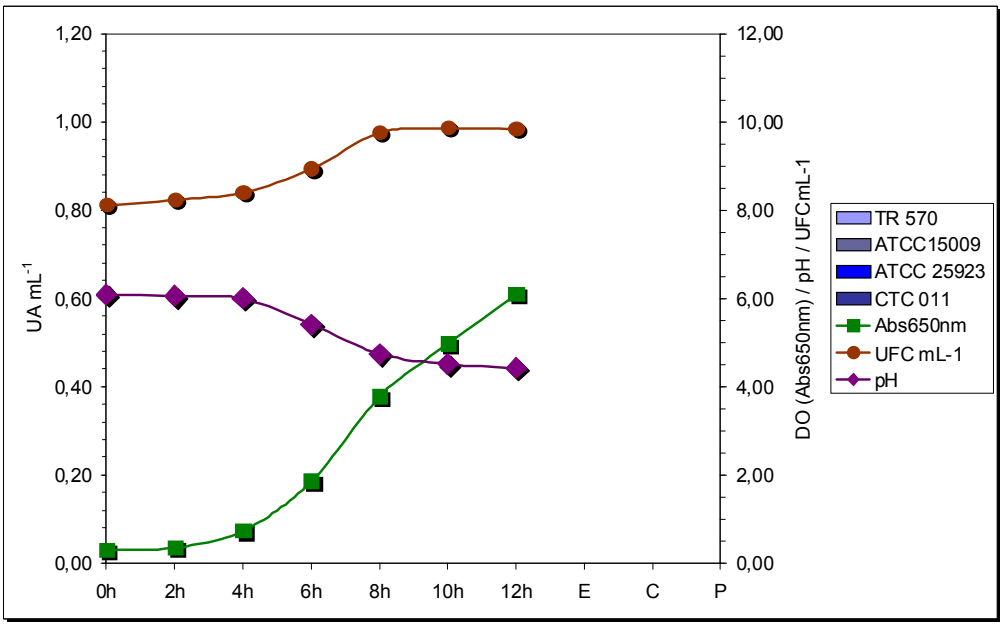


Figura 39 - Produção de bacteriocina em MRS, *E. avium* CTC 469

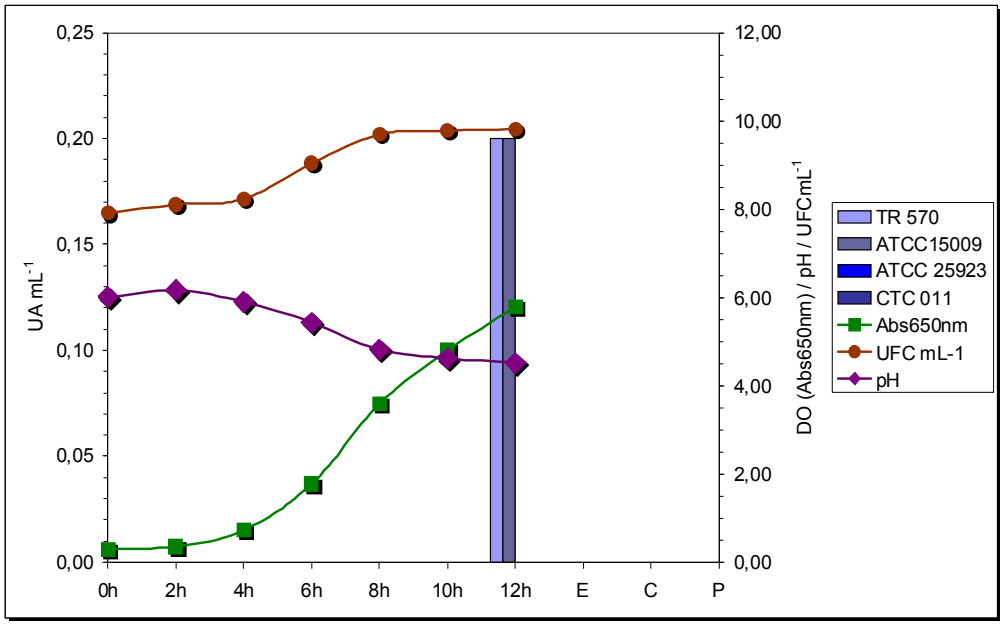


Figura 40 - Produção de bacteriocina em MRS, *E. avium* CTC 483

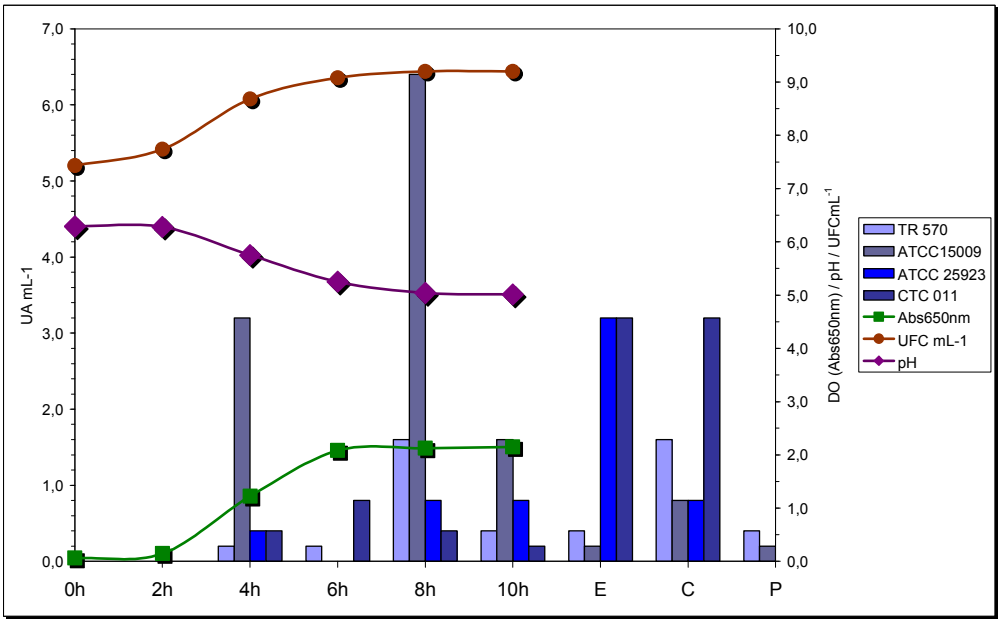


Figura 41 - Produção de bacteriocina em MRS, *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484

