



INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE VIANA DO CASTELO

Maria José Cancela Carvalho

Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial  
interesse na área alimentar

Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor Doutor Paulo Fernandes

e co-orientação de

Professora Doutora Joana Santos

Novembro 2015

## RESUMO

O envolvimento das bactérias lácticas em processos de biopreservação alimentar é reconhecido devido ao facto de estas serem produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos tais como, ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético, álcool e bacteriocinas. Nos últimos anos, grande parte dos estudos realizados sobre biopreservação tiveram como alvo principal as bacteriocinas. O facto de as bacteriocinas não provocarem alterações sensoriais indesejáveis nos alimentos e terem atividade específica contra determinados agentes patogénicos e deteriorantes tem aumentado o interesse da indústria alimentar sobre a potencial utilização destes compostos, por exemplo, na substituição de conservantes sintéticos.

Neste estudo foram aplicadas metodologias para o isolamento, purificação e identificação de bactérias lácticas a partir de culturas microbianas obtidas de alimentos. Posteriormente as bacteriocinas identificadas foram avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana e espectro de ação. Por fim foram caracterizadas quanto à sua estabilidade e outras características físico-químicas relevantes para a sua potencial utilização.

Bactérias isoladas, a partir de 5 amostras de alimentos diferentes, foram identificadas como estirpes de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*. As bacteriocinas produzidas por estas estirpes foram caracterizadas como péptidos de baixo peso molecular, com uma grande estabilidade térmica, ação inibitória praticamente independente do pH, uma elevada estabilidade perante diferentes tipos de agentes químicos e demonstraram ser ativos contra um elevado número de espécies de *Listeria* spp., sendo o seu mecanismo de ação aparentemente lítico.

Apesar de ainda serem necessários estudos complementares relativamente à caracterização das bacteriocinas e suas estirpes produtoras, as características e propriedades das diferentes bacteriocinas isoladas sugerem uma potencial utilização na área alimentar nomeadamente enquanto agentes com influência na estabilidade microbiana, e muito em particular com ação na inibição do desenvolvimento de *Listeria* spp..

## ABSTRACT

The involvement of lactic acid bacteria in food biopreservation is recognized by the fact that they are producing a variety of antimicrobial compounds such as lactic acid, carbon dioxide, acetic acid, alcohol and bacteriocins. In recent years, most studies on biopreservation had bacteriocins as main target. The fact that the bacteriocins would not result in undesirable sensory changes in food and having specific activity against certain pathogenic and spoilage agents has increased the interest of the food industry on the potential use of these compounds, for example, the replacement of chemical preservatives.

In this study, lactic acid bacteria producing bacteriocins were isolated from microbial cultures obtained from food and biochemically identified. Bacteriocins produced by those strains were evaluated for their antimicrobial activity and spectrum of inhibitory activity. Finally were characterized as to their stability and other physical and chemical characteristics relevant to their potential use.

Bacteria isolated from 5 different food samples were identified as *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. The bacteriocins produced by these strains were characterized as low molecular weight peptides, with a high thermal stability, inhibitory action with very low pH dependency, high stability towards different types of chemical agents and demonstrated to be active against a large number of *Listeria* spp. species, apparently with lytic action mechanism.

Although still needed further studies regarding the characterization of bacteriocins and their producer strains, the characteristics and properties of different isolated bacteriocins suggest a potential use in the food area such as agents that influence the microbial stability, and in particular with action in inhibiting development of *Listeria* spp..

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Paulo Fernandes, meu orientador, por ter proporcionado a realização deste trabalho. Tenho ainda a agradecer o interesse com que corrigiu este trabalho tendo atenção a todos os pormenores que muito contribuíram para o valorizar.

Ao Eng.º Vítor Monteiro, gostaria de agradecer o apoio, a paciência e todos os conhecimentos transmitidos. As suas ideias e correções foram fundamentais nomeadamente para a realização da parte prática deste trabalho.

À Carla Ramos e à Luísa Imperadeiro agradeço a disponibilidade de ajuda e boa disposição prestadas ao longo deste trabalho.

À Daniela Loureiro, Diana Barros, Liliana Carvalho e à Ana Lopes, as minhas companheiras nesta caminhada, devo agradecer não só a disponibilidade, dedicação e a amizade mas também por serem pessoas cinco estrelas com quem se pode contar em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos que aqui não foram mencionados, mas que ocupam um lugar muito especial no meu coração, muito obrigada por tudo!

