



**UDESC**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

ATIVIDADE ANTILISTERIAL DE  
PEPTÍDEOS SINTETIZADOS POR  
*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* E SUA  
APLICAÇÃO NA BIOCONSERVAÇÃO DE  
ALFACE (*Lactuca sativa*) VARIEDADE  
CRESPA MINIMAMENTE PROCESSADA

**IVAN DE MARCO**

**IVAN DE MARCO**

**ATIVIDADE ANTILISTERIAL DE PEPTÍDEOS SINTETIZADOS POR *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa*) VARIEDADE CRÉSPA MINIMAMENTE PROCESSADA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Propriedade e Segurança dos Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Liziane Schittler  
Co-orientadora: Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

de Marco, Ivan  
ATIVIDADE ANTILISTERIAL DE PEPTÍDEOS  
SINTETIZADOS POR *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* E  
SUA APLICAÇÃO NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALFACE  
(*Lactuca sativa*) VARIEDADE CRESPA MINIMAMENTE  
PROCESSADA / Ivan de Marco. -- 2019.  
97 p.

Orientadora: Liziane Schittler  
Coorientadora: Anieli Pinto Kempka  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Chapecó, 2019.

1. Conservação de alimentos. 2. Micro-organismos  
patogênicos. 3. Bacteriocinas. 4. Perfil tecnológico. 5.  
Biossegurança. I. Schittler, Liziane. II. Pinto Kempka, Anieli.  
III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação

**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

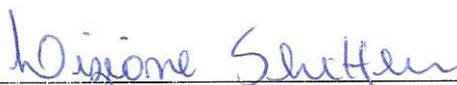
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTILISTERIAL DE PEPTÍDEOS SINTETIZADOS POR *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALFACE (*Lactuca sativa* VAR. CRESPA) MINIMAMENTE PROCESSADA**

Elaborado por  
**IVAN DE MARCO**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

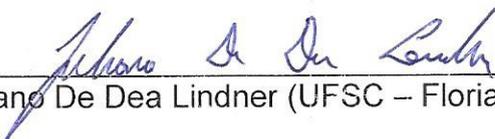
Comissão Examinadora:



Prof. Dra. Liziane Schittler – Orientadora (UDESC Oeste – Pinhalzinho / SC)



Prof. Dra. Elisandra Rigo (UDESC Oeste – Pinhalzinho / SC)



Prof. Dr. Juliano De Dea Lindner (UFSC – Florianópolis / SC)

Pinhalzinho, 29 de julho de 2019.

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe “Dona” Fátima e meu pai “Seu” Mercides por seus ensinamentos e exemplos que me tornaram quem eu sou. Desculpem pela ausência!

Ao meu companheiro Jeferson Ávila por ter estado ao meu lado me aturando, mas acima de tudo apoiando e incentivando para que este sonho se concretizasse.

A minha orientadora Dra. Liziane Schittler pela dedicação, amizade, paciência confiança e por compartilhar muito conhecimento durante este período.

A minha co-orientadora professora Dra. Aniela Pinto Kempka, pelas contribuições valiosas para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, e a todos os professores pelos seus ensinamentos.

A Universidade Federal de Viçosa - UFV, em especial ao professor Dr. Luís Augusto Nero e a doutoranda Andressa Fusieger por todo conhecimento repassado.

A todos meus amigos de longa data, aqui representados pelas pessoas de Douglas Stanguerlin, Roseli Barrichelo e Raquel Camargo. Obrigado por entenderem minhas ausências e meus momentos de estresse.

As amigas que o mestrado me presenteou, Cristine Vogel, Pamela Lima, Andressa Dalila, Gabriela Bristott, Gisiele Morandin, Fabiane Schuster e Elisa Sonza. Agradeço por todos os momentos de descontração e conhecimento compartilhado. Certamente as levarei para sempre no coração.

As “meninas” do Microlab, Natalia Valduga, Eliziane Zambiasi, Stéfani Mallmann e Tais Cechin pela amizade e apoio nos experimentos.

Enfim, minha eterna gratidão a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram durante este processo de aprendizagem e que mesmo não mencionadas aqui serão eternamente lembradas.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antilisterial de peptídeos sintetizados por *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (LLH20) e sua aplicação na bioconservação de alface (*Lactuca sativa*) variedade crespa minimamente processada. Para isto, o isolado foi submetido a verificação e confirmação da atividade antagonista através do método *spot-on-the-lawn* contra *L. monocytogenes*. O isolado apresentou atividade antagonista de natureza peptídica sensível as enzimas tripsina, proteinase K e  $\alpha$ -quimotripsina. Para otimizar a produção do peptídeo realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes: concentração de glicose (%) (0,5, 1,25, e 2), temperatura (24, 27 e 30 °C) e pH (6,0, 7,0 e 8,0). A melhor condição para a produção do peptídeo pelo LLH20 foi obtida em 14 horas de crescimento do LLH20 nas concentrações de 1,25% de glicose, em temperatura de 32 °C e pH 7,0. O peptídeo foi avaliado quanto estabilidade a tratamentos térmicos, agentes químicos, pH e ao armazenamento em temperatura de -20, 4,0 e 23 °C. O peptídeo produzido pelo LLH20, apresentou estabilidade para os tratamentos com temperatura de até 100 °C por 30 minutos. Para os agentes químicos, a estabilidade foi reduzida em 25 % após os tratamentos com Tween 80, Triton X-100, uréia, NaCl e Álcool. A atividade da substância não foi interferida nos pH de 2,0 a 8,0, enquanto que a diferentes temperaturas de armazenamento, manteve-se com atividade residual de 100 % durante 105, 90 e 15 dias a -20, 4 e 23 °C, respectivamente. No isolado LLH20 não foi identificado por Reação de cadeia da Polimerase (PCR), os genes relacionados a produção de lantibióticos, nisina, lactococina 972, lacticina 481 e lacticina 3147. O isolado demonstrou-se seguro em relação aos testes fenotípicos de susceptibilidade aos antimicrobianos clínicos, ampicilina, penicilina, vancomicina e tetraciclina e a presença das enzimas gelatinase, DNase e hemolisina. Quanto ao potencial tecnológico, o isolado LLH20 apresentou capacidade de acidificação e formação de coágulo, crescimento em diferentes pHs, produção de lipase e protease. A capacidade biopreservativa do isolado LLH20 e do peptídeo produzido pelo mesmo foram avaliadas na presença de *L. monocytogenes* em alface minimamente processada. Como resultado, o isolado LLH20 apresentou redução de 3,15 log UFC.g<sup>-1</sup> nas contagens de *L. monocytogenes*, enquanto a substância peptídica sintetizada pelo LLH20 reduziu em 1,63 log UFC.g<sup>-1</sup>, ambos em comparação ao controle, após 7 dias de armazenamento a 4°C. Conclui-se que a atividade da substância peptídica antilisterial é bacteriostática. O *L. lactis* subsp. *hordniae* bem como os peptídeos sintetizados por ele apresentam potencial para aplicação em alimentos como bioconservante.

**Palavras-chave:** Conservação de alimentos. Micro-organismos patogênicos. Bacteriocinas. Perfil tecnológico. Biossegurança.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antilisterial activity of peptides synthesized by *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (LLH20) and its application in surface bioconservation (*Lactuca sativa*), a minimally processed grown variety. For this, the isolate was subjected to verification and confirmation of antagonist activity by the on-site method against *L. monocytogenes*. The isolate showed antagonistic activity of sensitive peptide nature such as trypanin, proteinase K and chymotrypsin enzymes. To optimize the production of the peptide executed in the Central Composite Rotational Design (CCRD), having as independent variables: glucose concentration (%) (0.5, 1.25 and 2.0), temperature (24, 27 and 30 ° C) and pH (6.0, 7.0 and 8.0). The best condition for peptide production by LLH20 was the maximum production of peptide substance that was applied within 14 hours of LLH20 growth in the 1.25 % glucose analysis at 32 °C and pH 7.0. The peptide was evaluated for thermal stability, chemical agents, pH and temperature storage at -20, 4 and 23 ° C. The peptide produced by LLH20 has stability for treatments with temperature up to 100 ° C for 30 minutes. For chemical agents, stability was reduced by 25% after treatments with Tween 80, Triton X-100, urea, NaCl and Alcohol. The activity of the substance was not interfered at pH 2.0 to 8.0, while at different storage temperatures it remained with 100% residual activity for 105, 90 and 15 days at -20, 4 and 23 ° C, respectively. In the LLH20 isolate was not identified by Polymerase Chain Reaction (PCR) genes related to the production of lantibiotics, nisin, lactococin 972, lacticin 481 and lacticin 3147. The isolate was safe for phenotypic antimicrobial susceptibility testing. ampicillin, penicillin, vancomycin and tetracycline and the presence of gelatinase, DNase and hemolysin enzymes. Regarding the technological potential, the LLH20 isolate showed acidification and clot formation capacity, growth at different pHs, lipase and protease production. The biopreservative capacity of the LLH20 isolate and the peptide produced by it were evaluated in the presence of *L. monocytogenes* in minimally processed lettuce. As a result, the LLH20 isolate showed a reduction of 3.15 log UFC.g<sup>-1</sup> in *L. monocytogenes* counts, while the LLH20 synthesized peptide reduced by 1.63 log UFC.g<sup>-1</sup>, both compared to the control. after 7 days of storage at 4 ° C. The activity of the antilisterial peptide substance is bacteriostatic. *L. lactis* subsp. *hordniae* as well as the peptides synthesized by it have potential for food application as bioconservative.

**Key-words:** Food Preservation. Pathogenic microorganism. Bacteriocins. Technological profile. Biosafety.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1- Cinética de crescimento do isolado LLH20 (log UFC.mL<sup>-1</sup>); produção de substância antimicrobiana de origem peptídica (mm) e valor de pH em caldo MRS a 30°C por 24h.....49
- FIGURA 2 - Diagrama de Pareto referente a produção da substância peptídica, cuja resposta foi halo de inibição (mm).....53
- FIGURA 3 - Superfície de Resposta (a) e Curva de Contorno (b) referentes ao processo de produção da substância peptídica, pelo isolado LLH20.....54
- FIGURA 4 - Efeito da ação de diferentes temperaturas sobre a estabilidade da substância peptídica produzida pelo LLH20.....56
- FIGURA 5 – Estabilidade da substância (%) produzida pelo isolado LLH20 durante 180 dias de armazenamento a -20, 4 e 23 °C.....59
- FIGURA 6 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de PCR para identificação do gene de nisina. M: marcador de peso molecular de 100 pb; N: controle negativo; P: controle positivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 (300 pb), e I: LLH20. ....61
- FIGURA 7 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR para identificação do gene de Lacticina 481, M: marcador de peso molecular de 100 pb, N: controle negativo, P: controle positivo e I: Isolado LLH20.....62
- FIGURA 8 – Capacidade de formação de coágulo, onde A: coágulo uniforme formado pelo LLH20 em leite após 24 horas; B: controle negativo, leite sem a inoculação do isolado.....65
- FIGURA 9 - Atividade proteolítica de LLH20, em meio PCA enriquecido com LDR 10 % (B). A- Controle negativo com MRS; B- crescimento do isolado e consumo.....67
- FIGURA 10 - Efeito dos pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 9,0, 11,0, 11,0, 13,0 na multiplicação do LLH20 em caldo MRS nos tempos zero (logo após inoculação), 12 e 24h de incubação a 37°C.....68

FIGURA 11 - Efeito da cultura e dos peptídeos produzidos pelo LLH20 bem como da nisina contra *L. monocytogenes*, em alface minimamente processada e armazenada a 4 °C por 7 dias. Os tratamentos correspondem: T1 - Controle Negativo (alface higienizada); T2 – Controle positivo (crescimento de *L. monocytogenes*); T4 - crescimento de *L. monocytogenes* tratada com LLH20; T5- crescimento de *L. monocytogenes* tratada com SLC; T6 - crescimento de *L. monocytogenes* tratada com nisina; T7- Crescimento de *L. monocytogenes* tratada com SLC + nisina.....69

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Variáveis e níveis, do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup> utilizado no estudo de otimização das condições de produção da substância peptídica produzida pelo isolado LLH20.....36
- TABELA 2 - Oligonucleotídeos e condições da PCR utilizadas para identificação de genes lantibióticos e bacteriocinas em *L. lactis* subsp. *hordniae*.....40
- TABELA 3 - Resultados dos halos de inibição (mm) obtidos para cada experimento do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizado para a otimização das condições de produção da substância peptídica produzida pelo isolado LLH20.....51
- TABELA 4 - Efeitos individuais e efeitos de interação entre as variáveis temperatura, glicose e pH, na produção de peptídeos antilisteriais, cuja resposta foi halo de inibição (mm).....53
- TABELA 5 - Efeito da ação dos agentes químicos e pH(s) sobre a estabilidade da substância antimicrobiana produzida pelo isolado LLH20.....57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALOA – Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti  
ATP – Adenosina Trifosfato  
BAL – Bactérias Ácido Láticas  
BHI – Brain Heart Infusion Broth  
BLAST– *Basic Local Alignment Search Tool*  
CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*  
CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DTA – Doença Transmitida por Alimentos  
GRAS – *Generally Recognized as Safe*  
LB – Ágar Luria Bertani  
LDR – Leite Desnatado Reconstituído  
LOG – Logarítimo  
M – Molaridade  
MH – Ágar Muller-Hinton  
MRS – Man Rogosa e Sharpe  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
PCA – Plate Count Ágar  
PCR – Reação de cadeia da Polimerase  
pH – Potencial hidrogeniônico  
DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional  
RNA – Ácido ribonucleico  
RPM – Rotações Por Minuto  
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossômico  
SLC – Sobrenadante livre de células  
TSA – Ágar Tiptona de Soja  
TSB – Caldo Triptona de Soja  
UA – Unidade Arbitrárias  
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFV – Universidade Federal de Viçosa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL).....	221
3.2 GÊNERO <i>Lactococcus</i> .....	23
3.3 BACTERIOCINAS.....	24
3.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
3.5 ALFACE ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	29
3.6 APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E BACTERIOCINAS NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS.....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 ISOLADO E CEPAS BACTERIANAS.....	33
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONFIRMAÇÃO DA NATUREZA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20.....	34
4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO LLH20 E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA DO ISOLADO LLH20.....	35
4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PELO ISOLADO LLH20.....	35
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PEPTÍDICAS PRODUZIDAS PELO ISOLADO LLH20.....	36
<b>4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5.2 Avaliação da sensibilidade à agentes químicos</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5.3 Avaliação da influência do pH</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5.4 Avaliação da estabilidade durante armazenamento</b> .....	<b>37</b>
4.6 PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE LANTIBIÓTICOS E BACTERIOCINAS PELO ISOLADO LLH20.....	38

<b>4.6.1</b>	<b>Extração do DNA genômico.</b>	<b>38</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase – PCR</b>	<b>38</b>
4.7	CARACTERÍSTICAS DE BIOSSEGURANÇA DO ISOLADO LLH20	41
<b>4.7.1</b>	<b>Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos</b>	<b>41</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Gelatinase</b>	<b>41</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Dnase</b>	<b>42</b>
<b>4.7.4</b>	<b>Atividade hemolítica</b>	<b>42</b>
4.8	AVALIAÇÃO DO PERFIL TECNOLÓGICO DO ISOLADO LLH20	42
<b>4.8.1</b>	<b>Capacidade de formação de coágulo e acidificação</b>	<b>43</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Produção de lipase</b>	<b>43</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Atividade proteolítica</b>	<b>43</b>
<b>4.8.4</b>	<b>Multiplicação em diferentes pHs</b>	<b>44</b>
4.9	APLICAÇÃO DO ISOLADO LLH20 E DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PRODUZIDA COMO BIOCONSERVANTE EM ALFACE ( <i>Lactuca sativa</i> ) VARIEDADE CRESPA MINIMAMENTE PROCESSADA	44
<b>4.9.1</b>	<b>Preparo dos inóculos e de nisina</b>	<b>44</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Preparo da alface minimamente processada</b>	<b>45</b>
<b>4.9.3</b>	<b>Descrição dos tratamentos</b>	<b>45</b>
<b>4.9.4</b>	<b>Contagens microbiológicas</b>	<b>46</b>
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
5.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONFIRMAÇÃO DA NATUREZA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20	47
5.2	CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20	48
5.3	OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20	51
5.4	ESTABILIDADE DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PRODUZIDA PELO ISOLADO LLH20 A DIFERENTES TEMPERATURAS, AGENTES QUÍMICOS, pHs E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO	55
5.5	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE LANTIBIÓTICOS	60
5.6	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTERIOCINAS	61

5.7	CARACTERÍSTICAS DE BIOSSEGURANÇA.....	63
5.8	PERFIL TECNOLÓGICO DO ISOLADO LLH20.....	64
<b>5.8.1</b>	<b>Capacidade de formação de coágulo e acidificação.....</b>	<b>64</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Atividade Lipolítica.....</b>	<b>66</b>
<b>5.8.3</b>	<b>Atividade Proteolítica.....</b>	<b>66</b>
<b>5.8.4</b>	<b>Crescimento em diferentes pH.....</b>	<b>67</b>
5.9	APLICAÇÃO DO ISOLADO LLH20 E DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA COMO BIOCONSERVANTE EM ALFACE ( <i>Lactuca sativa</i> ), VARIEDADE CRESPA MINIMAMENTE PROCESSADA.....	68
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são utilizados nos mais diversos segmentos. Na biotecnologia, as bactérias ácido lácticas (BAL) tem se destacado pelo seu potencial de transformação e bioconservação.

Em produtos fermentados as BAL são responsáveis pelo desenvolvimento de características organolépticas (LIU et al., 2014) como textura, cor, sabor e aroma (KAVITAKE et al., 2018). Os principais compostos produzidos pelas BAL são ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Alguns metabólicos como os ácidos orgânicos e as bacteriocinas podem apresentar atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes.

As bacteriocinas são pequenos peptídeos, termoestáveis, sintetizados nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular. Podem apresentar efeito bactericida ou bacterioestático contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (ACUÑA; MORERO; BELLOMIO, 2011).

A *L. monocytogenes* é um micro-organismo patogênico de grande preocupação na indústria de alimentos, por apresentar capacidade de multiplicação e sobreviver a temperaturas de refrigeração, além, da tolerância a uma ampla faixa de pH e concentração de cloreto de sódio (NaCl). A doença, listeriose apresenta alta taxa de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (TAYLOR; QUINN; KATAOKA, 2019).

Atualmente, por conta da demanda exigida pelo mercado consumidor, muitas pesquisas têm focado na bioconservação como uma alternativa para a conservação de alimentos de forma mais natural. Este método objetiva a utilização de micro-organismos seguros e/ou seus metabólitos, como é o caso do *Lactococcus lactis*, para inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos nas matrizes alimentares (LEROI et al., 2015).

O gênero *Lactococcus* é conhecido por produzir bacteriocinas como a nisina (LE LAY et al., 2016). Dentre as subespécies conhecidas deste gênero, o *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, apresenta potencial na produção de peptídeos antimicrobianos. Contudo, até o momento, este potencial foi pouco relatado por estudos, (BROMBERG et al., 2006).

A alface (*Lactuca sativa*), é um dos vegetais folhosos de maior representatividade quanto a sua produção e seu consumo no Brasil (FILHO et al., 2017). Devido ao seu consumo ser *in natura*, esta hortaliça se torna uma fonte susceptível na transmissão de micro-organismos responsáveis pela ocorrência de DTAS (Doenças Transmitidas por Alimentos) (KLJUJEV et al., 2018). Neste contexto, a utilização da bioconservação como uma forma de minimizar estes efeitos, pode ser uma alternativa a ser empregada.