A avaliação dos parâmetros cinéticos de crescimento (Figura 42) revelou que *L. plantarum* CTC 368 apresentou velocidade de crescimento menor (0,03 h^{-1}) que as demais linhagens (CTC204=0,05, CTC469=0,05, CTC483=0,05, CTC484=0,06), porém o rendimento de biomassa dessa linhagem (1,8) foi similar ao das demais (CTC 204=1,7, CTC 469=1,6, CTC483=1,9, CTC484=1,8). Já o rendimento da produção de bacteriocina (Ymax) foi similar entre todas as linhagens produtoras de bacteriocinas; *E. avium* CTC 469 apresentou a menor formação de biomassa e não produziu bacteriocinas.

Com relação à acidificação, a variação do pH do meio MRS durante a fermentação foi de 1,0, 1,6, 1,7, 1,5 e 1,9 para as linhagens CTC 204, CTC 368, CTC 469, CTC 483 e CTC 484, respectivamente. Entre as linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, maior variação de pH foi encontrada para a *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 que apresentou rendimento de produção de bacteriocina similar ao da *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 (Figuras 38).

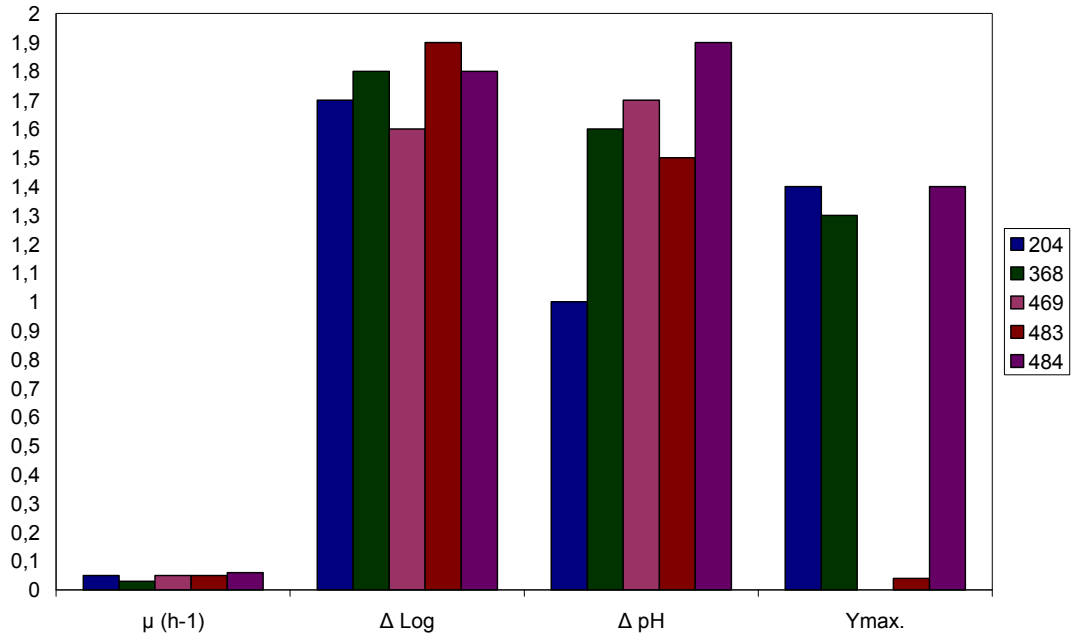


Figura 41 - Indicativo dos parâmetros de crescimento (Δ $LogUFCmL^{-1}$), taxa específica de crescimento bacteriano (μ), acidificação (Δ pH) e rendimento máximo de produção de bacteriocinas (Y_{max} em $UA.mL^{-1}$) pelas linhagens em MRS a 37°C/12horas

5.5.2 Extração das bacteriocinas aderidas às células produtoras

Os dados apresentados na Figura 43 mostram atividade de 1,6 e 6,4 $UAmL^{-1}$ e de 0,2 e 3,2 $UAmL^{-1}$ para as baceriocinas extraídas das linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, respectivamente, e de 0,4 $UAmL^{-1}$ para *L. plantarum* CTC 368. Nenhuma atividade foi observada para as linhagem *Enterococcus avium* CTC 469 e baixa atividade foi encontrada para a *Enterococcus avium* CTC 483. As bacteriocinas podem ser produzidas extracelularmente ou permanecerem adsorvidas às células produtoras (HURST apud SKINNER, 1978). Esta característica pode depender do pH do meio, adsorção máxima foi verificada a pH 5,5-6,5 e esta adsorção diminuiu a baixos valores de pH (YANG et al., 1992).

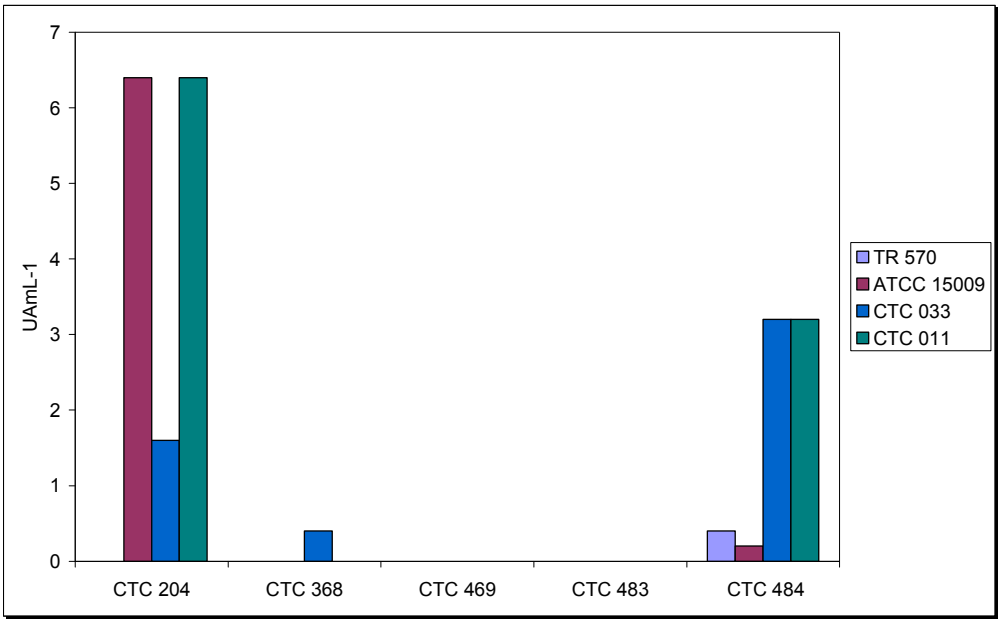


Figura 43 - Atividade das bacteriocinas aderidas às células produtoras (adsorvidas)