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução.....  | 1  |
| 1.1. Bactérias ácido-lácticas e as suas propriedades antimicrobianas .....                                | 1  |
| 1.2. Bacteriocinas.....   | 5  |
| 1.3. Relevância das bacteriocinas na indústria alimentar e suas aplicabilidades .....                     | 11 |
| 2. Enquadramento do trabalho realizado.....   | 16 |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 16 |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 16 |
| 3. Materiais e Métodos.....   | 17 |
| 3.1. Rastreio de bacteriocinas a partir de culturas crio preservadas.....                                 | 17 |
| 3.2. Atividade inibitória .....   | 18 |
| 3.3. Efeito de enzimas proteolíticas nas bacteriocinas.....   | 18 |
| 3.4. Caracterização e Identificação das bactérias ácido lácticas (LAB) produtoras da bacteriocina.....    | 19 |
| 3.4.1. Caracterização Fenotípica e Morfológica .....  | 19 |
| 3.4.2. Identificação de LAB produtoras de Bacteriocinas .....   | 19 |
| 3.5. Espectro de ação das bacteriocinas isoladas contra diferentes estirpes bacterianas .....             | 19 |
| 3.6. Influência de agentes físicos e químicos na atividade da bacteriocina                                | 20 |
| 3.6.1. Estabilidade da bacteriocina quando exposta a diferentes temperaturas.....                         | 20 |
| 3.6.2. Efeito do pH na estabilidade da bacteriocina.....  | 20 |
| 3.6.3. Estabilidade da bacteriocina ao tratamento com detergentes e agentes químicos.....                 | 21 |
| 3.7. Purificação parcial da bacteriocina.....   | 21 |
| 3.8. Modo de ação da bacteriocina .....   | 22 |
| 3.9. Análise eletroforética da proteína parcialmente purificada por Tricina SDS-PAGE .....                | 22 |
| 3.10. Influência da proteína parcialmente purificada no crescimento da <i>L. monocytogenes</i> B218 ..... | 23 |
| 4. Apresentação e Discussão de Resultados .....   | 24 |

|   |    |
|---|----|
| 4.1. Rastreo de bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas .....           | 24 |
| 4.2. Caracterização das bactérias produtoras de potenciais bacteriocinas                      | 26 |
| 4.3. Caracterização das potenciais bacteriocinas .....  | 28 |
| 4.3.1. Espectro de ação.....  | 28 |
| 4.3.2. Modo de ação.....  | 30 |
| 4.3.3. Influência de agentes físicos e químicos na estabilidade e ação das bacteriocinas..... | 31 |
| 4.3.3.1. Temperatura e pH .....   | 31 |
| 4.3.3.2. Agentes químicos.....  | 34 |
| 4.3.4. Massa molecular relativa das bacteriocinas isoladas .....                              | 35 |
| 4.4. Efeito das potenciais bacteriocinas no crescimento da <i>L. monocytogenes B218</i> ..... | 36 |
| 5. Conclusões .....   | 38 |
| 6. Referências Bibliográficas .....   | 40 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Modo de ação das bacteriocinas em estudo .....   | 30 |
| Figura 2 – Estabilidade da bacteriocina B1271 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH .....   | 32 |
| Figura 3 – Estabilidade da bacteriocina B1272 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH .....   | 32 |
| Figura 4 – Estabilidade da bacteriocina B1273 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH .....   | 33 |
| Figura 5 – Estabilidade da bacteriocina B1275 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH .....   | 33 |
| Figura 6 - Estabilidade da bacteriocina B1276 quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH .....   | 33 |
| Figura 7 - Separação molecular das bacteriocinas por método SDS-PAGE e sua inibição contra a <i>L. monocytogenes</i> B218. 1 – Marcador molecular; 2 – B1271; 3 – B1272; 4 – B1273; 5 – B1276; 6 – B1275..... | 36 |
| Figura 8 – Influência das potenciais bacteriocinas em estudo no crescimento e viabilidade da <i>L. monocytogenes</i> B218.....  | 37 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Isolados com atividade anti- <i>Listeria</i> provenientes das culturas em estudo .....                                  | 24 |
| Tabela 2 – Resultados da verificação da identidade proteica das potenciais bacteriocinas provenientes das bactérias isoladas ..... | 25 |
| Tabela 3 – Referência interna atribuída, pelo laboratório UMA, aos isolados obtidos.....   | 27 |
| Tabela 4 – Efeito antimicrobiano das bacteriocinas em estudo, em bactérias Gram positivas e Gram negativas .....                   | 29 |
| Tabela 5 – Estabilidade térmica dos CFS, produzidos pelas LAB em estudo, quando submetidos a várias temperaturas .....             | 32 |
| Tabela 6 – Influência do tratamento do CFS das bactérias em estudo com detergentes e agentes químicos .....                        | 35 |



## ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

APT – Água Peptonada Tamponada

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Meio de cultura *Brain Heart Infusion*

CFS – *Cell Free Supernatant*

DOP – Denominação de Origem Protegida

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFSA – *European Food Safety Authority*

ESTG – Escola Superior de Tecnologia e Gestão

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – Generally Recognized as Safe

KDa – Kilo-Dalton

LAB – *Lactic Acid Bacteria*

MRSA – Meio de cultura *Man, Rogosa e Sharpe Agar*

MRSB – Meio de cultura *Man, Rogosa e Sharpe Broth*

OD – Densidade Ótica

QPS – *Qualified Presumption of Safety*

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TAA – Tampão Acetato de Amónio

TSA – Meio de cultura *Tryptone Soy Agar*

TSC – Meio de cultura *Tryptose Sulphite Cycloserine*

UA – Unidades Arbitrárias

UFC – Unidades Formadoras de Colónia

UMA – Unidade de Microbiologia Aplicada

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Bactérias ácido-lácticas e as suas propriedades antimicrobianas

A deterioração de um produto alimentar é caracterizada por qualquer alteração que neste ocorra e que o torne inaceitável para o consumidor a partir de um ponto de vista sensorial e de salubridade (Nychas *et al.*, 2008). Estas alterações podem ser expressas através de danos físicos, alterações químicas (oxidação, mudanças de cor) ou aparecimento de sabores e odores resultantes do metabolismo e crescimento microbiano no produto (Gram *et al.*, 2002).