Devido ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antilisterial de peptídeos sintetizados por *Lactococcus lactis* subespécie *hordniae* e sua aplicação na bioconservação de alface (*Lactuca sativa*), variedade crespa, minimamente processada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar atividade antilisterial de peptídeos sintetizados por *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (LLH20) e sua aplicação na bioconservação de alface (*Lactuca sativa*) variedade crespa, minimamente processada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana e confirmar a natureza peptídica da substância produzida pelo isolado LLH20;
- Determinar o perfil de crescimento e produção da substância antimicrobiana do isolado LLH20;
- Utilizar de planejamento experimental para otimizar as condições para a produção do peptídeo antilisterial pelo isolado LLH20;
- Caracterizar a substância peptídica quanto a termoestabilidade, sensibilidade à agentes químicos, pH e a estabilidade durante armazenamento;
- Pesquisar os genes associados à produção de lantibióticos e bacteriocinas;
- Avaliar as características fenotípicas de biossegurança do isolado LLH20, quanto a susceptibilidade a antimicrobianos, produção de gelatinase, Dnase e hemolisina;
- Avaliar o potencial tecnológico de fermentação, acidificação, atividade lipolítica e proteolítica do isolado LLH20;
- Avaliar a capacidade de bioconservação do isolado LLH20 e a substância peptídica produzida pelo isolado em alface (*Lactuca sativa*), variedade crespa minimamente processada.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

As BAL compreendem um amplo grupo de micro-organismos Gram positivos, com morfologia de bacilos e cocos, imóveis, não esporuladas, anaeróbicos, catalase negativo e produtores de ácido láctico, como principal ou único produto da fermentação (KHALID, 2011). As bactérias deste grupo pertencem ao Reino Bacteria; Filo *Firmicutes*; Classe *Bacilli* e Ordem *Lactobacillales*, distribuídas em seis Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Os gêneros que compõem o grupo são: *Abiotrophia*; *Carnobacterium*; *Enterococcus*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Leuconostoc*; *Oenococcus*; *Pediococcus*; *Streptococcus*; *Tetragenococcus*; *Vagococcus*; *Weissella*, o qual possui mais de 530 espécies e subespécies. Os principais gêneros utilizados em indústrias são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e de *Enterococcus* (DANIEL et al., 2011; NES; DIEP; HOLO, 2007).

Essas bactérias estão difundidas na natureza (HWANHLEM et al., 2013) e fazem parte da microbiota intestinal de humanos (MORITA et al., 2011) e de animais (KAKTCHAM et al., 2019; PÉREZ et al., 2011; VOLOKHOV et al., 2012). Estão presentes em alimentos como leite (ESPECHE et al., 2012; YERLIKAYA, 2019), carnes (HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA et al., 2018), frutas e vegetais (CAI et al., 2011; CHEN et al., 2014, 2013; COSTA; VANETTI; PUSCHMANN, 2009; RANDAZZO et al., 2009; TODOROV et al., 2011; TRIAS et al., 2008).

A grande maioria das BAL são reconhecidos como micro-organismos seguros (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) de acordo com *Food and Drug Administration* (FDA) (GASPAR et al., 2013).

As BAL são classificadas como homofermentativas e heterofermentativas de acordo com o produto final da fermentação (GARCÍA; RENDUELES; DÍAZ, 2019; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). As homofermentativas utilizam a via *Embden-Meyerhof-Parnas* (glicolítica), o qual metaboliza a glicose, resultando como produto final o ácido láctico. Neste processo, para cada molécula de glicose utilizada na síntese obtém-se duas moléculas de ATP e duas moléculas de ácido láctico. Já, as heterofermentativas utilizam a via da fosfoacetolase, produzindo

além do ácido láctico outros compostos como o dióxido de carbono, ácido acético, etanol, acetato e peróxido de hidrogênio. Neste processo, a célula produz uma molécula de ATP e uma molécula de cada um dos produtos (GASPAR et al., 2013; LAHTINEN et al., 2012; STERR; WEISS; SCHMIDT, 2009).

As BAL apresentam importância tanto na indústria de alimentos quanto em saúde pública por apresentarem características transformadoras, probióticas e bioconservadoras. São utilizadas como culturas iniciadoras (*starters*), proporcionando transformações na matéria-prima, pela produção de ácidos e outras substâncias que atribuem textura, sabor e aroma específico em produtos fermentados (LEROY; DE VUNYST, 2004, COTTER; HILL; ROSS et al., 2005, TEUSINK; SMID, 2006; ROUSE et al., 2007).

Algumas BAL apresentam características probióticas, quando administradas em quantidades adequadas, estimulam a multiplicação de bactérias benéficas, conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (MESSAOUDI et al., 2013).

Outra característica importante, é que várias BAL apresentam atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos, denominadas como culturas protetoras ou bioconservadoras. Esta atividade antagonista das BAL se deve principalmente pela produção de substâncias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (DA COSTA et al., 2019; HUGAS, 1998).

Com estas características, é notável o potencial de utilização das BAL na bioconservação de alimentos, oferecendo muitos benefícios, como a redução na utilização de conservantes sintéticos e estendendo a vida útil dos produtos (CASTELLANO et al., 2008; DAL BELLO et al., 2012; GÁLVEZ et al., 2007).

Estudos relatam o isolamento e a caracterização de BAL bacteriocinogênicas a partir de frutas e vegetais, o que demonstra que são fontes potencialmente viáveis para a descoberta de novas substâncias com atividade inibitória contra micro-organismos indesejáveis (HO et al., 2018; TRIAS et al., 2008).

A biossegurança de novos isolados com potencial de aplicação como culturas bioconservadoras, *starters* ou probiótica em alimentos merece atenção, haja vista que os fatores de virulência podem aumentar a capacidade do micro-organismo em causar doenças ou infecções no homem e animais (HWANHLEM et al., 2013). Outro

aspecto a ser avaliado nos isolados é a sensibilidade contra drogas antimicrobianas comumente utilizadas em tratamentos de infecções (YERLIKAYA, 2019).

O *Lactococcus lactis* é considerado GRAS, no entanto, se faz necessário confirmar a sua biossegurança (SAELAO et al., 2017).

### 3.2 GÊNERO *Lactococcus*

As pesquisas com o gênero *Lactococcus* iniciaram em 1873 por Joseph Lister, o qual catalogou como *Bacterium lactis* (TEUBER, 1995). Em 1909, o gênero foi renomeada como *Streptococcus lactis* (KIM, 2014; TEUBER, 1995). Schleifer et al. (1985) sugeriram que as espécies, *S. lactis subsp. cremoris*, *S. lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus hordniae*, *Lactobacillus xylosus*, *S. garvieae*, *S. raffinolactis* e *S. plantarum* fossem classificadas como sendo um novo gênero: *Lactococcus*.

O gênero *Lactococcus* pertence à família *Streptococcaceae* e atualmente existem 14 espécies conhecidas: *L. plantarum*, *L. garvieae* (COLLINS et al., 1983), *L. lactis*, *L. raffinolactis* (SCHLEIFER et al., 1985), *L. piscium* (WILLIAMS; FRYER; COLLINS, 1990), *L. chungangensis* (CHO et al., 2008), *L. fujiensis* (CAI et al., 2011), *L. taiwanensis* (CHEN et al., 2013), *L. formosensis* (CHEN et al., 2014), *L. hircilactis*, *L. laudensis* (MEUCCI et al., 2015), *L. nasutitermitis* (YANG et al., 2016), *L. petauri* (GOODMAN et al., 2017), *L. reticulitermitis* (YERLIKAYA, 2019). Destas, seis subespécies: *L. lactis subsp. cremoris*, *L. lactis subsp. hordniae*, *L. lactis subsp. lactis* (SCHLEIFER et al., 1985), *L. lactis subsp. tructae* (PÉREZ et al., 2011), *L. garvieae subsp. bovis*, *L. garvieae subsp. garvieae* (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016). A subespécie *lactis* apresenta uma variante *L. lactis subsp. lactis* biovar *diacetylactis* que é capaz de converter citrato em diacetil, composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (LAROUTE et al., 2017; PASSERINI et al., 2013).

Apesar de associarmos a produtos lácteos, o primeiro isolado de *L. lactis* foi obtido de planta, o qual se adaptou ao trato gastrointestinal de ruminantes (SONG et al., 2017).

A faixa de temperatura de crescimento do *L. lactis* varia entre 10 e 40 °C, embora algumas espécies sejam capazes de crescer em temperaturas tão baixas quanto 7 °C, durante períodos prolongados de incubação de 10 a 14 dias. A maioria

das espécies de *Lactococcus* podem crescer em 4,0% (p / v) de cloreto de sódio e pH 7,0, no entanto, são inibidas em pH de 4,5 (YU et al., 2017).

As subespécies *L. lactis* subsp. *lactis*, e *L. lactis* subsp. *cremoris* são de importância tecnológica em alimentos. Além de seu papel na primeira etapa de acidificação, contribuem para o sabor dos produtos lácteos, principalmente devido à sua capacidade de produzir diacetil e acetoína (BALI et al., 2016). O *L. lactis* está envolvido na segurança microbiana, apresenta alta capacidade de produção de ácido láctico, além de bacteriocinas, considerados agentes antimicrobianos (GONZÁLEZ REVELLO et al., 2016; MEUCCI et al., 2015).

Embora, o *L. lactis* subsp. *hordniae* pertença a espécie *lactis* poucos estudos mostram seu potencial tecnológico (MEUCCI et al., 2015), probiótico (MORENO et al., 2018) e na bioconservação de alimentos. Segundo Vieira (2011), esta subespécie possui uma alta capacidade de produção de bacteriocinas com atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em queijo minas frescal. Bromberg et al. (2006), também relata a capacidade bacteriocinogênica da subespécie contra *L. monocytogenes*. Sua capacidade de inibir o crescimento fúngico também foi relatada (BARMAN et al., 2018).

Devido à sua importância na indústria, o *L. lactis* têm sido objeto de numerosos estudos que elucidam as características, genômicas e funcionais relevantes para aplicação em variados segmentos da indústria (CAVANAGH; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2015; LAROUTE et al., 2017; LEROY; DE VUYST, 2004; MAZZOLI et al., 2014).

### 3.3 BACTERIOCINAS

As bacteriocinas são pequenos peptídeos, termoestáveis, sintetizados ribossomalmente e biologicamente ativos, com tamanhos que variam entre 20 a 60 aminoácidos, catiônicos e hidrofóbicos. Apresentam ação inibitória contra outras bactérias Gram negativas e Gram positivas, sendo que o micro-organismo produtor possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade as bacteriocinas (SUGANTHI; MOHANASRINIVASAN, 2015; YANG et al., 2014). Todavia, apresentam maior atividade contra bactérias Gram positivos do que Gram negativo (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A ação das bacteriocinas depende da concentração do peptídeo, a fase de crescimento e as condições de estresse em que o micro-organismo produtor é submetido (temperaturas, pH e atividade de água alterada). Estes fatores podem levar a uma maior produção de metabólitos, podendo apresentar ação bactericida ou bacteriostática (JUODEIKIENE et al., 2012).

Outro fator que influencia a produção de bacteriocinas é a composição dos meios de cultura, que devem ser fontes ricas de nitrogênio, fosfato e carbono. Estudos demonstram que o aumento na concentração de nitrogênio, leva a uma maior produção de biomassa, e conseqüentemente maior quantidade de peptídeos antimicrobianos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; KANMANI et al., 2011; MAIA et al., 2019).

As bacteriocinas não apresentam toxicidade as células eucarióticas e toleram amplas faixa de pH e temperatura. Contudo, as bacteriocinas são inativadas por enzimas digestivas e tem pequena influência na microbiota intestinal, (GÁLVEZ et al., 2007). As bacteriocinas podem ser uma alternativa aos antibióticos devido a sua elevada variedade de peptídeos com grande espectro de ação contra os micro-organismos (COTTER; ROSS; HILL, 2013). Estudos mostram sua eficácia em tratamentos de infecções bacterianas, uma vez que, conseguem eliminar ou inibir diversos patógenos, inclusive micro-organismos resistentes e produtores de biofilmes, como: *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp (MCCAUGHEY et al., 2016; YANG et al., 2014).

As bacteriocinas são classificação de acordo com sua estrutura química, massa molecular, suscetibilidade enzimática, mecanismo de destruição microbiana, termoestabilidade, e a presença de resíduos de aminoácidos modificados pós-translacionais (KAŠKONIENĖ et al., 2017).

Embora não haja um consenso entre autores quanto ao agrupamento das bacteriocinas, as classes variam entre I e IV (REA et al., 2011). No entanto, a quarta classe de bacteriocinas, consiste de grandes complexos com carboidratos ou frações lipídicas denominadas de bacteriolisinas, compreendendo leuconocina S e lactocina 27 (GÜLLÜCE; KARADAYI; BARIŞ, 2013). Assim, majoritariamente as bacteriocinas dividem-se em três classes (LIU et al., 2014).

Na classe I estão os pequenos peptídeos (<5kDa), denominados lantibióticos e dentro desta classe há duas subdivisões, classificadas como Ia, Ib. Na subclasse

la, encontra-se peptídeos longos, flexíveis e com carga positiva, que causam a destruição dos micro-organismos sensíveis pela ligação e formação de poros na membrana citoplasmática. Já na subclasse Ib, a composição é de peptídeos globulares, rígidos, podendo apresentar ou não carga negativa (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Compõe esta classe a nisina, produzida por 35 linhagens de *L. lactis* subsp. *lactis*. A capacidade de produzi-las está geneticamente relacionada com o poder de fermentação da sacarose. Tem sido aplicada largamente na indústria de alimentos em vários países como conservante natural de produtos lácteos (JOZALA et al., 2007; LE LAY et al., 2016).

Na Classe II, encontramos os peptídeos não-lantibióticos, que são peptídeos não modificados e pequenos em termo de massa molecular (<10kDa). Nesta classe também há quatro divisões: as subclasses IIa; IIb; IIc e IId, na qual diferem-se de acordo com seu formato, tamanho e modo de ação sobre as células bacterianas. Na principal subclasse (IIa) encontramos os peptídeos ativos contra *Listeria* spp., as chamadas enterocina (produzidas por *Enterococcus* spp.) e a pediocina (produzidas por *Pediococcus* spp.). Em comparação com a nisina, as pediocinas apresentam um espectro maior contra *L. monocytogenes* (GÁLVEZ et al., 2008; NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

A classe (III) é constituída de peptídeos não-lantibióticos de grande peso molecular (>10kDa) e termicamente instáveis. São exemplos desta classe a colicina, produzida por *E. coli*, helveticina M e J produzida por *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus helveticus*. A principal característica que as difere dos demais grupos está em seu mecanismo de ação contra uma gama de micro-organismos, que promove o rompimento da parede celular das bactérias Gram positivos e da membrana externa das bactérias Gram negativos (KUMARIYA et al., 2019; SUN et al., 2018).

Os mecanismos de ação das bacteriocinas estão relacionadas a ligações em receptores da membrana celular, causando dissipação da força próton-motriz e agregação de monômeros, com modificações no potencial de membrana e no gradiente de concentração de íons de hidrogênio (MOLL; KONINGS; DRIESSEN, 1999). Esses efeitos em micro-organismos vivos levam a formação de poros na membrana citoplasmática provocando a saída de compostos pequenos ou alterando a força próton-motora necessária para a produção de energia e síntese de proteínas,

o que pode acarretar na perda de viabilidade da célula-alvo (DELBONI, 2009). Outro mecanismo de ação, está ligado à interação de bacteriocinas com os ácidos teicóico, teicurônico e lipoteicóico, componentes da parede celular, que resultam na liberação e ativação de enzimas autolíticas ligadas à célula, ocasionando a autólise celular (GONZÁLEZ et al., 2010).

Para haver produção e secreção de bacteriocinas são necessários pelo menos quatro genes, sendo estes: o gene estrutural da bacteriocina, que codifica uma pré-bacteriocina; o gene que confere imunidade, este codifica uma proteína de imunidade que protege a bactéria produtora da sua própria bacteriocina; um gene que codifica um transportador ABC (cassete de ligação ao ATP) necessário para secreção; e um gene que codifica uma proteína assessora da função contínua também necessária para a secreção. No entanto, fatores como pH, temperatura, tempo de incubação, nutrientes, infecção da célula por bacteriófago e presença de micro-organismos competitivos no meio, entre outros, podem interferir na produção de bacteriocina (DA SILVA SABO et al., 2014; GÁLVEZ et al., 2007).

A aplicação das bacteriocinas como bioconservantes em alimentos pode ser realizada de três formas: A inoculação das BAL no alimento e produção de bacteriocinas no produto; A adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas no produto como conservante; E por fim, a preparação de um produto com a presença da bacteriocina previamente fermentada por uma cepa de BAL (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996).

Como abordado, a nisina é a bacteriocina mais popular e amplamente utilizada, aprovada como aditivo alimentar desde 1969 (FAO/WHO 1969). Até o momento, oito tipos de nisinas naturais foram descobertas: nisinas A, Z, F e Q produzidas por *Lactococcus* spp. e as nisinas U, U2, P e H por algumas cepas de *Streptococcus* spp. (O'CONNOR et al., 2015). Estudos mostram seu amplo espectro de atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivos (*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*), responsáveis pela deterioração de alimentos, infecções e intoxicações alimentares. Vários estudos demonstram a sua eficiência na bioconservação de alimentos de diferentes segmentos da área alimentícia, como em produtos cárneos (carne moída, salsichas fermentadas ou embutidos) (BOUALEM et al., 2013; CHEN; HOOVER, 2003), cervejaria (MÜLLER-AUFFERMANN et al., 2015), vinícola (NERIS et al., 2013;

ROJO-BEZARES et al., 2007), pescados (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014; GHOMI et al., 2011; SCHELEGUEDA; GLIEMMO; CAMPOS, 2012), enlatados (LIU et al., 2013; TAYLOR et al., 2013), bem como em hortaliças, legumes e frutas (BARBOSA et al., 2013; HO et al., 2018; JAGANNATH et al., 2014; S. MYTHILI; SATHIAVELU, 2010; WALKER; PHILLIPS, 2008).

Diferentes espécies de *L. lactis* são capazes de sintetizar outros peptídeos proteicos, além da nisina, como por exemplo a bozacina B14 (IVANOVA et al., 2000); A bacteriocina HV219 (TODOROV; DICKS, 2006), lactococcina 972 e lactococcina A (RODRÍGUEZ et al., 2000), lactococcina G (ALEGRÍA et al., 2010), lactococcina BZ (ŞAHINGIL et al., 2011), lacticina 481 (RODRÍGUEZ et al., 2000), lacticina 3147 (PERIN et al., 2012) e bacteriocina 194-D (USTYUGOVA et al., 2012). Todas com potencial de inibição contra BAL e micro-organismos patogênicos como a *L. monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *Samonella spp.*, *Citrobacter spp* e *E. coli*.

Algumas bactérias patogênicas e deteriorantes demonstram resistência as bacteriocinas, como por exemplo a nisina e a pediocina (BASTOS; COELHO; SANTOS, 2015).

A resistência por parte do micro-organismo alvo pode ser adquirida por diferentes mecanismos, entres eles, pela alteração da composição da membrana. Como por exemplo, o *E. faecalis* apresenta resistência a pediocina, nisina e lacticina 3147 (OPSATA; NES; HOLO, 2010) e a *L. monocytogenes* é resistente a nisina, leucocina A, pediocina e mesenterocina (HARRIS; FLEMING; KLAENHAMMER, 1991).

Muitos estudos demonstram alternativas para superar esta resistência com a combinação de diferentes bacteriocinas (PERALES-ADÁN et al., 2018), ou até mesmo a interação com outros compostos antimicrobianos (ALGBURI et al., 2017). No entanto, é necessário mais estudos para elucidar os mecanismos de produção e ação das bacteriocinas (KUMARIYA et al., 2019).