Durante o crescimento das linhagens, nenhuma atividade de bacteriocina foi verificada para CTC 469, enquanto que somente 0,2 $UAmL^{-1}$ foi detectada para CTC 483 após 24 horas do crescimento de seu crescimento, porém esta atividade foi perdida nas etapas subseqüentes de extração e concentração de bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas por CTC204 e CTC484 apresentaram estabilidade aos tratamentos empregados e, entre estas duas linhagens, maior atividade de bacteriocina foi apresentada por CTC 204, em todas as etapas avaliadas.

Considerando os valores médios de atividade das bacteriocinas, as atividades dos sobrenadantes das linhagens CTC 204 e CTC 484 variaram, respectivamente, de 4,0 e 0,75 $UAmL^{-1}$ após crescimento das linhagens, de 5,2 e 1,75 $UAmL^{-1}$ após a etapa extração, de 12,8 e 1,6 $UAmL^{-1}$ após concentração e de 6,4 e 0,35 $UAmL^{-1}$ após purificação. Portanto, foi verificado aumento de 30% da atividade da bacteriocina CTC 204 após sua extração a partir das células e de 146% após concentração e uma redução de atividade de 50% após sua purificação. Para a bacteriocina CTC 484 foi detectado um aumento de 133% após sua extração a partir das células produtoras, mas reduções de 8,6% e 78% foram detectadas após as etapas de concentração e purificação, respectivamente. As concentrações de proteínas foram as seguintes: CTC 204=106,56 μgmL^{-1}, CTC368= 82,53 μgmL^{-1}, CTC469= 113,02 μgmL^{-1}, CTC 483= 65,22 μgmL^{-1} e CTC 484= 11,73 μgmL^{-1}. Portanto, as atividades específicas das bacteriocinas CTC 204 e CTC 484 são 0,06 UA μgmL^{-1} e 0,03 UAμgmL^{-1}, respectivamente.

5.5.3 Espectro de atividade das bacteriocinas cruas e purificadas

Os espectros de atividade ($UAmL^{-1}$) das bacteriocinas pré-purificadas sobre microrganismos patogênicos são apresentados na Tabela 9**.** A bacteriocina da *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 inibiu 77% das linhagens e as demais inibiram somente 23% (*Lactobacillus plantarum* CTC 368) e 46% (*Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484), enquanto a bacteriocina *Lactobacillus plantarum* ALC 01 inibiu 38% delas. A atividade inibitória variou de acordo com a concentração protéica, bacteriocina e linhagem sensível, de 1,6 e 12,8 $UAmL^{-1}$ para *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, de 0,4e 0,8

$UAmL^{-1}$ para *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484, de 1,6 e 3,2 $UAmL^{-1}$ para *Lactobacillus plantarum* ALC 01, enquanto para *Lactobacillus plantarum* CTC 368 a atividade foi de 0,8 $UAmL^{-1}$ para as 3 linhagens indicadoras de *Listeria* sp.

Os espectros de atividade ($UAmL^{-1}$) das soluções padronizadas em concentração de proteínas das bacteriocinas pré-purificadas sobre alguns microrganismos patogênicos são apresentados na Tabela 9. A diluição das bacteriocinas na faixa de concentração em proteína de 11 e 13 μgmL^{-1} diminuiu as atividades inibitórias das bacteriocinas contra as bactérias avaliadas e mostrou que todas as bacteriocinas apresentam atividade inibitória similar, de 0,2 e 1,6 μgmL^{-1}.

A verificação do espectro antimicrobiano de ação das bactérias lácticas avaliadas teve como finalidade conhecer o potencial antagonista das bacteriocinas. Esta característica é importante para se verificar a possível utilização destas bactérias e/ou bacteriocinas no controle de patógenos e deteriorantes em alimentos. Por este motivo, observa-se crescente interesse da indústria de alimentos sobre o potencial de utilização destes compostos em substituição aos conservantes químicos. Os resultados mostraram que estas substâncias antimicrobianas apresentam características de interesse, uma vez que apresentam atividade contra microrganismos patogênicos importantes como *L. monocytogenes, S. aureus* e *B. cereus*.

Observou-se que o espectro de atividade variou entre as linhagens. As culturas *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactobacillus plantarum* CTC 368 apresentaram resultados interessantes: a primeira apresentou atividade de bacteriocina (obtida do sobrenadante neutralizado e tratado a 95°C por 5 minutos) restrita às bactérias patogênicas, como *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*, ao passo que, o *Lb. plantarum* CTC 368 produz uma bacteriocina de amplo espectro de ação, que inibiu 95% das culturas indicadoras em crescimento associativo (tabela 8). Padronizando-se a concentração de proteínas obtidas pela concentração das bacteriocinas produzidas (Tabela 9), verifica-se que a linhagem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 manteve seu espectro de inibição para as culturas indicadoras patogênicas, sendo este, mais amplo do que o espectro obtido pela linhagem *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484.