A causa mais comum de deterioração dos alimentos é a de origem microbiológica. A presença de alguns microrganismos, nomeadamente os patogénicos e deteriorantes, em alimentos prontos para consumo pode, além de reduzir o tempo de prateleira, causar doenças de origem alimentar (intoxicações ou toxinfecções) pondo em risco a saúde do consumidor (Gram *et al.*, 2002; Rahman & Kang, 2009).

Para garantir a conservação dos alimentos e a saúde do consumidor, o fabricante/fornecedor deve empregar procedimentos eficazes para prevenir possíveis contaminações, principalmente de origem microbiana. A biopreservação constitui uma boa alternativa tecnológica para a produção de alimentos uma vez que, aumenta o tempo de vida útil e reforça a segurança dos produtos através da aplicação de microrganismos com ação antimicrobiana. Desta forma também é possível diminuir o uso de conservantes sintéticos o que torna o produto alimentar mais competitivo. (Deegan *et al.*, 2006; Devlieghere *et al.*, 2004; Quintavalla & Vicini, 2002).

Desde os tempos mais remotos é reconhecido o envolvimento de bactérias lácticas em processos de biopreservação alimentar e, provavelmente foi um dos primeiros meios, utilizados pelo ser humano, para a conservação de alimentos (Guerreiro *et al.*, 2014).

O conceito de bactéria ácido-láctica (LAB) como grupo de microrganismos foi desenvolvido durante o século XX. A interação das LAB na conservação de alimentos suscitou bastante interesse na comunidade científica e constituiu um contributo significativo para Pasteur no desenvolvimento do estudo da fermentação ácido-láctica (Saranraj *et al.*, 2013). A primeira cultura pura destas bactérias, na época designada por *Bacterium lactis*, foi obtida por Lister em 1873. No entanto foi Beijerinck, em 1901, quem descreveu pela primeira vez este grupo bacteriano baseado na sua capacidade de fermentação e coagulação do leite (Liu *et al.*, 2014; Stiles & Holzapfel, 1997).

As bactérias ácido-lácticas caracterizam-se como bacilos ou cocos geralmente imóveis, Gram-positivas, não-esporuladas, catalase e oxidase negativas, resistentes em meios ácidos. O seu pH e temperatura ótima de crescimento podem variar entre 4.0 e 4.5, e entre os 30°C e os 42°C. Preferencialmente realizam a fermentação em aerobiose, porém também são capazes de o fazer em ambientes anaeróbios (anaeróbias facultativas). Utilizam os açúcares como fonte primordial de energia sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação (Ali, 2010; Sabo *et al.*, 2014; Siamansouri *et al.*, 2013; Todorov & Franco, 2010).

Encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente encontradas em alimentos (laticínios, carnes e vegetais), solos, plantas e em seres humanos e animais (cavidade oral, trato respiratório, trato gastrointestinal e urogenital) (Lee & Paik, 2001; López-Díaz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2014).

Estas bactérias constituem um grupo bastante heterogéneo ao qual pertencem 11 géneros, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* sendo este último, o género mais estudado (Sabo *et al.*, 2014).

Uma vez que as bactérias lácticas estão presentes de forma natural em diversos alimentos como constituintes da sua flora endógena e devido ao facto de a maioria dos géneros, pertencentes a este grupo, não apresentarem riscos para a saúde humana estas são geralmente reconhecidas como sendo seguras pela FDA (GRAS – *generally recognized as safe*) e pela EFSA (QPS - *Qualified*

*presumption of safety*) (Guerreiro *et al.*, 2014; Lee & Paik, 2001; Saranraj *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012).

A nível industrial, entre outras aplicações, destacam-se os probióticos, muito conhecidos pelos seus benefícios para a saúde humana (Ali, 2010) e as culturas *starter* (Sankar *et al.*, 2012 ). Estas culturas são adicionadas diretamente no alimento aquando da sua confeção e intervêm nos processos fermentativos de alimentos e bebidas, exercendo relevantes papéis na produção de alimentos como o vinho, iogurtes, carnes processadas etc. As suas funções não se restringem ao envolvimento no processo produtivo, desempenhando por vezes um papel importante, não só a nível organolético mas também, na estabilidade microbiológica e conservação dos produtos (Guerreiro *et al.*, 2014; Noonpakdee *et al.*, 2003; Todorov & Dicks, 2004) pois, além de serem capazes de sobreviver por longos períodos de tempo sem alterar a qualidade do produto alimentar onde se encontram, exercem atividade antimicrobiana contra agentes patogénicos e deteriorantes de alimentos (Cotelo *et al.*, 2013; Gálvez *et al.*, 2007; Noonpakdee *et al.*, 2003).