### 3.4 *Listeria monocytogenes*

A *L. monocytogenes* é uma bactéria bacilar, Gram positivo, aeróbia e anaeróbia facultativa, móvel que multiplica em um amplo intervalo de temperatura (-1,5 a 45°C) e pH (4,3 a 9,6), e com atividade de água mínima de 0,90. Está presente

no trato intestinal de humanos e animais, solo, água bem como em vegetais frescos. (BAKA et al., 2015; BEUCHAT, 2002).

A doença causada por este micro-organismo é conhecida como listeriose, os principais sintomas são: febre, dor muscular e problemas gastrointestinais. No grupo de risco (idosos, gestantes e pacientes imunocomprometidos), pode provocar quadros graves como encefalite, meningite e septicemia. Dentro do grupo de risco a taxa de mortalidade varia entre 20 a 30 % (HUANG et al., 2011). A dose infectante é de cerca de 100 células de *L. monocytogenes* por grama de produto (KLJUJEV et al., 2018).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que cerca de 1.600 pessoas sejam afetadas e 260 mortes ocorram por ano devido à listeriose (CDC, 2016).

Diversos tipos de alimentos estão relacionados à contaminação por *L. monocytogenes*, dentre eles vegetais, leite e derivados, carnes e produtos prontos para consumo. A contaminação de alimentos pode ocorrer a partir de sua origem, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte ou pelo consumidor final (CARRASCOSA et al., 2016; GAUL et al., 2013).

É importante ressaltar que a *L. monocytogenes* apresenta maior condição de sobrevivência em ambientes hostis quando comparada a outros micro-organismos patogênicos não esporulados. Apresenta resistência ao congelamento, secagem e salga (TAYLOR; QUINN; KATAOKA, 2019).

O primeiro caso identificado de listeriose de origem alimentar ocorreu em 1981, envolvendo salada de repolho fermentada (SCHLECH, 1984). Outro surto de listeriose, foi notificado em 1987, envolvendo sorvete (SCHWARTZ et al., 1989). Em 2011 nos EUA, ocorreu um surto de listeriose com maior índice de mortalidade dos últimos 90 anos, 33 mortes e um aborto, o alimento envolvido foi melões contaminados com *L. monocytogenes* (CDC, 2012).

### 3.5 ALFACE (*Lactuca sativa* L.)

Com produção anual de aproximadamente 1,7 milhões de toneladas, a alface (*Lactuca sativa* L.), pertence à família *Asteraceae* (ITIS, 2019), apresenta relevância como cultivar na agricultura brasileira. (FILHO et al., 2017).

A microbiota da alface é composta por uma gama de micro-organismos, que possuem como principal função a proteção contra patógenos que possam ocasionar danos a planta. Dentre os gêneros de maior predominância na microbiota estão: *Pantoea*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Variovorax*, e bactérias láticas, dentre eles o *Lactococcus* (SCHREITER et al., 2014; WILLIAMS et al., 2013). No entanto, a forma de cultivo da alface pode interferir na microbiota.

A alface pode ser cultivada pelo método convencional, orgânico e hidropônico, sendo que dois primeiros, são realizados diretamente no solo, em consequência, ficam mais expostos à contaminação por micro-organismos (DRISSNER; ZUERCHER, 2014). Enquanto que o método convencional necessita de fertilizantes e agrotóxicos, o cultivo orgânico, não utiliza destas substâncias químicas para a produção, o que torna o produto mais saudável (GOMIERO, 2018). Já, o cultivo hidropônico consiste basicamente da adição dos nutrientes minerais em água, sendo esta técnica amplamente utilizada na produção da alface (BARBOSA et al., 2016).

Todos os vegetais folhosos, como a alface, não passam por tratamento térmico, desta forma podem vincular micro-organismos patogênicos responsáveis pelas DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos) (KLJUJEV et al., 2018), como por exemplo a *E. coli*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (ELIAS; NORONHA; TONDO, 2018; WILLIAMS; MARCO, 2014) .

A contaminação desse vegetal está diretamente relacionada as boas práticas agrícolas, as boas práticas de higiene, controle de temperatura e hábitos de consumo (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER, 2014).

Esta hortaliça possui uma grande variedade de cultivares, sendo as variedades de maior consumo, crespa, americana e lisa (SUINAGA et al., 2013). Considerando a vida útil da alface pós-colheita, a logística de distribuição se dá de forma regionalizada, ou seja, os produtores localizam-se próximos aos centros consumidores, afim de facilitar o escoamento do produto (HENZ; SUINAGA, 2009).

### 3.6 APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E BACTERIOCINAS NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Os primeiros métodos utilizados na conservação de frutas e hortaliças foram calor, frio, redução da atividade da água e fermentação. Depois surgiram os métodos

de esterilização, congelamento, branqueamento, cura, embalagem em atmosfera modificada, alta pressão hidrostática e conservantes químicos (propionato, sorbato, benzoato, lactato e acetato), aplicados em associação ou isolados, foram introduzidos nas indústrias (ACUÑA; MORERO; BELLOMIO, 2011).

A bioconservação é um método de conservação de alimentos que utiliza culturas protetoras e/ou os metabólitos sintetizados por elas com atividade antimicrobiana (LEROI et al., 2015). Esta tecnologia consiste em inocular microorganismos não patogênicos em alimentos, para prevenir a multiplicação de microorganismos indesejáveis (PILET; LEROI, 2011).

As BAL são boas candidatas para a bioconservação, primeiramente, por seu título de GRAS bem como por produzirem substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. Estas fazem parte da microbiota de muitos alimentos, como a alface, e também na microbiota intestinal de humanos e animais (GHANBARI et al., 2013; LEROI et al., 2015).

A bioconservação de alimentos tem alguns benefícios como a redução do uso de conservadores sintéticos e resíduos para tratamento. Além de estar atendendo ao desejo dos consumidores por alimentos com aspecto natural e prontos para consumo (MESSAOUDI et al., 2013).

O êxito na utilização das BAL como bioprotetores em frutas e hortaliças minimamente processadas é comprovada por inúmeros autores. Russo e colaboradores (2015), adicionaram isolados de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* em melão minimamente processado, e verificaram a inibição da multiplicação de *L. monocytogenes*. Randazzo et al. (2009), verificaram que a bacteriocina RUC9 produzida por uma cepa selvagem de *Lactococcus lactis* eliminou *L. monocytogenes* em alface minimamente processada. Siroli et al. (2017), avaliaram o efeito da associação de óleo essencial de tomilho e *L. lactis* CBM21 e estes reduziram a microbiota em alface minimamente processada.

Esses estudos demonstram que a bioconservação é uma alternativa promissora, porém ressalta-se estudos preliminares sobre aspectos de segurança e seleção cuidadosa destes micro-organismos e/ou seus metabólitos antes da aplicação em escala industrial (MA et al., 2017).

Tem se estudado a incorporação de bacteriocinas em embalagens para controlar o desenvolvimento microbiano através da liberação gradual do peptídeo no alimento (BALI; PANESAR; BERA, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia Molecular (MicroLab), e de Bioprocessos (Biolab) do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da UDESC/Pinhalzinho – SC. Laboratório de Pesquisa em Leites e Derivados (InovaLeite) do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Alimentar (InsPOA) e Laboratório de Biologia Molecular (BioMol) do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), da Universidade Federal de Viçosa UFV/Viçosa – MG.

### 4.1 ISOLADO E CEPAS BACTERIANAS

Utilizou-se neste estudo, o *Lactococcus lactis* subespécie *hordniae* isolado por Sonza, (2018) de alface tipo crespa (*Lactuca sativa*), identificado pelo sequenciamento do rDNA 16S, e denominado de LLH20.

Foram utilizadas as cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 (Lyofast Dry DY13, prime pharma CC, Gordons Bay, África do Sul), como controle positivo para a produção de bacteriocina e, como micro-organismo indicador da atividade antimicrobiana *Listeria monocytogenes* Scott A. Os micro-organismos usados como controles positivos para detecção de genes relacionados a produção de lantibióticos e bacteriocinas foram: *Streptococcus salivarius*, *L. lactis* subsp. *cremoris* CNRZ481/45, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13. Todas pertencentes ao Laboratório Microlab/UDESC.

Os micro-organismos foram mantidos em tubos tipo *ependorf* contendo caldo Triptona de Soja (TSB/Merck) e glicerol (20% v / v), estocadas em ultrafreezer à -80 °C. Para a utilização nos experimentos, as culturas foram recuperadas em caldo Man Rogosa Shape (MRS/Sigma-Aldrich), e caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI/Merck) para as bactérias ácido lácticas e *L. monocytogenes*, respectivamente. Incubadas a 36 ±1 °C por 24 horas, repetiu-se este procedimento e após a incubação, as culturas foram centrifugadas 5.000 x g por 10 min (Solab SL 703) a 4 °C. O precipitado foi ressuspensão em água peptonada 0,1% (Oxoid) esterilizada e repicados para tubos com ágar Triptona de Soja (TSA/Merck), incubados a 36 ±1 °C por 24 horas e mantidos a 4 °C em refrigerador.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONFIRMAÇÃO DA NATUREZA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20

A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando a técnica *spot-on-the-lawn* adaptada de Fleming; Etchells; Costilow (1975). O isolado de LLH20 e a cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* Dy13 foram recuperados em caldo MRS e incubados a  $25 \pm 1$  °C por 24 horas. Alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  dessas culturas foram inoculadas em placas contendo 10 mL de ágar Man Rogosa Shape (MRS/Sigma-Aldrich), e incubadas a  $35 \pm 1$  °C por 24 horas. Após adicionou-se uma sobrecamada de 8 mL de ágar BHI semi-sólido (0,8g.100 mL<sup>-1</sup> de ágar Bacteriológico/Himedia) com  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> da cultura indicadora de *L. monocytogenes* Scott A, e incubou-se a 35 °C por 24h. A presença de halos de inibição ao redor da cultura foi considerada indicativa de efeito antagonista, sendo medidos com paquímetro (Digimess®) e o resultado expresso em milímetros (mm).

Para a confirmação da natureza peptídica, utilizou-se o sobrenadante livre de células (SLC), para isto, o isolado foi cultivado em caldo MRS por 24 horas a  $30 \pm 1$  °C. Após, o extrato bruto, contendo o isolado, foi centrifugado a  $13.000 \times g$  a 4 °C, por 15 minutos, e o sobrenadante neutralizado com NaOH 1 N (Neon) até pH 7,0. Esterilizou-se por filtração o sobrenadante utilizando membrana (0,22  $\mu\text{m}$ /mililipore) e aqueceu-se a 85 °C por 10 minutos (KONDROTIENE et al., 2018).

Alíquotas de 1 mL do SLC foram incubadas com, 1 mg. mL<sup>-1</sup> das enzimas proteinase K,  $\alpha$ -quimiotripsina, pepsina, tripsina e catalase (Sigma-Aldrich) por 2 horas a  $37 \pm 1$  °C. Em seguida, foram aquecidas a 85 °C por 10 minutos, para inativar as enzimas.

A atividade peptídica foi confirmada através do método de difusão em ágar, descrita por Furtado et al. (2009), com adaptações. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do SLC foram adicionados em quatro pontos equidistantes entre si em Ágar TSA (Merck), previamente inoculado com  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* Scott A. Incubou-se a  $35 \pm 1$  °C por 24 horas.

Como controle negativo foi utilizado caldo MRS e as enzimas. A ausência zonas de inibição confirma a presença de atividade antimicrobiana de natureza peptídica no SLC. O Experimentos foi realizado em triplicata (KAKTCHAM et al., 2019).

#### 4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA DO ISOLADO LLH20

Inicialmente o isolado LLH20 foi cultivado em caldo MRS a  $36 \pm 1$  °C por 24 horas. Adicionou-se 1 % (v / v) do isolado em 100 mL de caldo MRS (pH 6,5) e incubou-se a  $30 \pm 1$  °C por 24 horas. Alíquotas foram retiradas, a cada duas horas e determinou-se o pH, quantificou-se o micro-organismo e avaliou-se atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

O pH foi determinado em pHmetro (TecnoPON mPA210) e a contagem de células viáveis em ágar MRS (KONDROTIENE et al., 2018).

Para determinar a atividade antimicrobiana, utilizou-se o SLC, preparado. Conforme descrito no item 4.2. A presença de atividade antimicrobiana no SLC foi avaliada através do método de difusão em ágar (item 4.2). Os halos de inibição produzidos foram medidos com paquímetro (Digimess®) e o resultado expresso em milímetros (mm).

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA A PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PELO ISOLADO LLH20

Visando otimizar as condições experimentais para a produção da substância peptídica pelo isolado LLH20, seguiu as condições do estudo de Suganthi; Mohanasrinivasan (2015), com adaptações. Para tanto, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$ , cujas variáveis e níveis, são apresentados na Tabela 1. Totalizando 17 experimentos, com três pontos centrais, apresentando as variáveis independentes, temperatura, concentração de glicose (%) e pH em meio de cultura MRS. Como variável dependente, deu-se em tamanho do halo (mm) de inibição produzida pela substância peptídica contra *L. monocytogenes*.

Tabela 1 - Variáveis e níveis, do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>, utilizado no estudo de otimização das condições de produção da substância peptídica pelo isolado LLH20.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1,0	0,0	1,0	+1,68
Temperatura (°C)	22	24	27	30	32
Glicose (% m/v)	0,01	0,50	1,25	2,00	2,50
pH	5,30	6,00	7,00	8,00	8,70

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Para a análise dos resultados do DCCR, utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta, cuja função de resposta foi relacionada às variáveis de entrada por um polinômio de segunda ordem (RODRIGUES e IEMMA 2005).

Os experimentos foram realizados em *Erlenmeyer* contendo 100 mL de caldo MRS e 1% do isolado LLH20, com concentrações de glicose, temperatura e pH referentes a cada experimento descrito na Tabela 1. O tempo de incubação foi de 14 horas, conforme determinado no item 4.3. Os valores de pH descritos para cada experimento, referem-se aos valores iniciais, não havendo tamponamento durante o processo de fermentação pelo isolado LLH20.

Após o tempo de incubação, determinou-se atividade antimicrobiana da substância peptídica, conforme descrito no item 4.2.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PEPTÍDICAS PRODUZIDAS PELO ISOLADO LLH20

Todos os ensaios deste item, foram determinados pelo método de difusão em ágar descrito conforme item 4.2. Como controle positivo, foi utilizado SLC sem nenhum tratamento. O experimento foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em percentual residual (%), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ atividade antimicrobiana residual} = \frac{\text{HT} \times 100}{\text{HC}}$$

HT: Tamanho do halo (mm) do SLC após o tratamento

HC: tamanho do halo do SLC sem tratamento (controle).

#### **4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica**

A estabilidade térmica das substâncias peptídicas antimicrobiana em diferentes temperaturas foi avaliada, incubando-se alíquotas de 1 mL do SLC a 60 °C, 80 °C, 100 °C, por 15, 30, 45 e 60 minutos. Avaliou-se a capacidade da substância manter a sua atividade em condições de autoclave, temperatura de 121 °C/ pressão 1,6 Bar, durante 15 e 30 minutos (WAYAH; PHILIP, 2018).

#### **4.5.2 Avaliação da sensibilidade à agentes químicos**

A ação dos agentes químicos sob a estabilidade da substância peptídica foi analisada pela adição de 1 % (v / v ou p / v) de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS/Promega), glicerina (Biotec), acetona (Vetec), Tween 80 (Dinâmica), Triton X-100 (Biotec), Uréia (Synth), Cloreto de Sódio (NaCl/ Biotec) e álcool absoluto (Reatec), em alíquotas de 1 mL de SLC. Os mesmos foram incubados a  $36 \pm 1$  °C por 2 horas (TODOROV, 2010).

#### **4.5.3 Avaliação da influência do pH**

O efeito do pH foi avaliado de acordo com Goyal; Malik; Pradhan (2018), com adaptações. Alíquotas de 1 mL de SLC foram ajustadas para pH 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0 com adição de solução de HCl 1 M ou NaOH 1 M. Incubou-se a  $36 \pm 1$  °C por 2 horas. Após, o pH das alíquotas foram ajustadas a 6,0 com a adição da solução de HCl 1 M ou NaOH 1 M.

#### **4.5.4 Avaliação da estabilidade durante armazenamento**

As condições de armazenamento da substância peptídica foram avaliadas nas temperaturas de: congelamento (- 20 °C), refrigeração (4 °C) e ambiente (23 °C) por até 180 dias. A atividade antimicrobiana foi avaliada a cada 15 dias.

## 4.6 PESQUISA DE GENES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE LANTIBIÓTICOS E BACTERIOCINAS PELO ISOLADO LLH20

### 4.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico do LLH20, bem como das cepas controles foram extraídos utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> SV Genomic DNA Purification System (Promega). A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose (Kasvi), 1% utilizando GelRed 20 X (Biotium Inc.) na proporção 5:1 e visualizada sob luz UV em transiluminador pelo programa LPix Image (LOCCUS Biotecnologia, BRL<sup>®</sup>).

### 4.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para a identificação de genes relacionados à codificação de lantibióticos e bacteriocinas foram utilizados os oligonucleotídeos *lanB*, *lanC*, *lanM*, *nisA* (nisina), lacticin 481 (lactocina 481), lacticin 3147 (lactocina 3147), lactococcin 972 (lactococcina 972) conforme descrito por Hyink et al. (2005) e Wirawan et al., (2006), Li; O'Sullivan (2002), Rodríguez et al. (2000), Alegría et al. (2010) e Biscola et al. (2013) adaptado por Perin et al. (2012), respectivamente.

Todos os *primers* foram avaliados quanto a especificidade utilizando-se o Blast – like Alignment Tool (Blast), através do software “*Basic Alignment Search Tool*” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

Para cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA e água ultrapura até completar o volume final. As reações foram conduzidas em termociclador (Esco Aeris<sup>™</sup>). *Primers*, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento estão descritos na Tabela 2.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (lantibióticos) e 1,5 % (bacteriocinas) (p / v) (Backer Analyzed), utilizando corante GelRed 20 X na proporção 5:1 e marcador o Ladder 100pb (Promega), como controle positivo as cepas descritas na Tabela 1, como controle negativo, todos os reagentes e água ultra-pura esterilizada em lugar do DNA. Após a corrida

eletroforética, o gel foi visualizado sob luz UV em transiluminador (TFX 35M, Life Technologies, Gibco BRL).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos e condições da PCR utilizadas para identificação de genes lantibióticos e bacteriocinas em LLH20

Identificação	oligonucleotídeos	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento	Controles positivos	Referências
<i>lanB</i>	TATGATCGAGAARYAKAWAGATATGG TTATTAIRRCAIATGIAIDAWACT	400-500	40 °C	<i>Streptococcus salivarius</i>	Wirawan et al., (2006)
<i>lanC</i>	TAATTTAGGATWISYIMAYGG ACCWKGIIICCRTRRCACCA	200-300	40 °C	<i>Streptococcus salivarius</i>	Wirawan et al., (2006)
<i>lanM</i>	ATGCWAGWYTGWCATGG CCTAATGAACCRTRRYAYCA	200-300	40 °C	<i>Streptococcus salivarius</i>	Hyink et al. (2005)
Nisina	GGATAGTATCCATGTCTG CAATGATTCGTTCGAAG	300	55 °C	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	Li; O'Sullivan (2002)
Lacticin 481	TCTGCACTCACTTCATTAGTTA AAGGTAATTACACCTCTTTTAT	366	51 °C	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CNRZ481/45	Rodríguez et al. (2000)
Lacticin 3147	AAATTAATGAGACAGACTTTG CATCATCCATAACTATATTTG	105	55 °C	-	Perin et al. (2012)
Lactococcin 972	TTGTAGCTCCTGCAGAAGGAACATGG GCCTTAGCTTTGAATTCTTACCAAAAAG	350	50 °C	-	Alegría et al. (2010)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

(-):

sem

controle

positivo.