Tabela 9 - Espectro de atividade ($UAmL^{-1}$) do sobrenadante, da bacteriocina purificada e da bacteriocina purificada diluída para a mesma concentração de proteína, das linhagens *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484

Linhagens	**Sobrenadante**		**Bacteriocina purificada**		**Bacteriocina purificada diluída[1]**	
	CTC204	**CTC484**	**CTC204**	**CTC484**	**CTC204**	**CTC484**
Streptococcus salivarius TR 570	1,6	0,2	3,2	0,0	0,2	0,0
Lactobacillus helveticus ATCC15009	6,4	0,8	1,6	0,0	0,2	0,0
Staphylococcus. aureus IAL1602	0,8	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4
Bacillus cereus ATCC14579	0,8	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Listeria innocua (CCQA)	0,2	0,0	3,2	0,8	0,4	0,8
Listeria monocytogenes (isolada de salmoura)	0,8	0,4	12,8	0,4	0,8	0,4
Listeria monocytogenes ATCC7644	1,6	1,6	12,8	0,8	1,6	1,6
Listeria monocytogenes (isolada estrado CF)	0,8	0,4	6,4	0,8	0,4	0,4
Listeria monocytogenes (isolada de alface)	0,8	0,4	12,8	0,8	0,8	1,6

[1] Concentrações de proteínas: CTC 204=106,6μgmL^{-1} e CTC 484=11,7μgmL^{-1}.

5.5.4 Espectro de atividade dos sobrenadantes bacteriocinas pré-purificadas

Os espectros de atividade ($UAmL^{-1}$) das bacteriocinas cruas, pré-purificadas (com concentração de proteína de 106,6μgmL^{-1} e 11,7μgmL^{-1}, para as linhagens CTC 204 e CTC 484, respectivamente, e destas diluídas na nesma concentração protéica são apresentados na Tabela 9. A bacteriocina CTC204 inibiu 77% das linhagens e as demais inibiram somente 23% (CTC368) e 46% (CTC484), enquanto a bacteriocina

ALC01 inibiu 38% delas. A atividade inibitória variou de acordo com a concentração protéica, bacteriocina e linhagem sensível, de 1,6 e 12,8 $UAmL^{-1}$ para CTC204, de 0,4e 0,8 $UAmL^{-1}$ para CTC484, de 1,6 e 3,2 $UAmL^{-1}$ para ALC01, enquanto para CTC368 a atividade foi de 0,8 $UAmL^{-1}$ para as 3 linhagens sensíveis de *Listeria* sp. A diluição das bacteriocinas na faixa de concentração em proteína de 11 e 13 μgmL^{-1} diminuiu as atividades inibitórias das bacteriocinas contra as bactérias avaliadas e mostrou que todas as bacteriocinas apresentam atividade inibitória similar, de 0,2 e 1,6 μgmL^{-1}.

6 CONCLUSÕES

As cinco linhagens de bactérias lácticas avaliadas neste estudo não possuem determinantes de patogenicidade relacionados com as enzimas termonucleases, hemolisinas e gelatinases e mostraram excelente sobrevivência tanto a baixos valores de pH, quanto às concentrações de sais biliares indicando potencial probiótico. Com relação ao espectro de inibição, essas linhagens apresentaram atividade direcionada a diferentes gêneros e espécies de microrganismos patogênicos e deterioradores. Essa característica variou de acordo com a susceptibilidade da linhagem sensível, atividade da bacteriocina, presença de células produtoras e procedimentos de extração.

As cinco linhagens de bactérias lácticas apresentaram características de crescimento e produção de bacteriocinas semelhantes. A atividade de bacteriocina aumentou e alcançou o máximo no final da fase exponencial de crescimento, correspondendo à maior biomassa formada (cinética de metabólito primário). Dentre os meios de culturas avaliados, o APT proporcionou crescimento mais rápido e maior rendimento de biomassa que o meio MRS, porém neste meio foram obtidas as maiores concentrações de bacteriocinas. Em meio simples como o TSB, o crescimento e rendimento de biomassa foi similar aos obtidos em MRS, porém com menor rendimento de bacteriocina.

As bacteriocinas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 promoveram um efeito bactericida às células de *Staphylococcus aureus* em fase exponencial de crescimento.

A suplementação do meio MRS com 1% de NaCl e 0,1% de $NaNO_2$ não afetou o crescimento de *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204, mas a atividade da bacteriocina foi reduzida em 42,5% e 17,5%, respectivamente. O crescimento de *L. lactis* subsp. *hordinae* CTC484 foi inibido nessas condições, com reflexo direto na produção da bacteriocina. As bacteriocinas dessas linhagens foram as únicas que apresentaram estabilidade aos procedimentos de pré-purificação e seus pesos moleculares foram estimados em ≤ 3,0 KDa. Sendo assim, as linhagens *L. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 e *Lactococcus lactis* subsp. *hordinae* CTC484 apresentam propriedades para utilização como bioconservantes em alimentos, no entanto, estudos mais

aprofundados, relacionados com a purificação dessas bacteriocinas e avaliação de seu uso em alimentos, devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, M.; COLINS, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 95-107, Aug. 1993.

ANANOU, S.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 6, p.1364–1372, Dec. 2005.

BENKERROUM, N.; OUABEL, H.; MIMOUM, L.B. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. **Journal of Food Protection,** Ames, v. 65, n. 5, p. 799-802, May 2002.

BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E.; TATAQUI-ELARAKI, A. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 78-81, Aug. 1993.

BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Direct detection of an antimicrobial peptide of Pediococcus acidilactici in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.**Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 319-322, 1987.

BRASIL. Portaria n. 1004, de 11de dezembro de 1998. Brasília: Ministério da Saúde, 1999.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1/2, p. 137-144, Jan./June 2004.

BUCHMAN, W.B.; BANERJEE, S.; HANSEN, J.N. Structure, expression, and evolution of a gene enconding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. **Journal of Biology and Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 5, p. 16260-16266, Feb.1988.

CABO, M.L.; MURADO, M.A.; GONZ´ALEZ, M.P.; PASTORIZA, L. Effects of aeration and pH gradient on nisin production. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 29, n. 4/5, p. 264-273, Sept. 2001.

CANHOS, A.L.; DIAS, E.L. **Tecnologia de carne bovina e produtos derivados**. Campinas: ITAL, 1985. 440 p.

CHUNG, K.T.; DICKSON, J.S.; CROUSE, J.D. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 55, n. 6, p. 1329-1333, June 1989.

CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: bacteriocin of lactic acid bacteria. **Food Science Technology International**, London, v. 7, n. 4, p. 281-305, Aug. 2001.