Esta capacidade de biopreservação deve-se ao facto de as LAB serem produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos tais como, ácido láctico que, como referido anteriormente, constitui o principal produto da fermentação homoláctica, ou dióxido de carbono, ácido acético e/ ou álcool, produtos resultantes da fermentação heteroláctica e ainda, da produção de bacteriocinas (Ali, 2010; Todorov & Dicks, 2004; Todorov & Franco, 2010).

Nos últimos anos, grande parte dos estudos realizados sobre biopreservação tiveram como alvo principal as bacteriocinas. Estes incidiram fundamentalmente na sua deteção, produção, purificação, mecanismo de ação, caracterização bioquímica, propriedades bactericidas contra agentes patogénicos, microrganismos alvo e possíveis aplicações em alimentos (Vásquez *et al.*, 2009).

Além disso, o facto de as bacteriocinas não provocarem alterações sensoriais indesejáveis nos alimentos e terem atividade específica contra determinados patogénicos tem aumentado o interesse da indústria alimentar sobre a potencial

utilização destes compostos em substituição aos conservantes sintéticos (Gaamouche *et al.*, 2014; Hajikhani *et al.*, 2007).

## 1.2. Bacteriocinas

Por definição, bacteriocinas são pequenas proteínas ou péptidos com atividade antimicrobiana, produzidas tanto por bactérias Gram positivas como por bactérias Gram negativas, sintetizadas nos ribossomas das células bacterianas e libertadas para o meio extracelular tendo ação bactericida ou bacteriostática sobre o microrganismo alvo (Gálvez *et al.*, 2007; Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013; Sabo *et al.*, 2014; Todorov *et al.*, 2007).

As características de cada bacteriocina dependem da bactéria produtora que, naturalmente, é imune à sua própria bacteriocina (s). Contudo o seu espectro de ação antimicrobiano pode variar dependendo da bactéria alvo, podendo ser ativas contra bactérias de espécies geneticamente relacionadas (espectro de ação reduzido) ou contra bactérias pertencentes a outros géneros (espectro de ação alargado) (Cotter *et al.*, 2005; Digaitiene *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2011).

O primeiro registo sobre “bacteriocinas” foi datado em 1925 por André Gratia quando este comprovou que uma substância antimicrobiana produzida por *Escherichia coli*, atualmente conhecida por colicina e assim denominada em alusão ao microrganismo produtor, apresentava atividade bactericida contra outras estirpes de *E. coli* (Cotter *et al.*, 2005; Sabo *et al.*, 2014). Posteriormente os estudos desenvolvidos com esta bacteriocina demonstraram ser importantes pois permitiram o desenvolvimento de métodos básicos, atualmente utilizados para deteção e isolamento de outras bacteriocinas (Chen & Hoover, 2003; Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013; Lima & Filho, 2005).

Em 1928 a observação de um efeito inibitório, que algumas estirpes de *Lactococcus* spp. tiveram no crescimento de outras bactérias lácticas, despertou um crescente interesse pela descoberta da origem de tal fenómeno. Cinco anos mais tarde, constatou-se que o efeito inibitório era provocado por uma substância de origem proteica produzida pela bactéria responsável pela inibição (Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 1996; Sabo *et al.*, 2014).

Em 1947 Mattick e Hirsh, concentraram a partir de uma estirpe de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma bacteriocina, denominada nisina que só foi purificada e comercializada, pela primeira vez, em 1953 em Inglaterra. O termo “bacteriocina”

foi então proposto para designar péptidos antimicrobianos produzidos por microrganismos (Reeves, 1965). Em 1969, a nisina foi considerada segura para a saúde humana, pela *Food and Agriculture Organization/ World Health Organization Expert Committee on Food Aditives*, e desde então foi aprovada para uso alimentar em mais de 60 países (Cotter *et al.*, 2005; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Sankar *et al.*, 2012 ).

Na década de 80 esta bacteriocina foi adicionada à lista de aditivos alimentares europeia, com o número E234, e aprovada pela *Food and Drug Agency* (FDA) para uso na produção de queijos fundidos e pasteurizados, requeijão, leite e derivados (Collins *et al.*, 2010; Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013).

Hoje em dia, a nisina é uma bacteriocina amplamente estudada e a mais utilizada como conservante alimentar. Esta bacteriocina é um péptido formado por 34 aminoácidos, com peso molecular inferior a 5 KDa existente em duas variantes, a nisina A e a nisina Z cuja diferença é o aminoácido na posição 27. Na nisina A este aminoácido é a histidina e na nisina Z é a asparagina. A nisina é bastante estável até 121°C, contudo se a exposição ao calor for muito prolongada esta acaba por ser inativada, especialmente entre pH 5 a 7. Geralmente as estirpes produtoras desta bacteriocina são isoladas a partir de lacticínios, alguns vegetais e produtos cárneos fermentados (Noonpakdee *et al.*, 2003; Siamansouri *et al.*, 2013).