## 4.7 CARACTERÍSTICAS DE BIOSSEGURANÇA DO ISOLADO LLH20

### 4.7.1 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em ágar, conforme descrito por Yerlikaya (2019), com adaptações. O isolado foi cultivado em caldo MRS a  $36 \pm 1$  °C por 24 horas. A concentração do microorganismo foi ajustada a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> utilizando espectrofotômetro. ( $\lambda$  630nm =  $0,150 \pm 0,02$ ). Com auxílio de *swab*, a cultura foi inoculada na superfície do ágar Muller-Hinton (MH/Merck) e, em seguida, adicionou-se os discos dos antibióticos. Foram utilizados quatro antimicrobianos: ampicilina (10 µg), penicilina (10 µg), vancomicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg) (Laborclin). Após, as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando paquímetro e expressos em milímetros (mm).

Os resultados foram expressos como isolados resistente (R), sensibilidade intermediária (I) ou sensível (S), com base nos valores de referências indicados pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2017). O experimento foi realizado em triplicata.

### 4.7.2 Gelatinase

Para identificar a produção de gelatinase utilizou-se o método descrito por Marra et al., (2007). Inoculou-se o isolado em 4 mL de caldo BHI acrescido de 12% de gelatina (Kasvi), e incubou-se a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas. Após, os tubos foram transferidos para banho de gelo por 30 minutos, sem agitação. Foi considerado resultado negativo quando o isolado não degradou a gelatina, permanecendo o meio sólido. Já o resultado positivo, meio líquido, indica produção da enzima. O experimento foi realizado em triplicata.

### 4.7.3 DNase

A atividade de DNase foi avaliada conforme descrito por Todorov et al. (2017). O isolado foi estriado diretamente em Agar DNase acrescido de verde de metila (Oxoid), e incubados a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas,  $25 \pm 1$  °C por 72 horas, e  $10 \pm 1$  °C por 10 dias. Foi considerado positivo quando ocorreu a formação de halos claros em torno das culturas, caracterizando a produção DNase. O experimento foi realizado em triplicata.

### 4.7.4 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi determinada através da inoculação do isolado LLH20 em ágar TSA suplementado com sangue de cavalo desfibrinado a 5% (v / v) conforme descrito por Todorov et al. (2017). Incubou-se a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas,  $25 \pm 1$  °C por 72 horas, e  $10 \pm 1$  °C por 10 dias.

Os resultados foram interpretados da seguinte maneira, presença de:  $\alpha$ -hemólise - linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias;  $\gamma$ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de ágar (foram consideradas não hemolíticas). Linhagens, que apresentam zonas de lise de sangue ao redor das colônias foram classificadas como hemolíticas ( $\beta$ -hemólise). O experimento foi realizado em triplicata.

## 4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL TECNOLÓGICO DO ISOLADO LLH20

Foram avaliadas as seguintes propriedades tecnológicas do isolado: capacidade de acidificação e coagulação do leite, atividade proteolítica extracelular, tolerância ao cloreto de sódio (NaCl) e multiplicação em diferentes pHs. Para isto, o isolado foi recuperado em *overnight* em caldo MRS a  $36 \pm 1$  °C e submetidos aos ensaios.

#### **4.8.1 Capacidade de formação de coágulo e acidificação**

Alíquota de 1 mL da cultura foi inoculado em 10 mL de leite desnatado estéril (Molico, Nestlé), e incubado a  $30 \pm 1$  °C por 24 horas. Com base nas características do coágulo formado, os padrões de lactofermentação foram descritos por meio de análise empírica e classificados em: uniforme, uniforme com presença de soro, uniforme e frágil (aparência), quebrado com presença de soro e ausência de coágulo (FUSIEGER, 2019).

Inoculou-se 1% da cultura em 10 mL de LDR (Leite Desnatado Reconstituído) (10 % p / v) com pH inicial de 7,0, e incubado a  $30 \pm 1$  °C (PSONI et al., 2007).

O pH foi avaliado no momento da inoculação (T0), depois de 6 (T6), 12 (T12) e 24 horas (T24) de incubação, utilizando-se pHmetro (TecnoPON mPA210). Como controle negativo foi utilizado 10 mL de LDR (10%) com pH 7,0 sem a adição da cultura. Com base na habilidade da cultura em reduzir o pH do leite após 24 horas, o isolado foi classificado: (I) altamente acidificante com diminuição de mais de 2 unidades de pH; (II) acidificante médio com uma queda entre 1,5 e 2,0 unidades de pH; (III) pouco acidificante com diminuição inferior a 1,5 unidades de pH. Todo o experimento foi realizado em Triplicata.

#### **4.8.2 Produção de lipase**

A produção de lipase foi avaliada através do método descrito por Todorov et al. (2017). Alíquotas de 2 µL da cultura, previamente crescida, foram semeadas em placas de ágar Luria Bertani (LB/ Becton Dickinson), suplementado com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> Sigma-Aldrich, a 0,2%, p / v) e Tween 80 (Sigma-Aldrich, a 1%, v / v) e incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 48 horas,  $25 \pm 1$  °C por 72 horas, e  $10 \pm 1$  °C por 10 dias. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das culturas. O experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.8.3 Atividade Proteolítica**

A atividade proteolítica extracelular foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Franciosi et al., (2009), com modificações. Quatro

alíquotas de 2 µL da cultura foram adicionadas na superfície do Agar Plate count (PCA/Merck) enriquecido com LDR estéril (10% p / v). Incubou-se a  $30 \pm 1$  ° C por 96 horas. Como controle negativo foi utilizado 2 µL de MRS. A capacidade de produção de proteases extracelulares foi considerada positiva quando houve a presença de halos proteolíticos ao redor da cultura. Os halos foram medidos com auxílio de paquímetro e o resultado expresso em milímetros (mm).

#### 4.8.4 Multiplicação em diferentes pHs

Em placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano (Kasvi), alíquotas de 2 µL da cultura foram adicionados em 248 µL de caldo MRS com os pHs ajustados em 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 9,0, 11,0 e 13,0, (soluções 1 mol / L de HCl ou 1 mol / L de NaOH) de acordo com o descrito por Todorov e Franco (2018). As leituras de D.O. ( $\lambda = 630$  nm) foram realizadas em leitora de microplaca (Kasuki modelo DR-200BS) nos tempos: zero (T0), depois de 12 (T12) e 24 horas (T24) de incubação a  $37 \pm 1$  °C. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.9 APLICAÇÃO DO ISOLADO LLH20 E DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PRODUZIDA COMO BIOCONSERVANTE EM ALFACE (*LACTUCA SATIVA*) VARIEDADE CRESPA MINIMAMENTE PROCESSADA

Utilizou-se a nisina (Nisaplin/ Sigma-Aldrich), bacteriocina conhecida e licenciada, nos tratamentos para poder comparar a atividade antimicrobiana do produzida pelo LLH20.

##### 4.9.1 Preparo dos inóculos e de nisina

Cultivou-se a *L. monocytogenes* em caldo BHI a  $37 \pm 1$  °C, em *overnight*, e a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,85% estéril e a concentração padronizada por D.O ( $\lambda = 630$  nm) em espectrofotômetro digital (Hach DR 3900), igual a 0,30, correspondente a  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Diluições foram realizadas para obter a concentração aproximada de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* por grama na alface.

A preparou-se o LLH20 bem como o SLC conforme descrito no item 4.2.

A nisina foi preparada conforme instruções do fabricante, 2,5 ug/L em 0,1% de ácido fosfórico (grau alimentício).

#### 4.9.2 Preparo da alface minimamente processada

A alface (*Lactuca sativa* L.) variedade crespa foi adquirida no comércio local de Pinhalzinho – SC. As alfaces foram submetidas a toailete manual, onde separou-se as folhas das hastes, e aquelas sem danificação, lavou-se em água corrente. As folhas foram cortadas em tiras com auxílio de faca de aço inoxidável, com aproximadamente de 3 cm de largura. A higienização foi realizada através da imersão do vegetal em hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos. Após, realizou-se o enxague em água potável, centrifugou-se manualmente e acondicionou-se 100g do vegetal em saco de polietileno de baixa densidade (PEBD). As embalagens foram mantidas a 4°C por 1 hora, para posterior preparo dos tratamentos. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.9.3 Descrição dos tratamentos

A aplicação do isolado bem como do SLC contendo a substância peptídica do LLH20 e nisina foram realizadas por aspersão dentro das embalagens das alfaces, previamente preparadas. Foram realizados sete tratamentos: Tratamento 1 (T1): alface sanitizada com hipoclorito de sódio 200 ppm (controle negativo); Tratamento 2 (T2): alface +  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* (controle positivo); Tratamento 3 (T3): alface +  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de LLH20; Tratamento 4 (T4): alface +  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* +  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de LLH20; Tratamento 5 (T5): alface +  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* + SLC (5 mL); Tratamento 6 (T6): alface +  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* + 2,5 µL/L de nisina; Tratamento 7 (T7): alface +  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes* + SLC (5 mL) + 2,5 µL/L de nisina. As embalagens foram seladas e armazenadas a  $4 \pm 1$  °C por sete dias. Foram realizadas contagens microbiológicas logo após a inoculação, tempo zero, no segundo, quinto e sétimo dia de armazenamento.

#### 4.9.4 Contagens microbiológicas

Transferiu-se, assepticamente, 25 gramas de cada amostra, para sacos plásticos esterilizados tipo *stomacher*, e adicionou-se 225 mL de água peptonada a 0,1%. (p / v), perfazendo a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, preparou-se as demais diluições seriadas com 9 mL de água peptonada a 0,1%. (p / v).

No tratamento 1 (controle negativo) foram realizadas contagens de BAL e de *L. monocytogenes*.

Nos tratamentos 2, 4, 5, 6 e 7 foram realizadas contagens de *L. monocytogenes*. Já, nos tratamentos 3 e 4 foram realizadas contagens de BAL.

Para as contagens microbianas utilizou-se os métodos descritos por Randazzo et al., 2009.

Para a contagem de BAL, inoculou-se 0,1 mL das diluições decimais apropriadas em placas contendo ágar MRS. Incubou-se em anaerobiose  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Para a contagem de *L. monocytogenes* foi inoculada alíquotas de 0,1 mL das diluições em placas contendo ágar Listeria Ottaviani and Agosti (ALOA/Laborclin) e incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

As colônias foram contadas e o resultado foram expressos em  $\log\text{ UFC.g}^{-1}$

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Statistica 10.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONFIRMAÇÃO DA NATUREZA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20

O isolado LLH20, obtido de alface tipo crespa (*Lactuca sativa*), produziu halo de inibição de  $18,67 \pm 0,76$  mm contra *L. monocytogenes*. Já, o *L. lactis* subsp. *lactis* Dy13, cepa produtora de nisina, produziu halo de inibição de  $16,57 \pm 0,81$  mm. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ), entre os tamanhos dos halos produzidos pelo isolado LLH20 e a cepa padrão. Este resultado demonstra que o isolado LLH20 apresenta atividade antimicrobiana superior a cepa padrão de *L. lactis* subsp. *lactis* Dy13. No entanto, não é possível afirmar qual a substância antimicrobiana produzida pelo isolado, haja vista, que o ágar MRS apresenta uma grande quantidade de carboidrato, o que permite a produção de metabólitos como ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil, acetaldeído, acetoína, dióxido de carbono, reuterina, reuteriicina e bacteriocinas, que podem ser responsáveis pela inibição do patógeno (AZHAR; ZIN; ABDUL HAMID, 2017; YERLIKAYA, 2019).

A atividade antimicrobiana de isolados de *L. lactis* são descritas por vários autores. Ho et al. (2018), avaliaram a capacidade antimicrobiana de 897 isolados de frutas, ervas e vegetais, destes 40 apresentaram atividade contra *L. monocytogenes*, sendo 14 pertencentes ao gênero *L. lactis*. Yerlikaya (2019), relata que isolados de *L. lactis* obtidos de leite cru e Kefir apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e *Enterobacter aerogenes*.

Kondrotiene et al. (2018), descrevem que dos 181 *L. lactis* isolados de leites e derivados, 12 apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* Typhimurium e o deteriorante, *Brochothrix thermosphacta*.

Para confirmar se a substância antimicrobiana é de origem peptídica (bacteriocinogênica), ela deve apresentar sensibilidade a uma ou mais proteases. A sensibilidade é evidenciada pela inativação da substância antimicrobiana e o crescimento do micro-organismo indicador (MONTVILLE; KAISER, 1993).

A substância antimicrobiana produzida pelo LLH20 foi sensível as enzimas proteolíticas, tripsina, proteinase K e  $\alpha$ -quimotripsina, confirmando a natureza peptídica.

Resultados semelhantes foram relatados por Kaktcham et al. (2019), onde avaliaram 144 isolados de *L. lactis* subsp. *lactis*, obtidos de tilápias do Nilo e camarões, destes apenas dois apresentaram sensibilidade a enzimas proteolíticas pepsina e proteinase K.

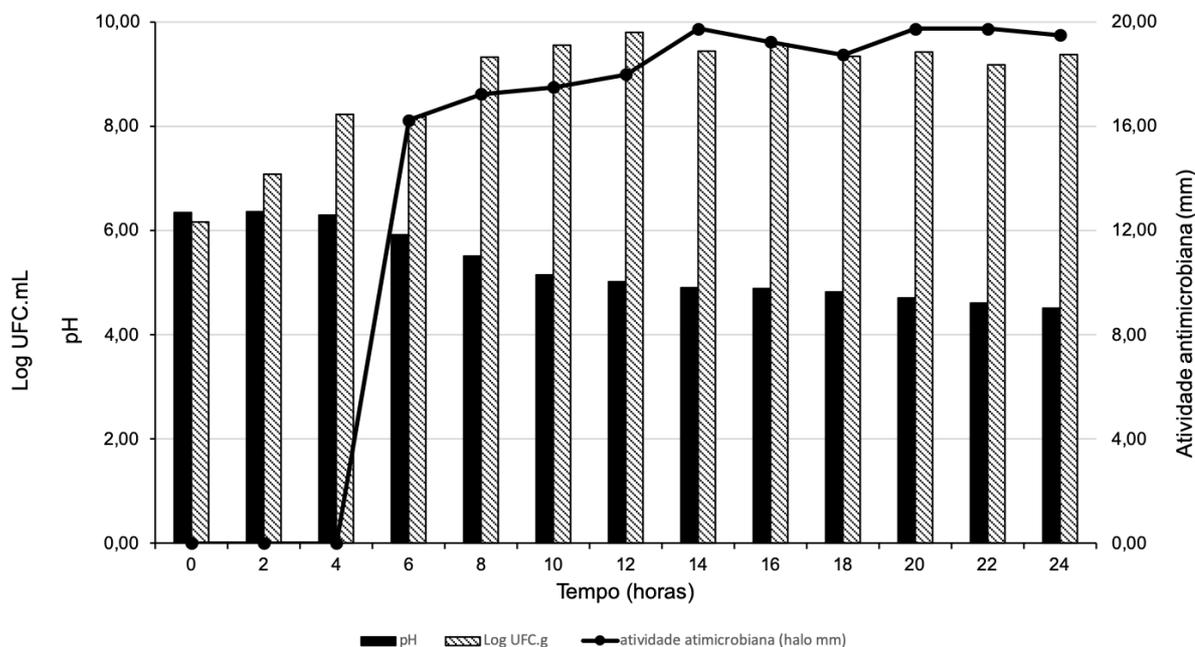
Hwanhlem et al. (2013), testaram a sensibilidade da substância antimicrobiana produzidas por isolados de *L. lactis* subsp. *lactis*, obtidos da água de mangue no sul da Tailândia, às proteases. A substância antimicrobiana foi sensível as enzimas  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina e proteinase K. Já Ghrairi et al. (2014), identificaram seis isolados dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* de alimentos vegetais fermentados com atividade antimicrobiana contra *Listeria ivanovii*, as substâncias produzidas foram sensíveis as enzimas proteinase K e pronase E.

De acordo com Arauz et al., (2009), afirmam que com perfil de sensibilidade às proteases, não é possível afirmar qual bacteriocina que o micro-organismo produz, haja vista, que estas nas podem ser sensíveis a mais de uma enzima.

## 5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20

Pode ser observado na Figura 1, a cinética de crescimento do isolado LLH20, pH e a produção da substância antimicrobiana de natureza peptídica (mm) em caldo MRS por 24 horas.

Figura 1- Cinética de crescimento do isolado LLH20 (log UFC.mL<sup>-1</sup>), produção de substância antimicrobiana de origem peptídica (mm) e valor de pH em caldo MRS a 30°C por 24h.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

No início da cinética (T<sub>0</sub>), o pH do caldo MRS estava em 6,35, atingindo 4,52 após 24 horas de fermentação. Entre os valores de pH, não houve diferença significativa nas quatro primeiras horas de crescimento ( $p < 0,05$ ) (Apêndice 1). Nos tempos 14, 16 e 18 horas, o pH permaneceu constante e não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) (Figura 1).

Abdollahi et al. (2018), observaram o crescimento de *L. lactis* em caldo MRS modificado e em soro de leite com pH inicial de 6,0, que ao final das 24 horas, reduziram o pH em 4,5 e 4,0, respectivamente.

Para Miranda; Campos-Galvão; Nero (2018), a cinética de *L. lactis* subsp. *lactis* e produção de bacteriocina em caldo BHI a 30 °C por 24 horas, houve redução do pH em 1,63 ao término das 24 horas.

A redução do pH é devido a produção de metabólitos ácidos, incluindo o ácido lático, que é característico do grupo BAL. Esta produção de ácidos é um importante fator que acarreta na inibição da síntese de bacteriocina (SHIMIZU et al., 1999). Ou seja, quanto maior a quantidade de glicose a ser convertida em ácido lático, menor será o pH e conseqüentemente menor a produção de bacteriocina (KIM; HALL; DUNN, 1997; VUYST; VANDAMME, 1992).

Observa-se na Figura 1, que o isolado LLH20 iniciou a cinética com 6,16 log UFC. mL<sup>-1</sup>, chegando a 9,38 log UFC. mL<sup>-1</sup>, em 24 horas.

A fase estacionária de crescimento do isolado LLH20 foi verificada a partir de 10 horas de incubação em caldo MRS a 30°C.

Resultados similares foram observados por Abdollahi et al. (2018), onde células viáveis de *L. lactis* em caldo MRS ao fim das 24 horas atingiram 9,34 log.UFC.mL<sup>-1</sup>, enquanto que em soro de leite a contagem foi relativamente menor (7,6 log.UFC.mL<sup>-1</sup>).

Entre os tempos avaliados, o ponto máximo de produção da substância peptídica pelo LLH20 iniciou em 14 horas. A máxima de atividade da substância permaneceu constante até o final das 24 horas, não diferindo estatisticamente entre os tempos ( $p < 0,05$ ) (Apêndice 1).

Abdollahi et al. (2018), observaram o início da produção da substância antimicrobiana em oito horas de cinética do *L. lactis* em caldo MRS, enquanto em soro de leite iniciou nas primeiras quatro horas. No entanto, o MRS apresentou maior produção após 14 horas, quando comparado com o soro de leite. Já Miranda; Campos-Galvão; Nero (2018), a produção de nisina em caldo BHI a 30 °C teve sua maior atividade em 12 horas de cinética.

Parte das bacteriocinas sintetizadas pelas BAL, são produzidas na fase exponencial de multiplicação (HAN et al., 2012). Resultado este, que pode ser visualizado no presente estudo, onde a produção da substância esteve presente e constante ao longo da fase estacionária, iniciando sua produção após seis horas de crescimento. Alguns autores referem-se que a cinética do metabolito primário ocorre quando a produção de bacteriocinas é proporcional ao aumento da massa celular ou taxa de crescimento (DELGADO et al., 2005, 2007). Fato este que pode ser visualizado no estudo de Han et al. (2012), onde na cinética de produção da bacteriocina KC24 de *L. lactis*, teve início sua atividade antimicrobiana com quatro horas de crescimento. No entanto, essa precoce produção esta relacionada a concentração de células viáveis no início da cinética, que foi de aproximadamente 7,2 log.UFC.mL<sup>-1</sup>.