CONVENTRY, M.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B.E.; HICKEY, M.W. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocina and nisin. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 246-258, July 1997.

DEGNAN, A.J.; BUYONG, N.; LUCHANSKY, J.B. Antilisterial activity of pediocin AcH model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within lipossomes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 127-138, Apr. 1993.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 43, n. 3, p. 73-76, Aug. 1990.

DE MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamentos de produtos cárneos fermentados**. 2005. 210 p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DE VUYST, L. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* spp.*lactis* strains. **Biotechnology Letters**, Kew**,** v. 16, n. 2, p. 287-292, Feb.1994.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis subsp. lactis* batch fermentations. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 138, p. 571–578, Dec.1992.

_____. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis and applications. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E. (Ed.). **Bacteriocins of lactic acid bacteria:** microbiology, genetics and applications. London: Blackie Academic and Professional, 1994. p. 151-221.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L.M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, June 2006.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, Apr. 2001.

ECKNER, K.F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food and Environmental Sanitation,** Ames, v. 12, n. 4, p. 204-209, 1992**.**

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Journal of Meat Science**, Barking, v. 55, n. 3, p. 297-300, July 2000.

FAO/WHO. **Report of a joint FAO/WH:** expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34 p.

_____. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London, 2002. 50 p.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; DALHUS, B.; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class Iia bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, struture and mode of action. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 688-696, Nov. 2005

FRAZER, A.C.; SHARRATT, M.; HICKMAN, J.R. The biological effects of food additives. I. Nisin. **Journal of Science and Food of Agriculture**, Ames, v. 13, p. 32-42, 1962.

GARNEAU, S.; MARTIN, N.I.; VEDERAS, J.C. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5/6, p. 577-592, May/June 2002.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 49, n. 2 p. 377-381, Feb.1985.

GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 52, n. 3, p. 665-671, Aug. 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.

HARRIGAN, W.F.; MCCANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**, London: Academic Press, 1998. 452 p.

HERNANDEZ, P.E.; RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; MOREIRA, W.L. SOBRINO, O.J.; FERNANDEZ, M.F.; SANZ, B. Utilizacion de bactérias lacticas en el control de micorganismos patogenos de los alimentos. **Microbiologia SEM,** Madrid, v. 9, n. 3, p. 37-48, 1993.

HILL, M.J. Factors controlling the microflora of the health upper gastrointestinal tract. In: HILL, M.J.; MARSH, P.D. (Ed.). **Human microbial ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 57–85.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzimes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 3 p. 343-362, Jan. 1995.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUISINTVELD, J.H. Overwiew of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-101, May 1998.

HUGAS, M.; MONFORT, J.M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, Barking, v. 59, n. 4, p. 547-554, Aug. 1997.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; PASCUAL, M.; AYMERICHAND, M.T.; MONFORT, J.M. Enhancement of sakacin K activity against Listeriamonocytogenes in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 519-528, Oct. 2002.

HURST, A. Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. In: SKINNER, F.A.; QUESNEL, L.B. (Ed.). **Streptococci**. New York: Academic Press, 1978. p. 297-314.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, p. 465S-470S, Oct. 2001.

KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against Listeria monocytogenes Scott A cells and lipid vesicles. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 12, p. 4529-4535, Dec.1996.

KAWAI, Y.; ISHII, Y.; ARAKAWA, K.; UEMURA, K.; SAITOH, B.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; YAMAZAKI, Y.; TATENO,Y.; ITOH, T.; SAITO, T. structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, n. 5, p. 2906-2911, May 2004.

KIM, W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 449-453, May 1997.

KLAENHAMMER, T.D. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, Paris, v. 70, n. 3 p. 337-349, Mar. 1988.

KLEEREBEZEM, M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. **Peptides**, New York, v. 25, n. 9, p. 1405-1414, Sept. 2004.

KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L.E. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. **Peptides**, New York, v. 22, n. 10, p. 1579-1596, Oct. 2001.

KOLE, M.; ALTOSAAR, I. Bovine bile resistance increases *Leuconostoc oenos* 44.40 viability upon lyophilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 47, n. 5, p. 1150-1153, May1984.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DESTAIN, J.; DUBOIS DAUPHIN, R.; EVRARD, P; THONART, P. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of Listeria monocytogenes by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. **Food Microbiology,** London, v. 26, n. 6, p. 623-628, Sept. 2009

LAI, A.C. TRAN, S.; SIMMONDS, R.S. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 215, n. 1, p. 133-138, Sept. 2002.

LEAL-SÁNCHEZ, M.V.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; MALDONADO-BARRAGÁN, A.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; RUIZ-BARBA, J.L. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 9, p. 4465-4471, Sept. 2002.

LEROY, F.; DE VUYST L. The presence of salt and a curingagent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potencial starter culture for sausage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 12, p. 5350-5356, Dec. 1999.

LIU, W.; HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, n. 9, p. 2551-2558, Sept. 1990.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits Listeria monocytogenes in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, n. 3, p. 1854-1857, Mar. 2003.

MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J.M.M.; SORRIBES, C.H.; GEA, A.M.S.; GOMEZ, J.M.G. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 1: Definición, classificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, Madrid, v. 37, p. 59-66, 2000.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E.H.; METAXOPOULOUS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 259-265, June 2003.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, C.W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, New York, v. 7, n. 1, p. 316-422, 1972.

McMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potential for use bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protection,** Ames, v. 59, p. 64-71, 1996. Supplement.

MEGHRIUS, J.; EULOGE, P.; JUNELLES, A.M.; BALLONGUE, J.; PETITDEMANGE, H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 12, p. 575-580, Dec. 1991.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 8, p. 99–110, 2002.

MILLETTE, M.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. antimicrobial potential of immobilized Lactococcus lactis lactis ATCC 11454 against selected bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 6, p. 1184-1189, June 2004.

MISHRA, V.; PRASAD, D.N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casein* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 109-115, Aug. 2005.

MOLL, G.N.; KONING, W.N.; DRIESSEN, A.J. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 185-191, Feb. 1999.

MUNDT, O. Genus *Streptococcus*. In: SEMATH, P.H.A. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Willians; Walkins, 1986. v. 2, p. 1071-1075.