A nisina tem atividade contra microrganismos Gram positivos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*, que são conhecidos como responsáveis pela causa de diversos surtos de origem alimentar (Karam *et al.*, 2013; Martin-Visscher *et al.*, 2011; Zacharof & Lovitt, 2012). A sua atividade antimicrobiana contra a *L. monocytogenes* é um fator muito relevante no que respeita ao seu uso na indústria alimentar, pois este agente patogénico, além de ser conhecido como habitual contaminante de produtos alimentares é responsável por uma doença de origem alimentar denominada listeriose (Guerreiro *et al.*, 2014). A listeriose, em indivíduos adultos saudáveis apenas causa sintomas como febre, dores musculares, náuseas e diarreia, contudo, em crianças, idosos, grávidas e doentes imunodeprimidos esta constitui uma doença grave que em muitos casos



pode ser mortal (Elinav *et al.*, 2014; Hernandez-Milian & Payeras-Cifre, 2014; Silk *et al.*, 2014).

Normalmente a nisina não tem ação inibitória contra microrganismos Gram negativos. Isto dá-se porque a parede celular das bactérias Gram-negativas atua como uma barreira de permeabilidade celular e impede que a nisina atinja a membrana citoplasmática. No entanto, estudos comprovam que quando a nisina é utilizada em simultâneo com agentes quelantes (p. ex. EDTA) ou tensoativos (p. ex. SDS) estes podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina (Abriouel *et al.*, 2001; Martin-Visscher *et al.*, 2011; Samelis *et al.*, 2005).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, devido às suas características, são as de maior interesse para futura utilização na indústria alimentar e foram classificadas pela primeira vez por Klaenhammer em 1993 que as agrupou em quatro classes distintas de acordo com suas características bioquímicas e genéticas (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013).

Porém, com o isolamento e caracterização de novas bacteriocinas, outras classificações foram propostas, destacando-se as classificações elaboradas por Cleveland (2001), Cotter (2005), Heng (2007) e respetivos colaboradores pois são as mais utilizadas e citadas em vários estudos até agora realizados (Guerreiro *et al.*, 2014; Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013; Nishie *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2014; Sabo *et al.*, 2014; Zacharof & Lovitt, 2012). Assim as bacteriocinas provenientes de bactérias Gram positivas podem ser classificadas da seguinte forma (Cleveland *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Heng *et al.*, 2007):

**Classe I** – denominam-se lantibióticos, são compostos por péptidos termo estáveis de baixo peso molecular (<5 kDa, com aprox. 19 a 38 aminoácidos), caracterizados pela presença incomum de aminoácidos como a lantionina e  $\beta$ -metilantionina. Esta classe está subdividida em duas subclasses (**la e lb**), conforme a sua estrutura química e atividade antimicrobiana.

A **subclasse la**, que inclui a nisina (principal representante desta classe), é composta por péptidos lineares e flexíveis, catiónicos e hidrofóbicos que agem pela despolarização de membrana formando poros na membrana citoplasmática.

A **subclasse Ib** é composta por péptidos globulares com carga neutra ou negativa, que tem como mecanismo de ação a interferência no metabolismo celular através de reações enzimáticas.

**Classe II** – denominam-se não lantibióticos. São péptidos hidrofóbicos, termo estáveis de peso molecular inferior a 10 kDa (aprox. 37 a 48 aminoácidos) e constituem a maior classe de bacteriocinas sendo comumente divididos em três subclasses:

A **subclasse IIa** apresenta péptidos anti-*Listeria* com sequência de aminoácidos YGNGV (tirosina, glicina, asparagina, glicina e valina) na extremidade N-terminal. São exemplos: pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, mesentaricina Y105, entre outras.

A **subclasse IIb** contém bacteriocinas compostas por dois péptidos diferentes, que atuam em sinergia. São exemplos: lactacina F, lactococcina G e M.

A **subclasse IIc** apresenta péptidos, que requerem resíduos de cisteína reduzida para se tornarem ativos (p. ex. lactococcina B e carnobacteriocina A). Classificações mais recentes referem que esta classe apenas reúne as bacteriocinas da classe II que não pertencem à subclasse IIa ou IIb.

**Classe III** – Este grupo é constituído por péptidos termolábeis com peso molecular superior a 30 kDa. São exemplos, helveticina J, acidofilina A e lactacinas A e B.

**Classe IV** – São bacteriocinas complexas que contém, na sua estrutura, uma fração proteica e porções de hidratos de carbono ou lípidos. Contudo, Cleveland e seus colaboradores sugerem que estas bacteriocinas são artefactos da purificação parcial e não deveriam constituir uma classe (Cleveland *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente, as bacteriocinas são sintetizadas nos ribossomas das células bacterianas e libertadas para o meio extracelular tendo ação antimicrobiana sobre o microrganismo alvo.