Com a cinética do LLH20, definiu-se que o tempo de fermentação para a otimização da produção da substância peptídica será de 14 horas, tempo que ocorre o início da produção máxima da substância antimicrobiana.

### 5.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA DO ISOLADO LLH20

Na Tabela 3 estão mostradas a matriz do planejamento experimental bem como os resultados dos halos de inibição (mm) (valores observados) e os valores preditos pelo modelo matemático, referentes a cada experimento do DCCR 2<sup>3</sup>.

Tabela 3 - Resultados dos halos de inibição (mm) obtidos para cada experimento do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para a otimização das condições de produção da substância peptídica pelo isolado LLH20 com valores codificados e reais.

Ensaio	Temperatura (°C) (X <sub>1</sub> )	Glicose		Halo de inibição (mm)	
		(%, m/v) (X <sub>2</sub> )	pH (X <sub>3</sub> )	Valores observados	Valores preditos*
		E1	24 (-1)		
E2	24 (-1)	0,5 (-1)	8 (+1)	14,50	12,68
E3	24 (-1)	2 (+1)	6 (-1)	17,75	19,35
E4	24 (+1)	2 (+1)	8 (+1)	18,50	20,11
E5	30 (+1)	0,5 (-1)	6 (-1)	18,00	15,00
E6	30 (+1)	0,5 (-1)	8 (+1)	15,75	12,77
E7	30 (+1)	2 (+1)	6 (-1)	19,50	19,93
E8	30 (+1)	2 (+1)	8 (+1)	19,00	20,45
E9	22 (-1,68)	1,25 (0)	7 (0)	20,75	20,94
E10	32 (+1,68)	1,25 (0)	7 (0)	19,75	21,51
E11	27 (0)	0,01 (-1,68)	7 (0)	0,00	5,65
E12	27 (0)	2,5 (1,68)	7 (0)	19,75	16,05
E13	27 (0)	1,25 (0)	5,3 (-1,68)	17,50	19,09
E14	27 (0)	1,25 (0)	8,7 (1,68)	17,50	17,86
E15	27(0)	1,25 (0)	7 (0)	16,00	16,55
E16	27(0)	1,25 (0)	7 (0)	17,00	16,55
E17	27(0)	1,25 (0)	7 (0)	17,00	16,55

\*Valores preditos pelo modelo matemático obtido através da regressão dos dados de tamanho de halo (mm).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Como pode-se observar na Tabela 3, os valores observados oscilaram entre zero e 20,75 mm, e os valores preditos entre 5,65 e 21,51. Os maiores valores observados de halos de inibição produzidos pelo LLH20 contra *L. monocytogenes* foram obtidos nas condições experimentais E9, E10 e E12. Para os valores preditos

pelo modelo matemático, os maiores halos de inibição foram obtidos nos experimentos E9 e E10, cuja glicose e o pH são os mesmos, 1,25% e 7,0, respectivamente, havendo diferença nos valores de temperatura, sendo 22°C para E9 e 32°C para E10. Os valores de halos de inibição obtidos para os experimentos E9 e E10 são considerados excelentes, pois, segundo Mosbah et al. (2018), zonas de inibição com tamanhos entre 1 e 6, 7 e 10, 11 e 15, 12 e 20 mm, são consideradas baixa, moderada, alta e excelente atividade antimicrobiana, respectivamente.

A Análise de Variância (ANOVA), mostrou que 73,96 % da variação total foi explicada pelo modelo, porém a falta de ajuste foi significativa. Cabe salientar, que os valores analisados (halos de inibição) são valores obtidos com a aplicação da solução contendo os peptídeos antimicrobianos, não sendo, portanto, o valor de produção destes peptídeos, e ainda, aplicação em um processo microbiológico, que depende do crescimento dos micro-organismos. Assim, esta variação explicada pelo modelo pode ser considerada satisfatória.

Na Tabela 4, que corresponde aos efeitos das variáveis para os experimentos de produção da substância peptídica pelo isolado LLH20, cuja resposta foi o tamanho do halo de inibição, verifica-se que a glicose (L), a glicose (Q) e temperatura (Q) exerceram efeito significativo ( $p < 0,05$ ). Como a interação entre as variáveis não apresentou efeito significativo, uma análise individual das variáveis pode ser realizada. O efeito positivo para a glicose significa que, quando se passa do nível -1 para o nível +1 do planejamento experimental, ocorre um aumento do tamanho do halo de inibição. Estes efeitos podem ser melhor visualizados no Diagrama de Pareto, mostrado na Figura 2.

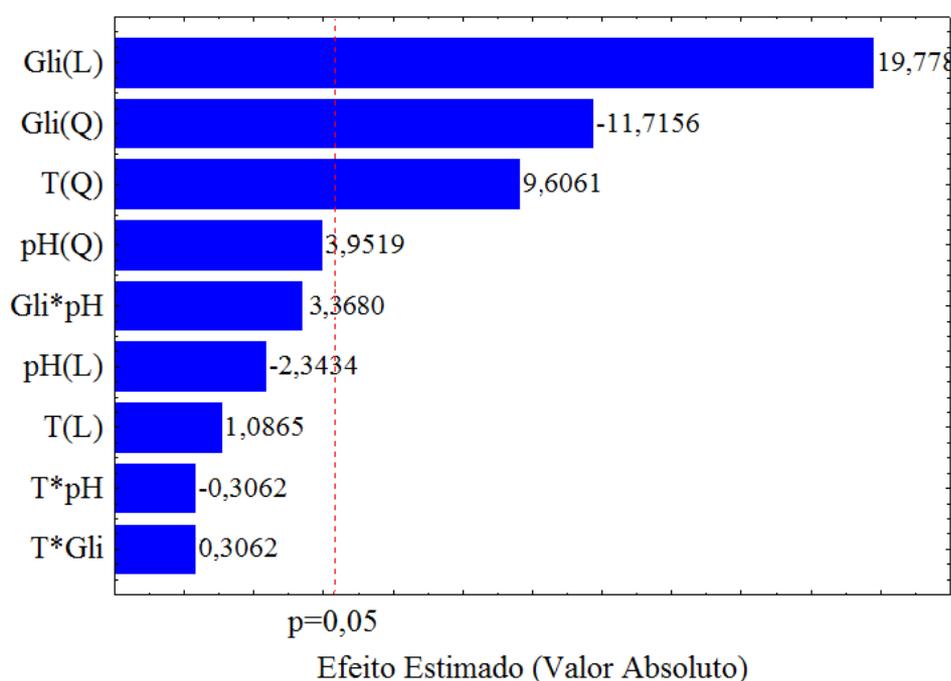
Tabela 4 - Efeitos individuais e efeitos de interação entre as variáveis temperatura, glicose e pH, na produção da substância peptídica, cuja resposta foi halo de inibição (mm).

	Efeito	Erro padrão	p-valor
<b>Média/Intercessão</b>	16,5548	0,332681	0,000404*
<b>Temperatura (L)</b>	0,33949	0,312460	0,390760
<b>Temperatura (Q)</b>	3,30439	0,343907	0,010659*
<b>Glicose (L)</b>	6,18230	0,312460	0,002545*
<b>Glicose (Q)</b>	-4,03184	0,343907	0,007197*
<b>pH (L)</b>	-0,73223	0,312460	0,143823
<b>pH (Q)</b>	1,35985	0,343907	0,058412
<b>Temperatura x glicose</b>	0,12500	0,408248	0,788396
<b>Temperatura x pH</b>	-0,12500	0,408248	0,788396
<b>Glicose x pH</b>	1,37500	0,408248	0,077982

\*Fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). (L) significa termo linear e (Q) significa termo quadrático.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

Figura 2 - Diagrama de Pareto referente a produção da substância peptídica, cuja resposta foi halo de inibição (mm).

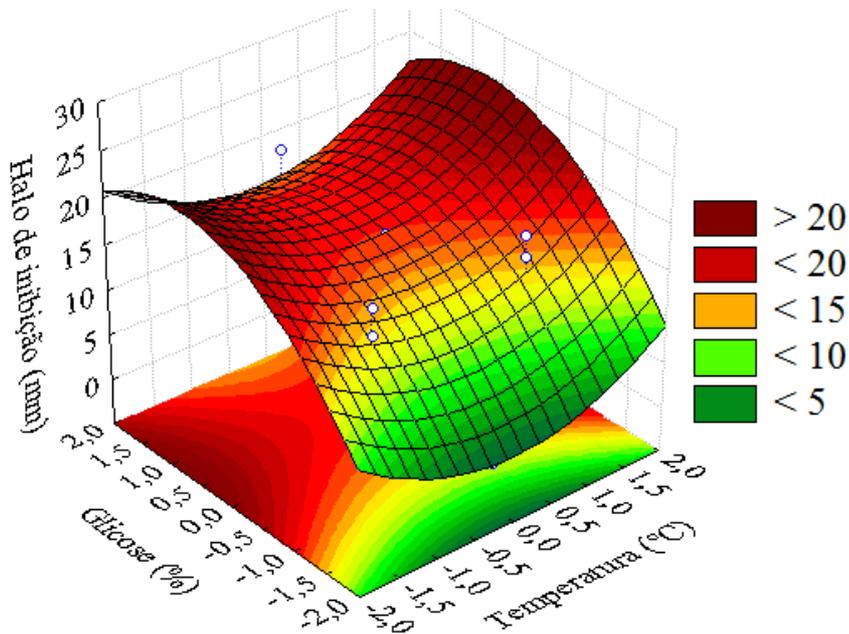


Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

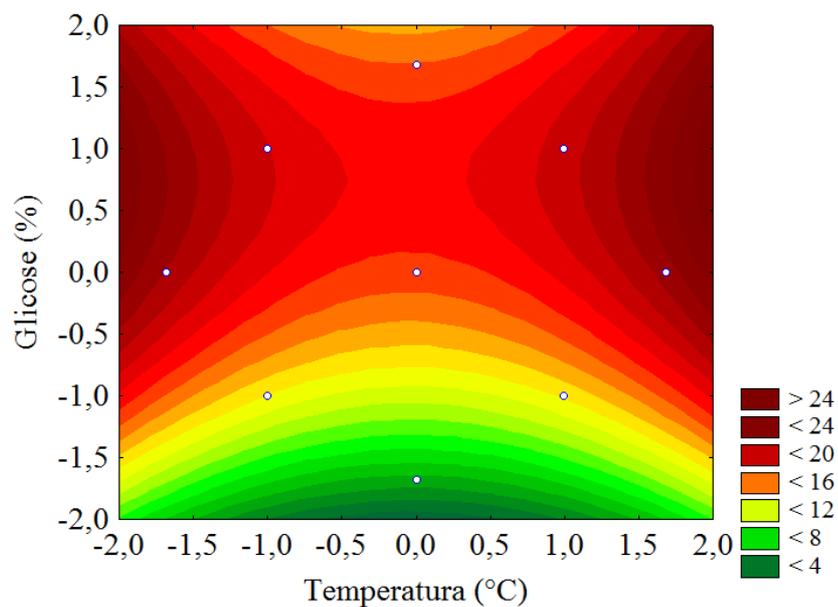
De posse dos valores da regressão, obteve-se o modelo matemático que representa o processo de produção da substância peptídica pelo isolado LLH20,

mostrado na Equação 1, onde  $HI$  é o halo de inibição (mm) e  $Gli$  é a concentração de glicose (% m / v). De posse da equação, obteve-se a Superfície de Resposta e a Curva e contorno, mostradas na Figura 3.

Figura 3 - Superfície de Resposta (a) e Curva de Contorno (b) referentes ao processo de produção da substância peptídica produzida pelo isolado LLH20.



(a)



(b)

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

Verifica-se que as regiões onde estão os halos de inibição de tamanho maior que 20 mm são correspondentes aos níveis +1,68 (32°C) e -1,68 (22°C) para a temperatura e 0 (1,25%) para a glicose, o que corresponde as condições dos experimentos E9 e E10, cujo pH é 7,0. Para as próximas etapas da pesquisa, optou-se pela produção de substância de peptídica nas condições de 32°C, 1,25 % de glicose e pH 7,0. A escolha pela temperatura de 32 °C baseou-se na maior facilidade de controle da mesma, experimentalmente, bem como por esta temperatura estar dentro da faixa de crescimento da LLH20, que se caracteriza como um micro-organismo mesófilo.

Segundo Suganthi; Mohanasrinivasan (2015), em seu estudo com *Pediococcus pentosaceus*, isolado de vegetal fermentado, o modelo determinou as condições ótimas de 1,03% de soja, 2,4% de sacarose, 5,5 de pH e temperatura de 34,5 °C, onde o micro-organismo atingiu a produção de bacteriocina de 25600 UA/mL.

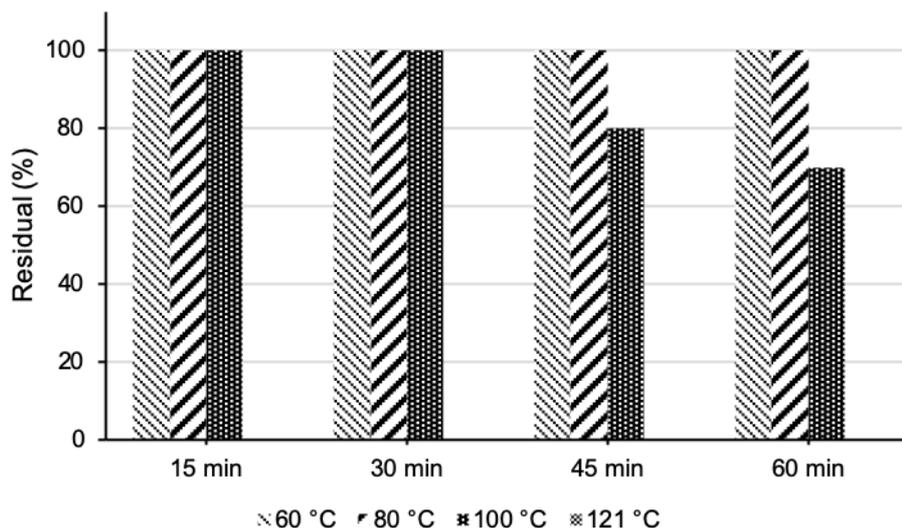
Barman et al. (2018) observaram a produção de bacteriocinas em três isolados de *L. lactis* obtidos de leite caseiro e constataram que a produção máxima de bacteriocinas foi em meio MRS. O pH ótimo de produção esteve entre 5,0 e 7,0 com melhor temperatura em 28 °C, seguida de 20 °C. Vale frisar que neste estudo os autores relatam uma diminuição significativa da produção da bacteriocina em 37 °C.

#### 5.4 ESTABILIDADE DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA PRODUZIDA PELO ISOLADO LLH20 A DIFERENTES TEMPERATURAS, AGENTES QUÍMICOS PH S E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os resultados de estabilidade da substância produzida pelo isolado na presença de agentes químicos, variações de pH e temperatura, estão apresentados na Figura 4 e Tabela 5.

É importante avaliar se a substância peptídica apresenta estabilidade a diferentes temperaturas utilizadas em processos de industrialização de alimentos. Desta forma pode-se decidir em que alimento poderá ser utilizado como bioconservante.

Figura 4 - Efeito da ação de diferentes temperaturas sobre a estabilidade da substância peptídica produzida pelo isolado LLH20.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

É possível verificar que a atividade da substância peptídica produzida pelo LLH20 contra *L. monocytogenes* manteve-se em 100% nas temperaturas 60, 80 e 100 °C até 30 min (Tabela 5).

Resultados semelhantes foram relatados por Kaktcham et al. (2019), onde verificaram que a nisina produzida pelos *L. lactis* subsp. *lactis*, isolados de Tilápia do Nilo e camarões, apresentaram termoestabilidade a 100 °C por 30 min, contudo, nas condições de autoclave 121°C/ 30 min, os autores relataram redução de 19% na atividade antimicrobiana da nisina.

Resultados diferentes foram relatados por Hwanhlem et al. (2013), onde a estabilidade da substância peptídica produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* diminuiu pela metade após 30 min a 100 °C.

Tabela 5 - Efeito da ação de agentes químicos e pH(s) sobre a estabilidade da substância peptídica produzida pelo isolado LLH20.

Tratamentos	
Agentes Químicos	%
Controle	100
SDS 1 %	100
Glicerina 1 %	95
Acetona 1 %	85
Tween 80 1 %	75
Triton X-100 1 %	75
Uréia 1 %	75
NaCl 1 %	75
Álcool 1 %	75
<b>pH</b>	
2,0	100
4,0	100
6,0	100
8,0	100
10,0	80
12,0	80

Fonte: elaborado pelo autor (2019).

(%): Residual de atividade da substância peptídica após o tratamento.

Controle: SLC não submetido aos tratamentos.

A estabilidade da substância peptídica a diferentes agentes químicos é de suma importância do ponto de vista tecnológico e laboratorial. O composto químico como o álcool e o SDS são utilizados nas etapas de purificação, identificações moleculares e bioquímicas ou mesmo adicionados durante a formulação de alimentos. A sensibilidade proteolítica a estes compostos químicos poderá interferir na identificação e caracterização e na aplicação em alimentos (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014).

Observa-se na Tabela 5 que a substância peptídica não perde sua atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* na presença de 10 % de SDS. De acordo com AHMAD et al., (2019), SDS, devido sua ação detergente, pode potencializar a atividade antimicrobiana das bacteriocinas, pois contribui na lise celular.

As substâncias químicas (Tabela 5) que mais influenciaram na atividade antimicrobiana dos peptídeos produzidos pelo LLH20 foram tween 80, triton X-100,

uréia, NaCl e álcool, com redução de 25% a atividade antilisterial comparado ao controle negativo, sem adição das substâncias químicas.

Kaktcham et al. (2019), relataram que a substância antimicrobiana não perdeu sua atividade na presença de 7 % de NaCl e 1,0 % de tween 80 e uréia.

A substância peptídica produzida pelo LLH20 apresenta estabilidade aos pHs que variaram entre ácidos e alcalinos (Tabela 5). No entanto, nos pHs alcalinos entre 10,0 e 12,0, houve redução de 20 % da atividade antilisterial da substância peptídica em relação ao pH neutro.

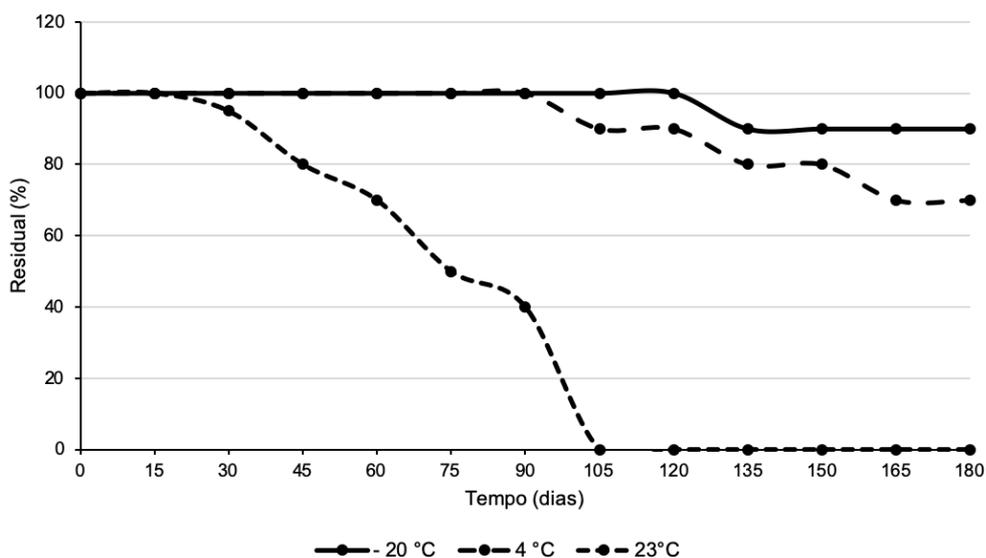
Resultado semelhante foi relatado por Kaktcham et al. (2019), onde verificaram alta atividade antimicrobiana da nisina em pH entre 2,0 e 10,0, no entanto acima de pH 10,0 perdeu a atividade.