MURIANA, P.M. Bacteriocins forcontrol of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p. 54-63, 1996. Supplement.

NASCIMENTO, M.; MORENO, I.; KUAYE, A. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun. 2008.

NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 44-51, Jan. 2000.

NES, I.F.; DIEP, D.B.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 70, n. 1/2, p. 113-128, Feb. 1996.

NOH, D.O.; GILLILAND, S.E. Influence of bile on cellular integrity and ß-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 76, n. 5, p. 1253-1259, May 1993.

O'SULLIVAN, G.C.; KELLY, P.; O'HALLORAN, S.; COLLINS, J.K.; DUNNE, C.; SHANAHAM, F. Probiotics: an emerging therapy. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 11, p. 3-10, 2005.

PARENTE, E.; RICCIARD, A. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. l*actis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology,** Berlin, v. 41, n. 4, p. 388-394, June 1994.

PELCZAR, J.R.: MICHAEL, J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron, 2005. v. 1, 1072 p.

QUADRI, L.E.N. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht. v. 82, n. 1/4, p. 133-145, Aug. 2002.

RAY, B. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **ASM News**, Ann Arbor, v. 59, n. 6, p. 285-291, 1993.

REQUENA, T.; PELAEZ, C. Revision: actividad antimicobiana de bacterias lacticas. Produccion de bacteriocinas. **Revista Española de Ciencia y Tecnologia de Alimentos**, Valência, v. 35, n. 1, p. 19-44, 1995.

RILLA, N.; MARTINEZ, B.; RODRIGUEZ A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 5, p. 928-933, May 2004.

ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 79, n. 1/2, p. 3–16, Nov. 2002

SALMINEN, M.K.; RAUTELIN, H.; TYNKKYNEN, S.; POUSSA, T.; SAXELIN, M.; VALTONEN, V.; JÄRVINEN, A. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 35-44, Jan. 2006.

SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: MarcelDecker, 1993. 442 p.

SANDERS, M.E. Probiotics. **Food Technology**, Champaing, v. 53, n. 11, p. 67-77, Nov. 1999.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 93-105, May 2002.

SCHILLINGER, U. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In: BILLS, D.D.; KUNG, S. (Ed.). **Biotechnology and food safety**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. p. 55-74.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 21, n. 5, p. 943, May 1971.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, n. 3, p. 722-756, Sept. 1976.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 233-244, June 2003.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Carne e produtos cárnicos:** tecnologia química y microbiologia. Zaragoza: Acribia, 1998. 289 p.

VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E., LOONEY, R.; O'ROURKE', N.; COVENEYL, H.; DALY, C.; FITZGERALD, G. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 118-123, Feb. 1994

WIJAYA, A. **Investigation into the influence of a bacteriocin-producing *Enterococcus* strain on the intestinal microflora**. 2003. 131 p. Dissertation (Doktors der Naturwissenschaften) – Universität Karlsruhe, Palembang, 2003.

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W.C.; C´AMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 362, p. 1119-1134, July 2007.

YANG, M. JONSHON, C.J.; RAY, B Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v. 58, n. 10, p. 3355-3359, Oct. 1992.

YEZZI, T.L.; AJAO, A.B.; ZOTOLLA, E.A. Increased nisin in cheddar-type cheese prepared with pH control of the bulke starter cultures system. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 76, n. 10, p. 2827-2831, Oct. 1993.

ANEXOS

ANEXO A

Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por ***Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204** isolado de moela de frango *in natura* em diferentes meios de cultivo.

Tempo (horas)	Meios[1]	DO 650nm	Log UFC.mL^{-1}	pH	Atividade (UA.mL^{-1}) TR 570[2]	LH ATCC 15009[3]	CTC 033[4]	CTC 011[5]	Lin 11[6]
0	APT	0,102	7,0	6,92	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,087	7,1	6,10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,031	6,9	7,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,024	7,0	5,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	APT	0,174	7,6	6,85	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,122	7,2	6,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,316	7,5	6,84	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,024	7,0	5,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	APT	1,226	9,0	6,22	0,8	0,8	1,6	0,8	0,0
	MRS	0,461	8,3	5,95	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,877	8,4	6,72	0,4	0,4	0,4	0,0	0,0
	ROG	0,029	6,0	5,39	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	APT	0,777	9,0	6,03	0,8	0,8	1,6	0,8	0,00
	MRS	1,047	8,4	5,45	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,830	8,4	6,69	0,4	0,2	0,2	0,4	0,0
	ROG	0,031	5,1	5,46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	APT	0,735	9,3	6,03	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	MRS	1,384	8,7	5,29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,892	6,0	6,69	0,2	0,0	0,2	0,4	0,0
	ROG	0,04	9,1	5,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	APT	0,762	9,2	6,05	0,8	0,4	0,4	0,8	0,0
	MRS	1,422	8,6	5,19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,858	8,4	6,69	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
	ROG	0,05	6,9	5,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	APT	0,720	9,5	6,04	0,0	0,2	0,8	0,0	0,0
	MRS	1,452	8,9	5,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,874	8,5	6,70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,04	7,4	5,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	APT	1,136	9,4	6,14	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
	MRS	1,392	8,8	4,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,788	8,7	6,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,05	7,0	5,56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] pH dos meios de cultivo: APT: 6,93; MRS: TSB: 6,92; ROG: 5,51. [2]*Streptococcus salivarius* ssp. TR 570, Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínio. [3]*Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. [4] *Staphylococcus aureus* CTC 033, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [5]*Bacillus cereus* CTC 011, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [6] *Listeria innocua* Lin 11 (INRA), INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France

ANEXO B

Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por ***Lactobacillus plantarum*** **CTC 368** isolado de lingüiça de javali *in natura* em diferentes meios de cultivo.