Piard e Desmazeaud sugeriram que a biossíntese de bacteriocinas Gram positivas ocorre entre o final da fase exponencial e início da fase estacionária do desenvolvimento bacteriano (Gillor *et al.*, 2008; Piard & Desmazeaud, 1992).

Segundo Drider e seus colaboradores (Drider *et al.*, 2006) 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 microrganismos competitivos no meio, entre outros, podem interferir na produção de bacteriocina (Gálvez *et al.*, 2007; Sabo *et al.*, 2014).

Em relação ao modo de ação das bacteriocinas, têm sido propostos diferentes mecanismos. Estes dependem diretamente de fatores relacionados com a espécie bacteriana e as suas condições de crescimento, quantidade utilizada e até o seu grau de purificação (Chen & Hoover, 2003; Sabo *et al.*, 2014). Particularmente, a ação pode promover um efeito bactericida (com lise celular, ou sem lise celular - inibição da síntese de compostos essenciais à sobrevivência da célula) sendo este letal para a célula alvo ou bacteriostático, apenas impedindo a multiplicação celular (Cintas *et al.*, 2001; Devlieghere *et al.*, 2004; Sabo *et al.*, 2014).

Geralmente as bacteriocinas atuam ao nível da membrana citoplasmática em duas fases distintas. A primeira fase consiste na adsorção da bacteriocina aos recetores, específicos e não específicos, da membrana celular da bactéria alvo. Na segunda fase dá-se a inserção da bacteriocina na membrana. Ocorre a dissipação da força protónica (quimiosmose) que conduz a modificações no potencial da membrana e no gradiente de concentração do ião hidrogénio (H<sup>+</sup>). Estas modificações, originam a formação de poros na membrana citoplasmática provocando a saída de alguns compostos e/ou impedem a produção de ATP

necessários para síntese proteica comprometendo, assim, a viabilidade da célula (Ghraiiri *et al.*, 2012; Lima & Filho, 2005; Nishie *et al.*, 2012).

Tal como na produção, a eficácia das bacteriocinas pode ser igualmente afetada. A presença de microrganismos resistentes à bacteriocina ou o elevado o nível de contaminação do alimento podem diminuir a atividade deste composto antimicrobiano impedindo a sua ação contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos ou deteriorantes. Também, a presença de enzimas proteolíticas, a ocorrência de reações de oxidação-redução, a interação com os componentes da matriz alimentar (p. ex. lípidos, proteínas, conservantes, pH), as restrições de difusão, devido à alta concentração de sal e a presença de nitratos e nitritos e baixa atividade de água, que pode levar à distribuição inadequada da bacteriocina em todo o produto alimentar, são fatores que podem contribuir para a diminuição da atividade antimicrobiana (Devlieghere *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2007; Sabo *et al.*, 2014).

Graças ao seu reconhecido envolvimento na biopreservação de produtos fermentados e ao uso comercial da nisina, as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, têm atraído muito a atenção da comunidade científica nos últimos anos. Além disso, as bacteriocinas produzidas pelas LAB oferecem outras propriedades que as tornam adequadas para o uso na conservação de alimentos: são reconhecidas como substâncias seguras (GRAS); o seu espectro de ação contra agentes patogénicos de origem alimentar e bactérias deteriorantes é relativamente alargado; são normalmente tolerantes a uma gama alargada de temperatura e pH; não tem atividade em células eucarióticas; tornam-se inativas por ação das protéases, tendo pouca influência sobre a flora microbiana intestinal; não apresentam resistência cruzada com os antibióticos; podem ser manipuladas geneticamente através da inserção em plasmídeos (Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012).

### **1.3. Relevância das bacteriocinas na indústria alimentar e suas aplicabilidades**

Apesar do desenvolvimento tecnológico, a preservação de alimentos ainda é uma questão em debate, não só para os países em desenvolvimento (onde a implementação de tecnologias de conservação de alimentos é claramente necessária) mas também para a industrialização mundial (Gálvez *et al.*, 2007).

Atualmente, os produtos alimentares são selecionados por consumidores cada vez mais preocupados com a saúde, exigentes e mais despertos para níveis de qualidade elevado. A procura de produtos com propriedades benéficas, não só a nível nutricional mas também ao nível da segurança alimentar é cada vez mais frequente (Digaitiene *et al.*, 2012; Mills *et al.*, 2011).

A diminuição de perdas económicas devido à deterioração dos alimentos, a redução dos custos de processamento e a satisfação dos consumidores na procura de alimentos seguros, minimamente processados, livres de aditivos sintéticos, ricos em nutrientes e vitaminas e que mantenham as suas propriedades organoléticas, são os principais desafios para a indústria alimentar atual (Gálvez *et al.*, 2007).

Notavelmente, as bacteriocinas e outros péptidos bioativos têm um enorme potencial para contribuir para o cumprimento de vários desses requisitos, não só ao nível da segurança alimentar pela sua capacidade de biopreservação, como referido anteriormente, mas também pela sua influência na saúde humana. De acordo com Pritchard e colaboradores (Pritchard *et al.*, 2010), existem péptidos bioativos com um impacto positivo sobre as funções corporais que englobam numerosas atividades biológicas, incluindo processos hormonais, neurológicos, gastrointestinais, entre outros.