A estabilidade térmica a 100°C por 30 min e à ampla faixa de pH, especialmente pH ácido e neutro da substância peptídica produzida pelo LLH20 pode ser uma vantagem para uso potencial como bioconservadores em alimentos (GROSU-TUDOR et al., 2014).

As bacteriocinas geralmente mantêm sua atividade antimicrobiana em vários valores de pH, no entanto exibem maior atividade inibitória em pH baixo. Quando o pH é reduzido, a solubilidade e a estabilidade das bacteriocinas tendem a aumentar drasticamente, provavelmente devido a melhor penetração de ácidos orgânicos na parede celular microbiana. Em contraste, condições de pH neutro e extremo alcalino podem resultar em agregação de proteínas ou instabilidade do peptídeo (SAELAO et al., 2017).

Na figura 5, estão apresentados os resultados da estabilidade da substância peptídica (%) produzido pelo LLH20 nas temperaturas de armazenamento -20, 4 e 23 °C, durante 180 dias.

Figura 5 - Estabilidade da substância peptídica (%) produzida pelo LLH20 durante 180 dias de armazenamento a - 20 °C, 4 °C; e 23 °C.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A substância peptídica manteve-se a sua atividade em 100 %, nas temperaturas de armazenamento -20, 4 e 23 °C, durante 105, 90 e 15 dias, respectivamente. A atividade da substância peptídica reduziu a 10 % e 30 %, nas temperaturas de armazenamento de -20 e 4 °C em 180 dias, respectivamente.

A atividade antimicrobiana da substância peptídica produzida pelo LLH20 foi mais sensível em temperatura de armazenamento de 23 °C, com redução de 50% em 75 dias, perdendo totalmente a sua eficiência em 105 dias de armazenamento (Figura 4).

Hwanhlem et al. (2013), avaliaram a atividade antimicrobiana de substância peptídica produzidas por *L. lactis* isolado de manguezais na Tailândia e obtiveram resultados quanto a sua estabilidade que se manteve em 100 % nas temperaturas de armazenamento de -20, 4 e 37 °C por 60, 52 e 14 dias, respectivamente.

Mojgani et al. (2009), relataram que a atividade bacteriocinogênica produzida por duas espécies de *Lactobacillus*, isolados de azeitonas verdes no Irã, teve atividade antimicrobiana preservada durante 3 anos, quando armazenada a -20 °C. No entanto, relatam atividade parcial (50 %), quando armazenada a 4 °C, por 120 dias.

Kaur et al. (2013), relatam que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus fermentum* isolado da microbiota vaginal humana, manteve sua estabilidade por um

ano armazenada a -20 °C, e até cinco meses a 4 °C em estado líquido ou liofilizado. Como observado neste estudo e dos autores citados, é nítido que a estabilidade da substância de origem peptídica (bacteriocina), é inversamente proporcional, ou seja, à medida que a temperatura aumenta diminui a atividade da substância.

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES PRODUTORES DE LANTIBIÓTICOS

O *L. lactis* pode sintetizar bacteriocinas da classe I chamados de lantibióticos. Os lantibióticos são peptídeos incomuns, gerados por mudanças pós-traducionais resultando na formação de aminoácidos não padronizados, como a lantionina e metilantionina (KUMARIYA et al., 2019). Estas mudanças são identificadas pela presença dos genes *lanB* e *lanC*, ou pelo gene *lanM* que codificam proteínas (HYINK; BALAKRISHNAN; TAGG, 2005).

O isolado LLH20 não amplificou os fragmentos que variam entre 200 e 500 pb, correspondente aos genes *lanB*, *lanC* e *lanM*, respectivamente, confirmando que o peptídeo não pertence a classe I (lantibióticos).

Resultados semelhantes foram relatados por Perin et al. (2012), dois isolados de *Lactococcus garvieae* não apresentaram os genes *lanB*, *lanC* e *lanM* para os lantibióticos. No entanto, esses isolados foram positivos para a presença de genes que codificam a nisina. Este resultado obtido por Perin confirma que há variação nas sequências dos genes que codificam os lantibióticos, o qual o peptídeo foi sintetizado mesmo não apresentando estes genes, isto devido as modificações pós-traducionais (PERIN et al., 2012; WIRAWAN et al., 2006).

Outro aspecto importante é que os genes *lanB* e *lanC* estão localizados no mesmo *operon*, o que leva a crer, que quando há a presença de um, consequentemente a presença do outro seria detectada (MCAULIFFE et al., 1998). No entanto, Perin et al. (2012) e Wirawan et al., (2006), observaram que em espécies de *Streptococcus* e *Lactococcus* não codificaram simultaneamente *lanB* e *lanC*, o que demonstra que a amplificação de apenas um dos genes é suficiente para considerar o isolado capaz de produzir lantibióticos (HYINK; BALAKRISHNAN; TAGG, 2005; PERIN et al., 2012; WIRAWAN et al., 2006).

Em estudo de Perin e Nero (2014), onde nos 30 isolados de *L. lactis* e *Enterococcus* foram identificados a presença de pelo menos um dos genes *lanB*,

*lanC* e *lanM* para lantibióticos, no entanto, nenhum apresentou simultaneamente os três genes.

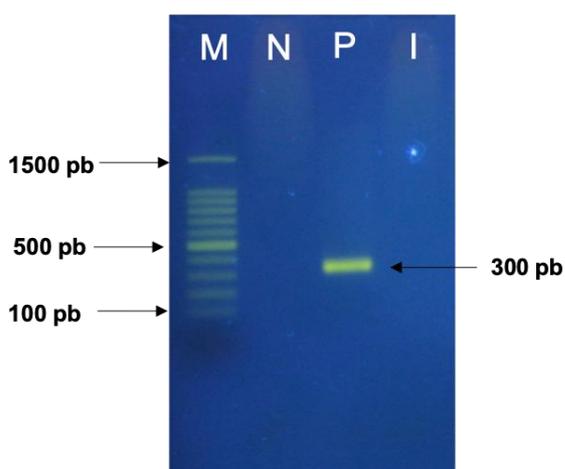
## 5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTERIOCINAS

A nisina é uma bacteriocina que apresenta diversas variantes naturais, sendo a nisina A, a primeira a ser descrita, existindo mais sete variantes. A diferenciação das variantes está no tamanho da molécula e na sequência de aminoácidos (FUSIEGER, 2019). A nisina A e Z são as que apresentam maior similaridade, diferindo apenas em um aminoácido na estrutura, a histidina está presente na nisina A e asparagina na nisina Z (PIPER et al., 2011).

Como pode ser observado na Figura 6, o isolado LLH20 não amplificou a região esperada de 300 pb referente ao gene estrutural da nisina A.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com produtos de PCR para identificação do gene de nisina. M: marcador de peso molecular de 100 pb; N: controle negativo; P: controle positivo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 (300 pb), e I: LLH20.

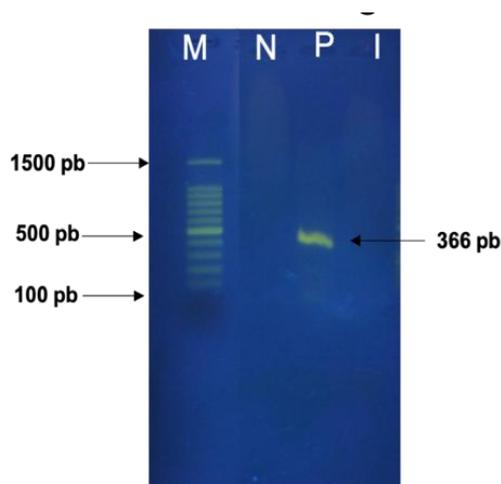
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.



De acordo com Ho et al., 2018, a nisina, bacteriocina pertencente a classe I são bem caracterizadas quanto ao seu potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. No entanto, Ribeiro et al. (2016), descrevem que outras bacteriocinas pertencentes a classe IIa exerçam maior efeito inibitório contra *L. monocytogenes* do que as bacteriocinas do grupo dos lantibióticos.

O isolado LLH20 não apresentou os genes referentes a síntese da lactococina 972, lacticina 3147 e lacticina 481 que correspondem as regiões de 350 pb, 105 pb e 366 pb, respectivamente.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR para identificação dos genes de Lacticina 481(C), M: marcador de peso molecular de 100 pb, N: controle negativo, P: controle positivo e I: Isolado LLH20.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

Resultado semelhante foi relatado por Ho et al. (2018) onde avaliaram 14 isolados de *L. lactis* com atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e nenhum apresentou os genes para lactococina 972 e lacticina 481. Biscola et al. (2013), identificaram a presença do gene da nisina e nenhum gene para lacticina 3147, lacticina 481 e lactococina 972 em *L. lactis* isolado de carne de charque.

As sequências genéticas para a produção das bacteriocinas, nisina, lacticina 3147, lacticina 481, lactococina 972 e lactococinas A, B, M e GQ foram pesquisadas em isolados de *L. lactis* de queijo lighvan por Attar e Colaboradores (2018). Em 11 isolados foram identificados a presença de pelo menos um dos genes de nisina, lactococina A, B, M ou QG. No entanto, não foram identificados *amplicons* para lacticina 3147, lacticina 481 e lactococina 972.

Estudos evidenciam a presença de mais de um gene responsável para a produção de bacteriocinas em um mesmo isolado (DAL BELLO et al., 2010; KONDROTIENE et al., 2018; PISANO et al., 2015), onde encontram lactococina B e nisina em isolados lácteos.

## 5.7 CARACTERÍSTICAS DE BIOSSEGURANÇA DO ISOLADO LLH20

Para a utilização de novos isolados de BAL em alimentos é necessário avaliar a segurança quanto a sensibilidade a antibióticos e a capacidade de ocasionar danos ao hospedeiro.

O isolado LLH20 foi sensível aos antimicrobianos ampicilina (10 µg), penicilina (10 µg), vancomicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg) de acordo com os padrões estabelecidos para *Enterococcus* pelo CLSI (2017). Resultados semelhantes foram relatados por Saelao et al. (2017), onde o *L. lactis* isolado de camarão fermentado tailandês foi sensível aos antibióticos ampicilina, vancomicina e tetraciclina.

Outros autores (FLÓREZ et al., 2007; ZYCKA-KRZESINSKA et al., 2015), relatam a sensibilidade de *L. lactis*, de origem láctea, a eritromicina, cloranfenicol e vancomicina, porém demonstraram resistência a clindamicina, tetraciclina e estreptomicina.

Yerlikaya (2019), descreve a sensibilidade de 14 isolados de *L. lactis* proveniente de leite e kefir aos antimicrobianos: ampicilina (10 µg) e penicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), destes um isolado apresentou resistência a tetraciclina (30 µg).

O isolado LLH20 não teve a capacidade de produzir as enzimas gelatinase e DNase.

A gelatinase é responsável em hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, e hemoglobina, podendo acarretar danos ao organismos do hospedeiro (COSTA, 2019). A enzima DNase é capaz de degradar o ácido nucleico (DNA) das células, permitindo, desta forma, o desenvolvimento de infecção no hospedeiro (ANACARSO et al., 2017).

Observou-se que o isolado LLH20 produziu hemólise incompleta, caracterizada como  $\alpha$ -hemólise. Este é um resultado indica que o isolado não oferece risco à saúde, tendo em vista, que as hemolisinas são agentes citotóxicos que contribuem para o poder invasivo da bactéria (EATON; GASSON, 2001).

Domingos-Lopes et al. (2017), relataram que em 144 isolados dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, oriundos de queijo artesanal do Pico, na região de Açores Portugal, foram negativos para a produção de Dnase. No entanto, 47 % foram positivos para gelatinase e 3,5 % para a produção da enzima  $\beta$ -hemolisina.

Moreno et al. (2018), em seu estudo com isolado *L. lactis* subsp. *hordniae* não identificou a presença dos fatores de virulência hemolisina e gelatinase.

## 5.8 PERFIL TECNOLÓGICO DO ISOLADO LLH20

### 5.8.1 Capacidade de formação de coágulo e acidificação

A fermentação láctea consiste na coagulação do leite pela ação fermentativa das BAL. Tais bactérias, promovem a acidificação do leite e conseqüentemente, a desestabilização das micelas de caseína a partir da produção de ácido de láctico e outros ácidos orgânicos (LUCHEY; JOHNSON; HORNE, 2003).

O isolado LLH20 demonstrou capacidade de lactofermentação, o qual produziu coágulo uniforme no leite como pode ser visualizado na Figura 8.

Resultado semelhante foi descrito por Texeira; Paulo; Mamédio (2016), onde dos três isolados do gênero *Lactobacillus* provenientes de casca do abacaxi, apenas um produziu coágulo uniforme, ou seja, apresentou boa capacidade de lactofermentação.

Fusieger (2019), em estudo com 23 *L. lactis* subsp. *lactis* isolados de diferentes ambientes, apenas sete isolados obtiveram a característica de coágulo uniforme, como observado neste estudo.

Figura 6 – Capacidade de formação de coágulo, onde A: coágulo uniforme formado pelo LLH20 em leite após 24 horas; B: controle negativo, leite sem a inoculação do isolado.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

A capacidade de acidificação é classificada como alta quando o micro-organismo produz ácidos orgânicos e diminui o pH em mais de 2,00 unidades em 24 horas (PSONI et al., 2007). O isolado LLH20 apresentou alta capacidade de acidificação, com redução de 2,18 unidades em 24 horas.

A atividade acidificante é uma característica importante para a seleção de isolados de BAL para utilização na fermentação láctea. As BAL com produção rápida de ácidos são comumente usadas como culturas iniciais, enquanto os produtores de ácido pobres podem ser usados como culturas adjuntas (HO et al., 2018).

Kondrotiene et al., (2018), avaliaram oito isolados de *L. lactis* produtores de nisina, destes, um isolado mostrou elevada atividade acidificante, diminuindo o pH inicial do leite em 2,39 unidades após 24 horas. Enquanto que outras espécies de BAL reduziram o pH inicial entre 1,3 e 1,94 unidades. Já no estudo de Moreno et al. (2018), isolados de *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *hordniae*, provenientes de leite e carne, respectivamente, apresentaram baixa capacidade acidificante.

### 5.8.2 Atividade Lipolítica

O isolado LLH20 não apresentou capacidade para a produção de enzimas lipolíticas. As enzimas lipolíticas são responsáveis pela hidrólise dos lipídios e produção de substâncias responsáveis pelo odor indesejável em lácteos (YERLIKAYA, 2019).

Resultados semelhante foi descrito por Kondrotiene et al. (2018), onde nenhum dos 12 isolados de *L. lactis* provenientes de trigo, leite de cabra e vaca apresentaram atividade lipolítica.

### 5.8.3 Atividade Proteolítica

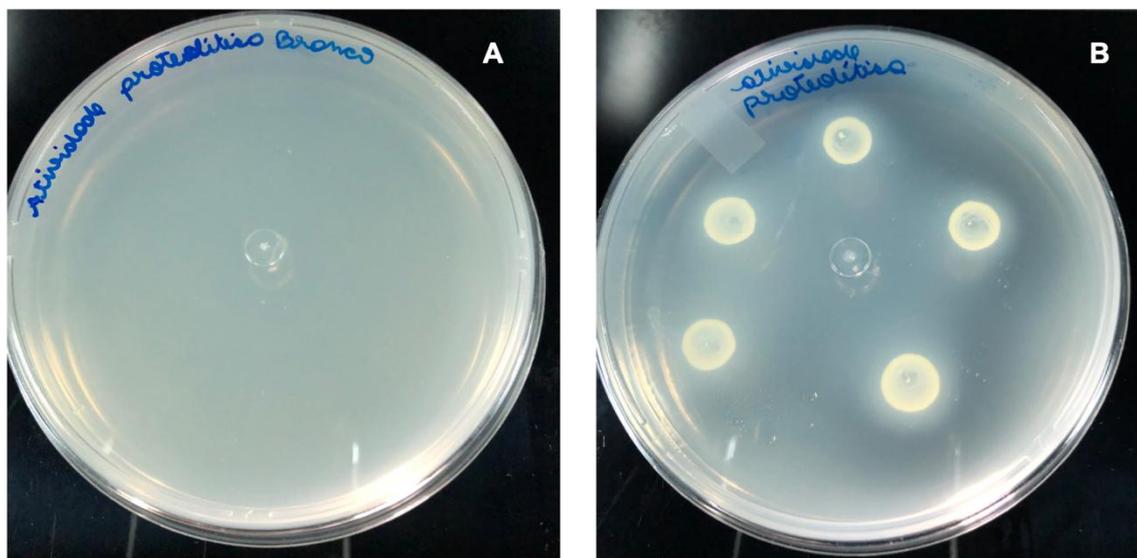
Na Figura 9, pode-se verificar que o isolado LLH20 apresentou alta atividade proteolítica, com a produção de halos de 20 mm.

A proteólise consiste no processo bioquímico que ocorrem durante a maturação de diferentes alimentos fermentados, contribuindo para a formação do *flavour* (TULINI et al., 2016). A principal contribuição das BAL para o *flavour*, atribui-se ao ácido láctico e aos compostos voláteis produzidos a partir da fermentação de carboidratos (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006).

Kondrotiene et al., (2018), identificaram atividade proteolítica em três isolados de *L. lactis*, oriundos da microbiota de trigo, leite de cabra e vaca.

Resultados diferentes foram descritos por Pisano et al. (2015), identificaram a atividade proteolítica em dez isolados de leite de ovelha, cabra e queijo, pertencentes a espécie *L. lactis*.

Figura 7 - Atividade proteolítica de LLH20, em meio PCA enriquecido com LDR 10 %(B). A- Controle negativo com MRS; B- crescimento do isolado e consumo.



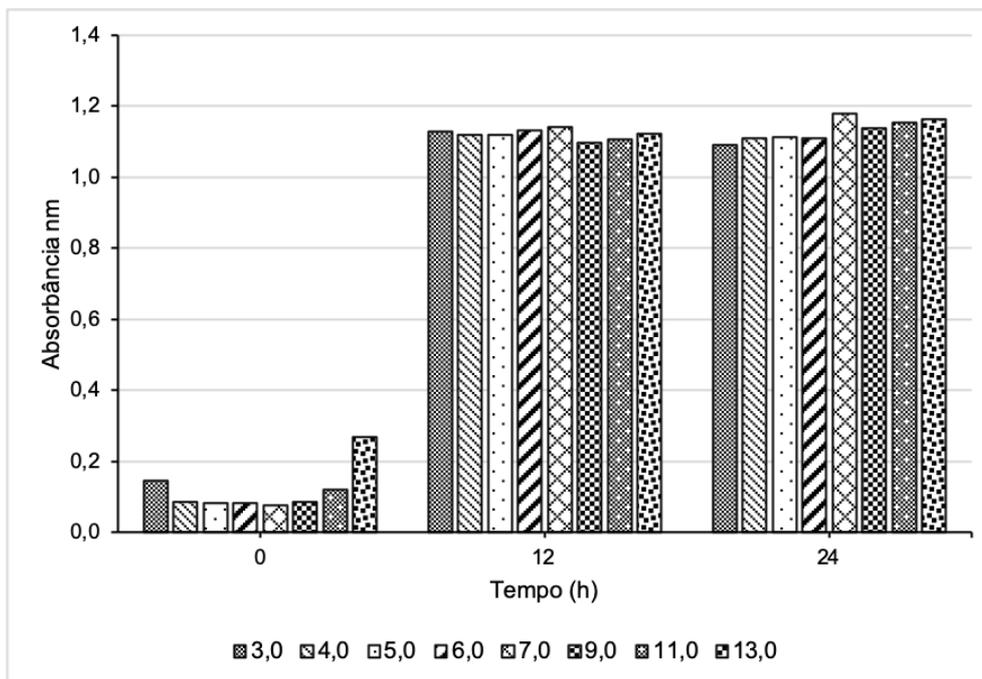
Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

#### 5.8.4 Crescimento em diferentes pH

O isolado LLH20 cresceu nas faixas de pH entre 2,0 e 13,0, apresentou bom desempenho no seu crescimento, tanto nos pHs ácidos, como em alcalinos (Figura 10). Do ponto de vista tecnológico, esta capacidade de multiplicação em diferentes pHs, reflete em potenciais aplicações do isolado em alimentos dos mais variados pHs.