Tempo (horas)	Meios[1]	DO 650nm	Log UFC.mL^{-1}	pH	Atividade (UA.mL^{-1}) TR 570[2]	LH ATCC 15009[3]	CTC 033[4]	CTC 011[5]	Lin 11[6]
0	APT	0,159	8,0	6,90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,289	8,0	6,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,060	7,9	7,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,139	7,7	5,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	APT	0,201	7,9	6,93	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,337	8,0	6,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,223	7,9	6,93	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,169	7,8	5,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	APT	0,425	8,0	6,81	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,818	8,6	5,86	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,399	9,0	6,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,318	8,1	5,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	APT	1,092	8,5	6,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	1,886	9,0	5,19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,916	8,4	6,63	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,651	8,3	5,35	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	APT	3,087	9,2	5,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	3,648	8,6	4,70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	1,034	8,7	6,55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	1,113	8,9	5,28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	APT	2,965	9,3	5,81	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	4,614	9,7	4,50	1,6	12,8	1,6	3,2	0,0
	TSB	1,052	7,7	6,55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	1,866	8,9	5,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	APT	2,755	9,4	5,81	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	5,200	9,7	4,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	1,044	8,6	6,47	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	2,424	9,4	5,07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	APT	2,360	9,3	5,84	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	3,035	9,5	4,47	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,980	9,0	6,57	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	5,862	9,7	4,62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] pH do meio de cultivo: APT:7,02; MRS: ; TSB:7,11; ROG:5,48. [2]*Streptococcus salivarius* ssp. TR 570, Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínio. [3]*Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. [4] *Staphylococcus aureus* CTC 033, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [5]*Bacillus cereus* CTC 011, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [6] *Listeria innocua* Lin 11 (INRA), INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France

ANEXO C

Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas e produção de bacteriocinas por ***Enterococcus avium*** **CTC 469** isolado de carne de frango mecanicamente separada (CFMS) *in natura* em diferentes meios de cultivo.

Tempo (horas)	Meios[1]	DO 650nm	Log UFC.mL^{-1}	pH	Atividade (UA.mL^{-1}) TR 570[2]	LH ATCC 15009[3]	CTC 033[4]	CTC 011[5]	Lin 11[6]
0	APT	0,137	8,0	6,80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,284	8,1	6,09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,155	7,9	7,04	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,126	7,8	5,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	APT	0,198	7,9	6,76	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,346	8,2	6,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,197	7,7	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,164	7,7	5,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	APT	0,464	8,0	6,71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,724	8,4	6,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,373	7,9	6,91	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,275	7,8	5,43	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	APT	1,196	8,8	6,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	1,854	8,9	5,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,804	8,6	6,68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,534	8,6	5,40	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	APT	2,127	9,1	6,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	3,772	9,7	4,74	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,978	8,2	6,63	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,907	8,5	5,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	APT	1,878	9,0	6,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	4,336	9,9	4,51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,933	8,7	6,63	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	1,608	9,0	5,24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	APT	1,820	7,0	6,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	6,084	9,8	4,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,924	8,9	6,58	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	2,400	9,3	5,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	APT	1,488	9,1	6,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	6,447	9,7	4,42	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,858	8,6	6,49	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	6,294	9,4	4,68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] pH do meio de cultivo: APT: 6,87; MRS: ; TSB: 7,14; ROG: 5,53 [2]*Streptococcus salivarius* ssp. TR 570, Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínio. [3]*Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. [4] *Staphylococcus aureus* CTC 033, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [5]*Bacillus cereus* CTC 011, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [6] *Listeria innocua* Lin 11 (INRA), INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France

ANEXO D

Resultados de crescimento celular e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por ***Enterococcus avium*** **CTC 483** isolado de fígado de frango *in natura* em diferentes meios de cultivo.

Tempo (horas)	Meios[1]	DO 650nm	Log UFC.mL^{-1}	pH	Atividade (UA.mL^{-1}) TR 570[2]	LH ATCC 15009[3]	CTC 033[4]	CTC 011[5]	Lin 11[6]
0	APT	0,154	7,8	6,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,286	7,9	6,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,130	7,9	6,98	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,117	7,8	5,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	APT	0,210	7,8	6,74	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,358	8,1	6,16	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,185	7,9	6,92	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,159	7,8	5,49	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	APT	0,531	8,2	6,63	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,728	8,2	5,90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,412	8,2	6,83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,386	8,3	5,46	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	APT	0,540	8,9	6,25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	1,770	9,0	5,43	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,734	8,2	6,72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,854	8,7	5,32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	APT	1,038	9,1	5,92	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	3,592	9,7	4,82	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,840	8,6	6,66	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	1,520	7,6	5,27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	APT	1,566	9,3	5,90	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	4,800	9,5	4,62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,826	9,1	6,64	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,926	9,1	5,15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	APT	1,437	9,1	5,89	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	5,784	9,8	4,52	0,4	0,4	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,838	8,3	6,65	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	1,845	9,4	5,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	APT	2,226	9,6	5,94	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	5,642	9,8	4,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,774	8,7	6,76	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	2,576	9,7	4,67	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] pH do meio de cultivo: APT: 6,82; MRS: ; TSB: 6,92; ROG: 5,52. [2]*Streptococcus salivarius* ssp. TR 570, Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínio. [3]*Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. [4] *Staphylococcus aureus* CTC 033, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [5]*Bacillus cereus* CTC 011, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [6] *Listeria innocua* Lin 11 (INRA), INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France

ANEXO E

Resultados de crescimento e de produção de ácido láctico e de bacteriocinas por ***Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484** isolado de fígado de frango *in natura*, em diferentes meios de cultivo.

Tempo (horas)	Meios[1]	DO 650nm	Log UFC.mL^{-1}	pH	Atividade (UA.mL^{-1}) TR 570[2]	LH ATCC 15009[3]	CTC 033[4]	CTC 011[5]	Lin 11[6]
0	APT	0,036	6,8	7,11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,062	7,4	6,31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,043	7,2	7,17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,006	6,9	5,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	APT	0,048	6,7	7,08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	0,145	7,7	6,27	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,302	7,8	7,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,012	7,2	5,53	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	APT	0,053	7,7	6,73	0,2	0,2	0,2	0,4	0,0
	MRS	1,221	9,1	6,07	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,931	9,6	6,78	0,4	0,8	0,4	0,4	0,0
	ROG	0,024	6,9	5,54	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	APT	1,388	9,1	6,14	0,4	0,4	0,4	0,4	0,0
	MRS	2,912	9,0	5,26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,950	9,8	6,78	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,020	5,9	5,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	APT	1,341	9,2	6,12	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
	MRS	2,124	9,2	4,70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,972	8,3	6,78	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
	ROG	0,023	6,7	5,52	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	APT	1,240	9,8	6,12	0,4	0,2	0,8	0,4	0,0
	MRS	2,152	9,2	4,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,909	8,4	6,78	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
	ROG	0,031	6,8	5,51	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
12	APT	1,140	9,6	6,13	0,8	0,0	0,4	0,4	0,0
	MRS	2,070	9,2	4,44	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,864	8,7	6,79	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
	ROG	0,019	7,6	5,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	APT	1,050	9,6	6,02	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	MRS	2,046	8,9	4,50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	TSB	0,930	8,6	6,65	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ROG	0,033	6,7	5,38	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