No estudo “*New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods*” (Mills *et al.*, 2011) os autores, além de exporem diversas aplicações inovadoras das bacteriocinas a nível alimentar, enfatizam o uso de péptidos bioativos na promoção da saúde através de uma variedade de atividades biológicas que estes péptidos podem exercer, por exemplo, na redução do risco de contrair doenças cardiovasculares ou na prevenção de doenças

cancerígenas. Afirmam ainda que estas atividades podem ser tão diversas que conseguem reproduzir efeitos semelhantes aos de alguns fármacos.

As bacteriocinas diferem dos antibióticos quanto à sua síntese, modo de ação, espectro de inibição, toxicidade e mecanismos de resistência (Chen & Hoover, 2003; Hassan *et al.*, 2012). Tecnicamente, antibióticos são metabolitos secundários sintetizados por enzimas que apresentam aplicação clínica. No caso das bacteriocinas, estas são proteínas sintetizadas no ribossoma, utilizadas na indústria alimentar para promover a bio preservação de produtos alimentares através da inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Até à data as bacteriocinas não são aplicadas em tratamentos clínicos. Se estas fossem consideradas antibióticos, não poderiam ser usadas em alimentos, já que o uso de antibióticos em produtos alimentares é proibido (Cleveland *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2012; Joerger, 2003).

De acordo com a FDA, os compostos antimicrobianos “naturais” só devem ser aplicados, como conservantes alimentares, se forem produzidos por microrganismos GRAS. Uma vez que muitas espécies de bactérias lácticas, produtoras de bacteriocinas, apresentam esse *status*, estas têm despertado grande interesse no contexto preservação (Cotter *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2012).

Atualmente existe uma ampla coleção de bacteriocinas que têm sido investigadas como potenciais agentes antimicrobianos para utilização na indústria alimentar, contudo, além da nisina apenas mais duas bacteriocinas estão disponíveis comercialmente. Ambas produzidas por *Pediococcus* ssp., são pediocinas usadas em processos de fermentação, designadas por ALTA 2351® (pediocina PA-1) e ALTA 2341®. De referir que a ALTA 2341® é uma pediocina produzida pela Quest International (Sarasota, Flórida) a partir de *P. acidilactici* e por apresentar uma boa atividade contra *L. monocytogenes*, o fabricante solicitou a sua aprovação pela FDA (Mills *et al.*, 2011; Sabo *et al.*, 2014).

A busca de bacteriocinas que apresentem resultados semelhantes ou superiores aos da nisina continua, acreditando-se que outras bacteriocinas possam ser exploradas e utilizadas com sucesso em alimentos e diversas aplicações criativas e comercialmente importantes. No entanto, é necessário, em primeiro

lugar, compreender a biologia das bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005; Lee & Paik, 2001; Sabo *et al.*, 2014).

Foi criada uma base de dados, denominada Bactibase ("Bactibase - database dedicated to bacteriocins," 2015), projetada para compilar a caracterização das bacteriocinas que vão sendo identificadas e caracterizadas. A informação nesta contida é de muito fácil acesso e permite uma previsão rápida da relação estrutura/função e organismo alvo destes péptidos facilitando a exploração da sua atividade biológica nos diferentes sectores. O número de entradas continua a crescer e atualmente (Novembro de 2015) contém cerca de 229 sequências de bacteriocinas na sua maioria produzidas por bactérias Gram-positivas, particularmente de LAB (Nishie *et al.*, 2012).

Visto que as LAB se encontram amplamente distribuídas na natureza, estas podem ser encontradas em alimentos como, carne e produtos cárneos fermentados, lacticínios, peixe, bebidas alcoólicas, saladas, ovo-produtos, produtos de pastelaria, alimentos enlatados e vegetais fermentados. De facto, a maioria das LAB produtoras de bacteriocinas, atualmente conhecidas, foram isoladas a partir destas matrizes alimentares (Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2010). Gálvez e colaboradores (Gálvez *et al.*, 2010) sugerem que para garantir a segurança microbiológica de um produto, este deve ser inoculado com a LAB que deste foi isolada, uma vez que consideram que estas se apresentam mais adaptadas ao meio.

As bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos via *ex situ* – adição direta da bacteriocina; ou via *in situ* – através da inoculação direta com uma estirpe produtora de bacteriocina sob condições que favorecem a produção do composto antimicrobiano.

No primeiro caso, a bacteriocina pode ser obtida e aplicada de duas formas: (i) a bacteriocina é submetida a um processo que permite separa-la do sobrenadante onde se encontra e de outros metabolitos excretados pela estirpe produtora. Findo todo o processo a bacteriocina pode ser adicionada diretamente ao alimento sob a forma purificada ou parcialmente purificada (p. ex. E234); (ii) ser adicionada sob a forma de um ingrediente concentrado, resultante da fermentação de uma cultura produtora (p. ex. ALTA 2351). É importante referir

que ambas as aplicações exigem, do ponto de vista legislativo, a aprovação específica como conservante alimentar.