Os gêneros *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp., são, em sua maioria, mais resistentes a pHs ácidos do que outros gêneros de BAL, como *Lactobacillus* spp. (TODOROV; FRANCO, 2018).

Figura 8 - Efeito dos pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0 na multiplicação do LLH20 em caldo MRS nos tempos zero (logo após inoculação), 12 e 24 horas de incubação a 37 °C.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019

Moreno et al. (2018), relataram que dois isolados de *Lactobacillus plantarum*, apresentaram taxas de sobrevivência de 97 %. Enquanto que em isolados de *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *hordniae* a taxa de sobrevivência foi de 74%.

Todorov e Franco (2018), relatam que *L. lactis* subsp. *lactis* isolado de rucúla não se multiplicou em caldo MRS nos pHs 3,0; 4,0 e 13,0.

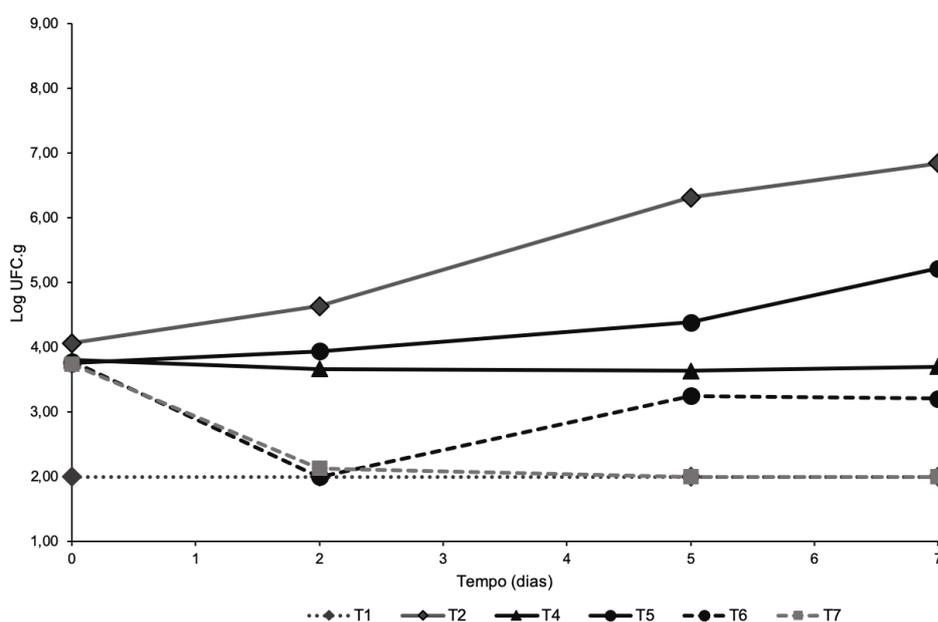
### 5.9 APLICAÇÃO DO ISOLADO DE LLH20 E DA SUBSTÂNCIA PEPTÍDICA COMO BIOCONSERVANTE EM ALFACE (*Lactuca sativa*) VARIEDADE CRESPA MINIMAMENTE PROCESSADA

O tratamento controle (T1), alface apenas sanitizada com hipoclorito de sódio 200 ppm, não apresentou crescimento de *L. monocytogenes* ao longo dos 7 dias de armazenamento a 4 °C (Figura 11). No entanto, o crescimento das BAL foi observado com contagens que variaram de < 2,00 log UFC.g<sup>-1</sup> a 3,16 log UFC.g<sup>-1</sup> no tempo zero e sétimo dia de armazenamento a 4 °C, respectivamente.

Vale ressaltar, que a alface possui em sua microbiota natural BAL assim como micro-organismos de outros grupos, e que o processo de sanitização visa reduzir a carga microbiana presente na mesma, não sendo possível a utilização de métodos de esterilização, considerando que a estrutura fisiológica desta matriz alimentar pode ser comprometida.

Na Figura 11, verifica-se que a *L. monocytogenes* (T2), se adaptou a superfície da alface minimamente processada e aumentou 2,78 log UFC.g<sup>-1</sup> durante os 7 dias de armazenamento a 4 °C. Este aumento nas contagens de *L. monocytogenes* durante o armazenamento era esperado, haja vista que o micro-organismo é psicotrófico (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Figura 11 - Efeito da cultura e dos peptídeos produzidos pelo LLH20 bem como da nisina contra *L. monocytogenes*, em alface minimamente processada e armazenada a 4 °C por 7 dias. Os tratamentos correspondem: T1 - Controle Negativo (alface higienizada); T2 – Controle positivo (crescimento de *L. monocytogenes*); T4 - crescimento de *L. monocytogenes* tratada com LLH20; T5- crescimento de *L. monocytogenes* tratada com SLC; T6 - crescimento de *L. monocytogenes* tratada com nisina; T7- Crescimento de *L. monocytogenes* tratada com SLC + nisina.



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2019.

O isolado LLH20 (tratamento T3), foi inoculado na alface minimamente processada na concentração de 7,58 log UFC.g<sup>-1</sup> e passou a 8,66 log UFC.g<sup>-1</sup> no sétimo dia de armazenamento a 4 °C (dado não apresentado na figura) (Apêndice 2). Houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em todos os tempos avaliados. Este aumento

na concentração do isolado LLH20 na alface pode ser explicado, devido ao micro-organismo estar adaptado a esta matriz alimentar, haja vista que foi obtido de alface.

Estudos afirmam que as BAL naturalmente encontradas em vegetais, possuem atividade inibitória contra muitos patógenos de origem alimentar (COSTA; VANETTI; PUSCHMANN, 2009; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2015).

Quando a alface foi submetida ao tratamento T4, adição de  $7,58 \log \text{UFC.g}^{-1}$  de LLH20, no tempo zero e sétimo dia de armazenamento, as médias de contagens de *L. monocytogenes* foram 3,81 e  $3,70 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente, não apresentando diferença significativa entre elas ( $p < 0,05$ ). No entanto, quando se comparou o tratamento 4 ao controle (T2), notou-se uma redução significativa ( $p > 0,05$ ), de  $3,15 \log \text{UFC.g}^{-1}$  nas contagens de *L. monocytogenes*. Com este resultado podemos inferir que o isolado LLH20, possui atividade bacterioestática contra *L. monocytogenes*.

Resultados inferiores foram observados por Mcmanamon et al., (2019), onde avaliaram a capacidade da nisina e do *L. lactis* em inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em alface *iceberg* e verificaram, em relação ao controle (*L. monocytogenes*), uma redução significativa de  $1,3 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , nos tratamentos com nisina, enquanto que no tratamento com *L. lactis*, a redução não foi significativa.

Siroli et al., (2017), analisaram o efeito do óleo essencial de tomilho e *L. lactis* na microbiota natural da alface cordeiro minimamente processada, armazenada a  $6^\circ\text{C}$  por 12 dias e constataram que a redução da microbiota natural da hortaliça não mostrou-se significativa, tanto para os tratamentos de *L. lactis* com ou sem associação de óleo de tomilho.

Observa-se (Figura 11), que para todos os tratamentos no tempo zero, após uma hora de contato das substâncias com a *L. monocytogenes* na alface, houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) de  $0,31 \log \text{UFC.g}^{-1}$  nas contagens de *L. monocytogenes* em relação ao controle (T2).

Para os resultados do T5, *L. monocytogenes* tratada com a substância peptídica, as contagens dos tempos zero e dois dias de armazenamento, não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), com valores de 3,76 e  $3,94 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, no quinto dia, o crescimento de *L. monocytogenes* aumentou  $0,63 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , chegando ao sétimo dia com  $5,22 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , ambas estatisticamente diferentes entre si e ao controle ( $p > 0,05$ ). Este resultado mostra que

esta substância possui capacidade bacteriostática, ou seja, inibe o desenvolvimento microbiano, porém, não elimina completamente a bactéria (BALI et al., 2016).

A *L. monocytogenes* em alface tratada com nisina (T6), apresentou contagem de 3,78 log UFC.g<sup>-1</sup> no tempo zero. No segundo dia de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* foi de < 2,00 log UFC.g<sup>-1</sup>. Entretanto, o micro-organismo retomou seu crescimento a partir do quinto dia (3,25 log UFC.g<sup>-1</sup>), atingindo no sétimo dia de armazenamento contagens de *L. monocytogenes* de 3,21 log UFC.g<sup>-1</sup> (Figura 11). Em comparação com o tempo zero, os tempos cinco e sete dias, apresentaram uma redução média significativa ( $p > 0,05$ ) de 0,55 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Na Figura 11, pode-se visualizar as contagens de *L. monocytogenes* em alfaces submetidas aos tratamentos com a substância peptídica produzida pelo LLH20 e a solução de nisina (T7). Houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) de 1,61 log UFC.g<sup>-1</sup> do micro-organismo no segundo dia de armazenamento em relação ao tempo zero (3,74 log UFC.g<sup>-1</sup>) (Apêndice 2). A partir do quinto de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* na alface foram de < 2,00 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Embora todos os tratamentos, sejam eles com a suspensão de células do LLH20 ou com as substâncias antimicrobianas, tenham apresentado redução significativa nas contagens de *L. monocytogenes*, quando comparado ao T2 (controle), o tratamento T7 (associação do SLC e nisina) foi o mais eficiente. Fato este que pode ser justificado pela utilização de duas substâncias associadas que podem potencializar a atividade antimicrobiana (BOELTER; BRANDELLI, 2016; WU et al., 2016).



## 6 CONCLUSÕES

- O isolado revelou capacidade antimicrobiana de natureza peptídica contra *L. monocytogenes*. No entanto, não apresentou genes para síntese de lantibióticos e para as s bacteriocinas nisina, lactococcina 972, lacticina 3147 e lacticina 481. Acredita-se que o LLH20 produz uma nova bacteriocina, pertencente a classe II;
- A produção máxima da substância peptídica foi obtida em 14 horas de crescimento do LLH20 nas concentrações de 1,25 % de glicose e pH 7,0;
- A substância peptídica produzida pelo LLH20 apresentou termoestabilidade, estabilidade a presença dos agentes químicos e pH entre 2,0 e 8,0.
- Quanto as temperaturas de armazenamento, a substância peptídica manteve-se com atividade residual de 100 % durante 105, 90 e 15 dias a -20, 4 e 23 °C, respectivamente. Sugere-se, o congelamento uma alternativa de prolongar a atividade da substância peptídica.
- Na avaliação da biossegurança, o isolado apresentou susceptibilidade aos antimicrobianos clínicos bem como não produziu as enzimas gelatinase, DNase e as hemolisinas. Estes resultados indicam que o isolado não apresenta riscos à saúde.
- O LLH20 apresentou capacidade de lactofermentação, acidificação, potencial proteolítico e capacidade de se multiplicar em diferentes pHs. Estes resultados mostram a viabilidade da aplicação do isolado como cultura iniciadora em vários alimentos.
- O isolado e a substância peptídica produzida pelo LLH20 podem ser utilizados na bioconservação de alface minimamente processada contra *L. monocytogenes*.
- O isolado e a substância peptídica produzida pelo LLH20 apresentam, atividade antilisterial bacteriostática.



## REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, S. *et al.* *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* affect the expression of nisin gene and its production by *Lactococcus lactis*. **Microbial pathogenesis**, v. 123, n. February, p. 28–35, 2018.

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177–183, 2014.

ACUÑA, L.; MORERO, R. D.; BELLOMIO, A. Development of Wide-Spectrum Hybrid Bacteriocins for Food Biopreservation. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1029–1049, 18 ago. 2011.

ALEGRÍA, Á. *et al.* Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 1–2, p. 61–66, 2010.

ALGBURI, A. *et al.* Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 1–16, 1 fev. 2017.

ANACARSO, I. *et al.* Isolation of two *lactobacilli*, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for potential food-preservative use. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 12, p. 2127–2134, 2017.

ATTAR, M. A. *et al.* Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from Lighvan cheese regarding the recognition of Nisin, Lacticin and Lactococcin structural genes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. October 2017, p. 186–191, 2018.

AZHAR, N. S.; ZIN, N. H. M.; ABDUL HAMID, T. H. T. *Lactococcus lactis* strain A5 producing nisin-like bacteriocin active against gram positive and negative bacteria. **Tropical Life Sciences Research**, v. 28, n. 2, p. 107–118, 2017.

BAKA, M. *et al.* Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters. **Journal of Food Safety**, v. 35, n. 2, p. 179–192, 2015.

- BALI, V. *et al.* Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 5, p. 817–834, 2016.
- BALI, V.; PANESAR, P. S.; BERA, M. B. Potential of Immobilization Technology in Bacteriocin Production and Antimicrobial Packaging. **Food Reviews International**, v. 30, n. 3, p. 244–263, 3 jul. 2014.
- BARBOSA, A. A. T. *et al.* Effects of nisin-incorporated films on the microbiological and physicochemical quality of minimally processed mangoes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 2–3, p. 135–140, 2013.
- BARBOSA, V. A. A. *et al.* Comparison of lettuce (*Lactuca sativa*) contamination from two types of farming. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. March, 2016.
- BARMAN, S. *et al.* Suppression of Leaf Blight of *Ocimum sanctum* L. Using Lactic Acid Bacteria as Novel Bio-control Agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 88, n. 4, p. 1389–1397, 2018.
- BASTOS, M. DO C. DE F.; COELHO, M. L. V.; SANTOS, O. C. DA S. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Microbiology Society**, v. 161, n. 4, p. 683–700, 1 abr. 2015.
- BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 413–423, abr. 2002.
- BISCOLA, V. *et al.* Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 607–613, 2013b.
- BOELTER, J. F.; BRANDELLI, A. Innovative bionanocomposite films of edible proteins containing liposome-encapsulated nisin and halloysite nanoclay. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 740–747, 2016.
- BOUALEM, K. *et al.* Development of an Encapsulation System for the Protection and Controlled Release of Antimicrobial Nisin at Meat Cooking Temperature. **Journal of Food Research**, v. 2, n. 3, p. 36, 24 abr. 2013.

BROMBERG, R. *et al.* Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 135–144, 2006.

CAI, Y. *et al.* *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1590–1594, 2011.

CARRASCOSA, C. *et al.* Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2606–2616, abr. 2016.

CASTELLANO, P. *et al.* A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, n. 3, p. 483–499, 2008.

CAVANAGH, D.; FITZGERALD, G. F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, v. 47, p. 45–61, 2015.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82–100, jul. 2003.

CHEN, Y. S. *et al.* *Lactococcus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from yan-tsai-shin (fermented broccoli stems). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 146–151, 2014.

CHEN, Y. SHENG *et al.* *Lactococcus taiwanensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fresh cummingcordia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART7, p. 2405–2409, 2013.

CHO, S. L. *et al.* *Lactococcus chungangensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from activated sludge foam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1844–1849, 2008.

COLLINS, M. D. *et al.* *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum*

sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 129, n. May, p. 3427–3431, 1983.

COSTA, R. J. DA. **Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A.** 2019. 124f. Tese (Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas- RS, 2019.

COSTA, W. A.; VANETTI, M. C. D.; PUSCHMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 785–792, 2009.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: Developing Innate Immunity For Food. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 95, 24 dez. 2013.

DA COSTA, R. J. *et al.* Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. **Journal of Food Quality**, v. 2019, p. 1–12, 2019.

DA SILVA SABO, S. *et al.* Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527–536, 2014.

DAL BELLO, B. *et al.* Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1151–1159, 2010.

DAL BELLO, B. *et al.* Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 58–65, 2012.

DANIEL, C. *et al.* Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 499–508, 2011.

DE ARAUZ, L. J. *et al.* Nisin biotechnological production and application: a review.

**Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 3–4, p. 146–154, 2009.

DELBONI, R. R. **Dinâmica Populacional de Microrganismos e a Conservação de Alimentos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2009.

DELGADO, A. *et al.* Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. **Food Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 521–528, 2005.

DELGADO, A. *et al.* Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 2, p. 193–201, 2007.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. *et al.* Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178–190, 2017.

DRISSNER, D.; ZUERCHER, U. Safety of Food and Beverages: Fruits and Vegetables. In: **Encyclopedia of Food Safety**. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 3p. 253–259.

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**, v. 67, n. 4, p. 1628–1635, 2001.

ELIAS, S. DE O.; NORONHA, T. B.; TONDO, E. C. Assessment of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. **Food Microbiology**, v. 72, p. 206–213, jun. 2018.

ESPECHE, M. C. *et al.* Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 103–109, 2012.

FILHO, E. G. *et al.* **Mapeamento e quantificação da cadeia produtiva das hortaliças do Brasil**. Brasília: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2017.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines'. **APPUZD MICROBIOLOGY**, v. 30, n. 6, p. 1040–1042, 1975.

FLÓREZ, A. B. *et al.* Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of new susceptibility-resistance cut-off values. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 3, p. 262–268, 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.

FRANCIOSI, E. *et al.* Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3–11, 2009.

FURTADO, D. N. *et al.* Goat milk and cheeses may be a good source for antilisterial bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 23, n. May 2016, p. 775–778, 2009.

FUSIEGER, A. **Technological Features and Ability to Produce Nisin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* Obtained from Dairy Environment**. [s.l.] Universidade Federal Viçosa, 2019.

GÁLVEZ, A. *et al.* Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

GÁLVEZ, A. *et al.* Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 125–152, 2008.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1–15, jan. 2007.

GARCÍA, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, v. 119, n. January, p. 207–220, 2019.

GASPAR, P. *et al.* From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 764–788, 2013.

GAUL, L. K. *et al.* Hospital-Acquired Listeriosis Outbreak Caused by Contaminated

Diced Celery—Texas, 2010. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 1, p. 20–26, 1 jan. 2013.

GHANBARI, M. *et al.* Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315–324, dez. 2013.

GHOMI, M. R. *et al.* Effect of sodium acetate and nisin on microbiological and chemical changes of cultured grass carp (*ctenopharyngodon idella*) during refrigerated storage. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 169–175, 2011.

GHRAIRI, T. *et al.* Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 621–628, 2004.

GOMIERO, T. Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. **Applied Soil Ecology**, v. 123, n. February, p. 714–728, fev. 2018.

GONZÁLEZ, L. *et al.* Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 592–597, 2010.

GOODMAN, L. B. *et al.* *Lactococcus petauri* sp. nov., isolated from an abscess of a sugar glider. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4397–4404, 2017.

GOYAL, C.; MALIK, R. K.; PRADHAN, D. Purification and characterization of a broad spectrum bacteriocin produced by a selected *Lactococcus lactis* strain 63 isolated from Indian dairy products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3683–3692, 2018.

GROSU-TUDOR, S. S. *et al.* Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 2459–2469, 2014.