[1] pH do meio de cultivo: APT: 7,09; MRS: ; TSB: 7,11; ROG: 5,52. [2]*Streptococcus salivarius* ssp. TR 570, Isoladas de queijo prato comercial, Centro de Tecnologia de Laticínio. [3]*Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, ATCC – American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. [4] *Staphylococcus aureus* CTC 033, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [5]*Bacillus cereus* CTC 011, CTC – Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil; [6] *Listeria innocua* Lin 11 (INRA), INRA – Institute National de Recherches Agronomiques, Jouyen-Josas, France

ANEXO F

Indicativo dos parâmetros cinéticos de crescimento (Δ máximo Log.UFCmL^{-1}), acidificação (Δ máximo de pH) e produção de bacteriocinas (UA.mL^{-1}) durante fermentação das linhagens em diferentes meios de cultivo a 37°C.

Linhagens	Meios	Crescimento celular[1]				Rendimento de Bacteriocina			Acidificação
		n[2]	g[3] (h)	μ[4] (h^{-1})	ΔLog	X[5](UFCm^{L-1})	B_{max}[6] (UA mL^{-1})	Y_{max}[7](B/X)	Δ pH[8]
204[a]	APT	0,24	8,3	0,08	2,5	9,3	0,8	0,1	0,9
	MRS	0,22	9,1	0,22	1,6	8,9	12,8	1,4	1,0
	TSB	0,17	11,8	0,06	1,8	8,4	0,4	0,05	0,3
	ROG	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	0,1
368[b]	APT	0,11	36	0,02	1,7	-	-	-	1,1
	MRS	0,10	20	0,03	1,6	9,7	12,8	1,3	1,6
	TSB	0,07	57	0,01	1,1	-	-	-	0,5
	ROG	0,05	40	0,02	1,9	-	-	-	0,3
469[c]	APT	0,14	14,3	0,05	1,2	-	-	-	0,8
	MRS	0,13	15,3	0,05	1,5	-	-	-	1,7
	TSB	0,14	13,9	0,05	1,0	-	-	-	0,5
	ROG	0,14	14,3	0,05	1,5	-	-	-	0,4
483[d]	APT	0,19	21	0,03	1,8	-	-	-	0,9
	MRS	0,14	15	0,05	1,9	9,8	0,4	0,04	1,5
	TSB	0,06	33,3	0,02	0,7	-	-	-	0,3
	ROG	0,07	28,6	0,02	1,8	-	-	-	0,3
484[e]	APT	0,25	8,0	0,09	2,8	7,7	0,2	0,03	1,0
	MRS	0,16	12,5	0,06	1,8	9,2	12,8	1,4	1,9
	TSB	0,16	12,5	0,06	1,5	9,6	0,8	0,08	0,4
	ROG	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	0,03

[1] N , g (h), μ (h^{-1}), X= UFC mL^{-1} no momento de alcançar a atividade de bacteriocina máxima (B_{max}). [2] n: número de gerações. [3] g: tempo de geração. [4] μ: taxa específica de crescimento bacteriano. [5]X:concentração de biomassa final [6] Bmax: Título máximo observado. [7] Ymax: Rendimento máximo de produção de bacteriocina expresso como o rendimento da bacteriocina por unidade formadora de colônia. [8] Δ pH: diferença entre o valor de pH obtido em 0 e 12 horas de crescimento

[a] *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204. [b] *Lactobacillus plantarum* CTC 368. [c] *Enterococcus avium* CTC 469. [d] *Enterococcus avium* CTC 483. [e] *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484.

ANEXO G

Efeito do sobrenadante livre de células de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 em meio APT e e *Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484 em meio MRS em células de *S. aureus* CTC033 após 4 horas de crescimento em caldo LAPTG a 37°C.

Tempo (horas)	Linhagens produtoras de bacteriocinas[a]							
	Lc. lactis subsp. *cremoris* CTC 204				*Lc. lactis* subsp. *hordinae* CTC 484			
	SB[1]		AB[2]		SB[1]		AB[2]	
	DO_{650nm}	Log $UFC.mL^{-1}$	DO_{650nm}	Log $UFC.mL^{-1}$	DO_{650nm}	Log $UFC.mL^{-1}$	DO_{650nm}	Log $UFC.mL^{-1}$
0	0,07	7,4	0,08	7,5	0,08	7,2	0,08	7,2
2	0,13	7,4	0,14	7,4	0,12	7,6	0,13	7,6
4*	0,48	8,2	0,49	8,2	0,38	8,1	0,38	8,2
4,5	0,67	8,3	0,46	3,7	0,62	8,2	0,36	7,2
5	0,84	8,5	0,46	4,5	0,71	8,4	0,35	7,0
5,5	1,01	8,8	0,43	5,8	0,86	8,9	0,35	7,2
6	1,30	8,9	0,44	5,9	1,14	8,7	0,35	7,7
7	1,69	9,1	0,41	6,2	1,48	8,8	0,36	7,5
8	1,07	9,0	0,41	5,9	1,93	8,8	0,38	7,8
9	1,21	9,1	0,41	4,6	2,19	8,9	0,39	8,0

[a]Resultados médios de triplicatas;

*Momento da adição da bacteriocina (2mL), no controle foi adicionado meio de cultivo estéril. A leitura foi feita antes da adição da bacteriocina; A partir de 6 horas, os cultivos foram diluídos antes da leitura da DO.a ;

[1] SB: Sem bacteriocina; [2]AB: adicionado de bacteriocina.