GÜLLÜCE, M.; KARADAYI, M.; BARIŞ, Ö. Bacteriocins : Promising Natural Antimicrobials. **Microbial pathogens and strategies for combating**, v. 1, p. 1016–1027, 2013.

HAN, E. J. *et al.* Short communication: Bacteriocin KC24 produced by *Lactococcus lactis* KC24 from kimchi and its antilisterial effect in UHT milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 101–104, 2012.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Sensitivity and Resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to Nisin. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 11, p. 836–840, nov. 1991.

HENZ, G. P.; SUINAGA, F. **Comunicado Técnico 75: Tipos de alface cultivados no Brasil**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPH-2010/36477/1/cot-75.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA, A. M. *et al.* Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. June 2017, p. 249–257, 2018.

HO, V. T. T. *et al.* Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Control**, v. 85, p. 472–483, 2018.

HUANG, Y. T. *et al.* Listeriosis, Taiwan, 1996-2008. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 9, p. 1731–1733, set. 2011.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 139–150, 1998.

HWANHLEM, N. *et al.* Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 5, n. 4, p. 264–278, 2013.

HYINK, O.; BALAKRISHNAN, M.; TAGG, J. R. *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 235–241, 2005.

ITIS. ***Lactuca sativa* L**". **Integrated Taxonomic Information System**. Disponível em: <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=36607#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=36607#null)>. Acesso em: 15 jun. 2018.

IVANOVA, I. *et al.* Detection, Purification And Partial Characterization Of A Novel Bacteriocin Substance Produced By *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* B14 Isolated From Boza—Bulgarian Traditional Cereal Beverage. **BIOCATALYSIS-2000**:

**FUNDAMENTALS & APPLICATIONS**, v. 41, n. 6, p. 47–53, 2000.

JAGANNATH, A. *et al.* Nisin based stabilization of novel fruit and vegetable functional juices containing bacterial cellulose at ambient temperature. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1218–1222, 2014.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B. *et al.* Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3–4, p. 141–156, 2014.

JOZALA, A. F. *et al.* Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 515–528, abr. 2007.

JUODEIKIENE, G. *et al.* Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products. In: **Advances in Applied Biotechnology**. [s.l.] In Tech, 2012. p. 63–100.

KAKTCHAM, P. M. *et al.* Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2MT isolated from freshwater Nile tilapia in Cameroon: Bacteriocin screening, characterization, and optimization in a low-cost medium. **Lwt**, v. 107, n. January, p. 272–279, 2019.

KANMANI, P. *et al.* The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin production by an aquaculture probiotic *Enterococcus faecium* MC13 isolated from fish intestine. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 860–866, 26 mar. 2011.

KAŠKONIENĖ, V. *et al.* Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 4, p. 1323–1335, 2017.

KAUR, B. *et al.* Purification and Physicochemical Characterization of Anti-gardnerella vaginalis Bacteriocin HV6b Produced by *Lactobacillus fermentum* isolate from Human Vaginal Ecosystem. **American Journal of Biochemistry and Molecular**, v. 1, n. 3, p. 91–100, 2013.

KAVITAKE, D. *et al.* Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. **Food Bioscience**, v. 21, n. June 2017, p. 34–44, 2018.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 1, n. 3, p. 1–13, 2011.

KIM, W. **The genus *Lactococcus***. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2014. v. 1

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 and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 449–453, 1997.

KLJUJEV, I. *et al.* *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. **Microbial Pathogenesis**, v. 120, n. 3, p. 23–31, jul. 2018.

KONDROTIENE, K. *et al.* Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 507–514, 2018.

KUMARIYA, R. *et al.* Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. 1, p. 171–177, 2019.

LAHTINEN, S. *et al.* **Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects**. 4. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2012.

LAROUTE, V. *et al.* From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. **Microorganisms**, v. 5, n. 27, p. 1–17, 2017.

LE LAY, C. *et al.* Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 169–175, 2016.

LEROI, F. *et al.* Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 79–87, nov. 2015.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 270–285, fev. 2006.

LI, H.; O'SULLIVAN, D. J. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3392–3400, 2002.

LIU, J. *et al.* Identification of *Clostridium butyricum* as the bacteria causing soy sauce explosion and leakage and its control using nisin. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 509–513, 2013.

LIU, W. *et al.* Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: **Lactic Acid Bacteria**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 103–203.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725–2743, set. 2003.

MA, L. *et al.* Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 23–38, jun. 2017.

MAIA, L. F. *et al.* Influence of optimised commercial medium on bacteriocin production by *Enterococcus faecium*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 41, n. 1, p. 42324, 4 jul. 2019.

MARRA, A. *et al.* Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 59–65, 2007.

MAZZOLI, R. *et al.* Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 7, p. 1216–1236, 2014.

MCAULIFFE, O. *et al.* Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 439–445, 1998.

MCCAUGHEY, L. C. *et al.* Efficacy of species-specific protein antibiotics in a murine model of acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. 5, p. 1–8, 2016.

MCMANAMON, O. *et al.* Nisin application delays growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut iceberg lettuce in modified atmosphere packaging, while the bacterial community structure changes within one week of storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 185–195, 2019.

MESSAOUDI, S. *et al.* *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 296–304, dez. 2013.

MEUCCI, A. *et al.* *Lactococcus hircilactis* sp. nov. and *Lactococcus laudensis* sp. nov., isolated from milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2091–2096, 2015.

MIRANDA, R. O.; CAMPOS-GALVÃO, M. E. M.; NERO, L. A. Expression of genes associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin producer *Lactococcus lactis*. **Food Research International**, v. 105, p. 897–904, 2018.

MOJGANI, N. *et al.* Characterization of bacteriocin producing *L. brevis* & *L. fermentem* Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L. fermentum* NM 332 Isolated from Green Olives in Iran. **Journal of Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2009.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 185–198, 1999.

MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. L. Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity, and Relationship to Bacteriocins. In: **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. [s.l.] Elsevier, 1993. p. 1–22.

MORENO, I. *et al.* Evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic lactic acid bacteria strains isolated from meat products. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 762–774, 2018.

MORITA, H. *et al.* *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy

infant faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 2610–2615, 2011.

MOSBAH, A. *et al.* Novel Antifungal Compounds, Spermine-Like and Short Cyclic Poly lactates, Produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np in Yogurt. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–10, 9 out. 2018.

MÜLLER-AUFFERMANN, K. *et al.* Nisin and its usage in breweries: a review and discussion. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 3, p. 309–319, jul. 2015.

NASCIMENTO, M. DA S. DO; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos : uma revisão. **Braz. J. Food. Technol.**, v. 11, n. 2, p. 120–127, 2008.

NERIS, D. J. G. *et al.* Nisin in the biopreservation of Bordô ( Ives ) and Niágara table wines from Santa Catarina , Brazil Nisina na bioconservação de vinhos de mesa Bordô ( Ives ) e Niágara de Santa Catarina , Brasil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 176–183, 2013.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1189–1198, 2007.

O'CONNOR, P. M. *et al.* Nisin H Is a New Nisin Variant Produced by the Gut-Derived Strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 12, p. 3953–3960, 15 jun. 2015.

OLIVEIRA, M. *et al.* Biopreservative methods to control the growth of foodborne pathogens on fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 4–11, 2015.

OPSATA, M.; NES, I. F.; HOLO, H. Class IIa bacteriocin resistance in *Enterococcus faecalis* V583: The mannose PTS operon mediates global transcriptional responses. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 224, 2010.

PASSERINI, D. *et al.* New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 329–336, 2013.

PERALES-ADÁN, J. *et al.* LAB Bacteriocins Controlling the Food Isolated (Drug-Resistant) Staphylococci. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 12 jun. 2018.

PÉREZ, T. *et al.* *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1894–1898, 2011.

PERIN, L. M. *et al.* Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus isolates* from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal**, v. 25, n. 1, p. 46–51, 2012.

PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, 2014.

PILET, M.F.; LEROI, F. Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. In: **Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 324–347.

PIPER, C. *et al.* Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 375–382, maio 2011.

PISANO, M. B. *et al.* Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. **Food Control**, v. 51, p. 1–8, 2015.

PSONI, L. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 211–220, 2007.

RANDAZZO, C. L. *et al.* Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. **Food Control**, v. 20, n. 8, p. 756–763, 2009.

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

REA, M. C. *et al.* Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. In:

**Prokaryotic Antimicrobial Peptides**. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 29–53.

RIBEIRO, S. C. *et al.* An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 18–28, dez. 2016.

RODRÍGUEZ, E. *et al.* Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1–2, p. 7–15, 2000.

ROJO-BEZARES, B. *et al.* Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 32–36, 2007.

RUSSO, P. *et al.* Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. **Food Research International**, v. 77, p. 762–772, nov. 2015.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, Casa do Pão: São Paulo, 2005.

S. MYTHILI, R.; SATHIAVELU, A. Recovery of Bacteriocin (NISIN) from *Lactococcus lactis* and Testing its Ability to Increase the Shelf Life of Vegetables (Carrot and Beans). **Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 11, p. 727–730, 1 nov. 2010.

SAELAO, S. *et al.* Inhibition of *Staphylococcus aureus* in vitro by bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* KTH0-1S isolated from Thai fermented shrimp (Kung-som) and safety evaluation. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 4, p. 551–562, 2017.

ŞAHINGIL, D. *et al.* Characterization of lactococcin BZ produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BZ isolated from boza. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, n. 1, p. 21–33, 2011.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 1–8, ago. 2014.

SANTOS, M. I. S. *et al.* Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. **Food Control**, v. 50, p. 477–481, 2015.

SCHELEGUEDA, L. I.; GLIEMMO, M. F.; CAMPOS, C. A. Antimicrobial Synergic Effect of Chitosan with Sodium Lactate, Nisin or Potassium Sorbate against the Bacterial Flora of Fish. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 3, p. 272, 26 jul. 2012.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, n. 5, p. 158–164, 1996.

SCHLECH, W. F. New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. **Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale**, v. 7, n. 4, p. 321, 1984.

SCHLEIFER, K. H. *et al.* Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 183–195, 1985.

SCHREITER, S. *et al.* Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 144, p. 1–13, 8 abr. 2014.

SCHWARTZ, B. *et al.* Investigation of an Outbreak of Listeriosis: New Hypotheses for the Etiology of Epidemic *Listeria monocytogenes* Infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 4, p. 680–685, 1 abr. 1989.

SHIMIZU, H. *et al.* Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3134–3141, 1999.

SIROLI, L. *et al.* Effect of thyme essential oil and *Lactococcus lactis* CBM21 on the microbiota composition and quality of minimally processed lamb's lettuce. **Food Microbiology**, v. 68, p. 61–70, 2017.

SONG, A. A. L. *et al.* A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

SONZA, Elisa. **Microbiota de alface (*Lactuca sativa* VAR. *crispa*) minimamente processada**: caracterização e identificação de bactérias resistentes aos sanitizantes clorados utilizando o Sequenciamento de Nova Geração SNG . 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2018.

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 75–82, 2009.

SUGANTHI, V.; MOHANASRINIVASAN, V. Optimization studies for enhanced bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* KC692718 using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3773–3783, 2015.

SUINAGA, F. A. *et al.* **Desempenho produtivo de cultivares de alface crespa**. [s.l.] Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças, 2013.

SUN, Z. *et al.* Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 213–227, 2018.

TAYLOR, Bradley J.; QUINN, Adam R.; KATAOKA, Ai. *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods and ingredients. **Food Control**, v. 103, p. 153-160, 2019.

TAYLOR, R. H. *et al.* Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2754–2764, 2013.

TEUBER, M. The Genus *Lactococcus*. In: **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. [s.l.: s.n.]. v. 2p. 173–234.

TEXEIRA, A. P.; PAULO, E. M.; MAMÉDIO, I. M. P. **Desenvolvimento de uma bebida semelhante ao aluá, com fermentação controlada, utilizando bactérias lácticas isoladas da fermentação espontânea da casca do abacaxi**. Disponível em: <[http://www.papersearch.net/google\\_link/fulltext.asp?file\\_name=23005593.pdf](http://www.papersearch.net/google_link/fulltext.asp?file_name=23005593.pdf)>.

TODOROV, S. D. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. **Food Control**, v. 21, n. 7, p. 1011–1021, 2010.

TODOROV, S. D. *et al.* Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1351–1363, 2011.

TODOROV, S. D. et al. Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 3, p. 334–344, 23 set. 2017.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 11–19, 2006.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. In vitro study of some safety and beneficial properties of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MK02R. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 133–138, 2018.

TRIAS, R. et al. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1–2, p. 91–98, 2008.

TULINI, F. L. et al. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 1, p. 115–124, 26 fev. 2016.

USTYUGOVA, E. A. et al. Characteristics and identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 557–563, 24 nov. 2012.

VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. *Lactococcus garvieae* subsp. *bovis* subsp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild gaur (*Bos gaurus*) dung, and description of *Lactococcus garvieae* subsp. *garvieae* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 3805–3809, 2016.

VIEIRA, A. P. **Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

VOLOKHOV, D. V. et al. *Lactobacillus brantae* sp. nov., isolated from faeces of Canada geese (*Branta Canadensis*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 2068–2076, 2012.

VUYST, L. DE; VANDAMME, E. J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **Journal of General**

**Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 571–578, 1 mar. 1992.

WALKER, M.; PHILLIPS, C. A. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 974–981, out. 2008.

WAYAH, S. B.; PHILIP, K. Purification, characterization, mode of action, and enhanced production of *Salivaricin mmaye*, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* SPW1 of human gut origin. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 35, p. 39–47, 2018.

WILLIAMS, A. M.; FRYER, J. L.; COLLINS, M. D. *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. **FEMS Microbiology Letters**, v. 68, p. 109–114, 1990.

WILLIAMS, T. R. et al. Season, Irrigation, Leaf Age, and *Escherichia coli* Inoculation Influence the Bacterial Diversity in the Lettuce Phyllosphere. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–14, 2013.

WILLIAMS, T. R.; MARCO, M. L. Phyllosphere Microbiota Composition and Microbial Community Transplantation on Lettuce Plants Grown Indoors. **mBio**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 12 ago. 2014.

WIRAWAN, R. E. et al. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1148–1156, 2006.

WU, C. et al. Formation, characterization and release kinetics of chitosan/ $\gamma$ -PGA encapsulated nisin nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 52, p. 46686–46695, 2016.

YANG, S. C. et al. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 241, p. 1–10, 2014.

YANG, S. Y. et al. *Lactococcus nasutitermitis* sp. Nov. isolated from a termite gut. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 518–522, 2016.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 124–134, 2019.

YU, J. et al. Genome-level comparisons provide insight into the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZYCKA-KRZESINSKA, J. et al. Identification and characterization of tetracycline resistance in *Lactococcus lactis* isolated from Polish raw milk and fermented artisanal products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 134–141, 2015.

APÊNDICE 1 – Cinética de crescimento do isolado LLH20. Produção de substância antimicrobiana de origem peptídica (mm); Log UFC.mL<sup>-1</sup>; e valor de pH em caldo MRS a 30°C por 24h.

Tempo	Log UFC.g <sup>-1</sup>	pH	Atividade antimicrobiana (mm)
0	6,16 ± 0,02 <sup>f</sup>	6,35 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>e</sup>
2	7,09 ± 0,12 <sup>e</sup>	6,36 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>e</sup>
4	8,23 ± 0,12 <sup>d</sup>	6,31 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>e</sup>
6	8,19 ± 0,02 <sup>d</sup>	5,93 ± 0,01 <sup>b</sup>	16,25 ± 0,35 <sup>d</sup>
8	9,33 ± 0,14 <sup>bc</sup>	5,51 ± 0,04 <sup>c</sup>	17,25 ± 0,35 <sup>cd</sup>
10	9,57 ± 0,12 <sup>ab</sup>	5,16 ± 0,00 <sup>d</sup>	17,50 ± 0,71 <sup>cd</sup>
12	9,80 ± 0,14 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,03 <sup>e</sup>	18,00 ± 0,71 <sup>bc</sup>
14	9,44 ± 0,01 <sup>bc</sup>	4,91 ± 0,01 <sup>f</sup>	19,75 ± 0,35 <sup>a</sup>
16	9,58 ± 0,11 <sup>ab</sup>	4,89 ± 0,01 <sup>f</sup>	19,25 ± 0,35 <sup>a</sup>
18	9,35 ± 0,01 <sup>bc</sup>	4,82 ± 0,01 <sup>f</sup>	18,75 ± 0,35 <sup>ab</sup>
20	9,43 ± 0,05 <sup>bc</sup>	4,72 ± 0,01 <sup>g</sup>	19,75 ± 0,35 <sup>abc</sup>
22	9,19 ± 0,02 <sup>c</sup>	4,62 ± 0,01 <sup>h</sup>	19,75 ± 0,35 <sup>a</sup>
24	9,38 ± 0,00 <sup>bc</sup>	4,52 ± 0,01 <sup>i</sup>	19,50 ± 0,71 <sup>ab</sup>

Fonte: elaborado pelo autor (2019). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



APÊNDICE 2- Efeito da substância peptídica produzida por LLH20 e do micro-organismo (LLH20), e da nisina contra *L. monocytogenes* em alface minimamente processada e armazenada a 4 °C por 7 dias. Os tratamentos correspondem: T1 - controle (alface apenas higienizada em hipoclorito); T2 - crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC.g<sup>-1</sup>); T4 crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) tratada com *L. lactis* subsp. *hordniae*; T5 crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) tratada com SLC (5 mL); T6 - crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) tratada com nisina com (2,5 µg/ L); T7 crescimento de *L. monocytogenes* (Log UFC.g<sup>-1</sup>) tratada com SLC (5 mL) + nisina com (2,5 µL/ L).

Trata- mentos	T0		T2		T5		T7	
	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>
T1	<2,00 ± 0,01 <sup>dB</sup>	<2,00 ± 0,01 <sup>aC</sup>	2,33 ± 0,07 <sup>cB</sup>	<2,00 ± 0,01 <sup>aC</sup>	2,96 ± 0,06 <sup>bB</sup>	<2,00 ± 0,01 <sup>aE</sup>	3,16 ± 0,05 <sup>aC</sup>	<2,00 ± 0,01 <sup>aE</sup>
T2	-	4,07 ± 0,06 <sup>dA</sup>	-	4,64 ± 0,08 <sup>cA</sup>	-	6,32 ± 0,28 <sup>bA</sup>	-	6,85 ± 0,09 <sup>aA</sup>
T3	7,58 ± 0,08 <sup>dA</sup>	-	7,93 ± 0,04 <sup>cA</sup>	-	8,25 ± 0,10 <sup>bA</sup>	-	8,66 ± 0,10 <sup>aA</sup>	-
T4	7,64 ± 0,20 <sup>bA</sup>	3,81 ± 0,06 <sup>aB</sup>	7,89 ± 0,04 <sup>abA</sup>	3,67 ± 0,12 <sup>aB</sup>	8,10 ± 0,08 <sup>aA</sup>	3,64 ± 0,06 <sup>aC</sup>	8,20 ± 0,12 <sup>aB</sup>	3,70 ± 0,09 <sup>aC</sup>
T5	-	3,76 ± 0,09 <sup>cB</sup>	-	3,94 ± 0,19 <sup>cB</sup>	-	4,39 ± 0,14 <sup>bB</sup>	-	5,22 ± 0,10 <sup>aB</sup>
T6	-	3,78 ± 0,11 <sup>aB</sup>	-	<2,00 ± 0,01 <sup>cC</sup>	-	3,25 ± 0,05 <sup>bD</sup>	-	3,21 ± 0,07 <sup>bD</sup>
T7	-	3,74 ± 0,16 <sup>aB</sup>	-	2,13 ± 0,15 <sup>bC</sup>	-	<2,00 ± 0,00 <sup>bE</sup>	-	<2,00 ± 0,01 <sup>bE</sup>

Fonte: Elaborado pelo autor (2019). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey (p>0,05).

(-) Não se aplica.