No segundo caso, a estirpe produtora é adicionada diretamente como uma cultura *starter* e a bacteriocina é produzida no alimento. Quando utilizada desta forma, a estirpe produtora deve ser capaz de realizar o processo de fermentação desejado e, ainda, produzir bacteriocina em quantidades suficientes para exercer a sua ação (Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007; Mills *et al.*, 2011).

Segundo Gálvez e colaboradores (Gálvez *et al.*, 2007), a produção de bacteriocina via *in situ* oferece mais vantagens em relação à produção *ex situ* no que refere a aspetos económicos e legais.

Com o acumular de trabalhos realizadas nos últimos anos, tem sido demonstrado que as bacteriocinas tem um bom potencial na biopreservação alimentar, quer estas sejam utilizadas isoladamente, quer sejam utilizadas em conjunto com outros métodos de conservação.

Estudos comprovam que muitas bacteriocinas demonstraram ter um efeito mais eficaz quando utilizadas em sinergia com outros agentes antimicrobianos (p. ex. NaCl, ácidos orgânicos, agentes quelantes, óleos essenciais e outras bacteriocinas) (Gálvez *et al.*, 2007; Martin-Visscher *et al.*, 2011; Mills *et al.*, 2011). Um bom exemplo desta relação é a nisina, que tem maior eficácia contra bactérias Gram negativas, quando utilizada em conjunto com o EDTA.

A possibilidade de manipular geneticamente as LAB produtoras de bacteriocinas, também tem despertado grande interesse na comunidade científica (Lee & Paik, 2001; Nes *et al.*, 1996). Mills e seus colaboradores (Mills *et al.*, 2011) salientam que a bioengenharia pode ser explorada no sentido de melhorar a solubilidade e a estabilidade das bacteriocinas, aumentar o espectro de inibição e a atividade antimicrobiana. A natureza dos genes que codificam as bacteriocinas faz destas moléculas antimicrobianas as candidatas ideais para aplicação de estratégias de bioengenharia. Assim, podem ser geradas, através de mutações ou junções genéticas, “novas” bacteriocinas com propriedades mais desejáveis.

Outra aplicação interessante das bacteriocinas tem a ver com a sua adsorção em películas para uso alimentar (Mills *et al.*, 2011). Gálvez e colaboradores



(Gálvez *et al.*, 2007) destacam que as bacteriocinas poderão se utilizadas no desenvolvimento de embalagens bioativas. As embalagens tradicionais proporcionam suporte mecânico e proteção contra influências físicas externas, contudo não tem uma interação ativa na conservação dos alimentos. Pelo contrário, as embalagens bioativas devem ter a capacidade de interagir com o alimento e/ou ambiente envolvente, inativando os microrganismos que se encontram na superfície deste. O autor reforça ainda, que este sistema pode oferecer oportunidades inovadoras para explorar todo o potencial destes compostos antimicrobianos.

De um modo geral, as aplicações das bacteriocinas na conservação de alimentos conferem vários benefícios e vantagens que satisfazem, não só as necessidades da indústria alimentar, mas também as exigências do consumidor atual. Por isso, importa produzir bens diferenciáveis com valor acrescentado. As adaptações das tecnologias tradicionais à modernização dos processos produtivos são perfeitamente aceitáveis e conciliáveis, se não mesmo desejáveis. O seu limite é a manutenção da genuinidade dos produtos.

## **2. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO REALIZADO**

O presente projeto decorreu no laboratório “ Unidade de Microbiologia Aplicada – UMA” na Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo (ESTG) (laboratório acreditado, segundo a NP EN ISO 17025:2005, para análises microbiológicas de alimentos e águas).

### **2.1. Objetivo geral**

Isolar estirpes produtoras de bacteriocinas, provenientes de amostras crio preservadas e sua caracterização em função das condições de produção da bacteriocina e características bioquímicas, para aplicação futura em alguns alimentos tornando-os mais seguros do ponto de vista alimentar.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Identificar, isolar e obter culturas puras de bactérias lácticas a partir de culturas microbianas obtidas de alimentos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das bacteriocinas identificadas, bem como o seu espectro de ação;
- Caracterizar parcialmente as bacteriocinas isoladas em termos de estabilidade e outras características físico-químicas relevantes para a sua potencial utilização.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Rastreamento de bacteriocinas a partir de culturas criopreservadas

As culturas analisadas foram obtidas a partir de amostras de diversos tipos de alimentos, por crescimento em meio APT (Merck, Darmstadt, Germany), incubadas durante 18 horas a 30°C e posteriormente criopreservadas a -80°C com 20% (v/v) de glicerol (Merck).

No total foram testadas 99 culturas. As culturas foram regeneradas, ressuspensando o *pellet*, obtido por centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos (Mikro 20, Hettich, Germany), em 1mL de MRSB (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) e incubado durante 1 hora a 30°C.

Foram feitas diluições decimais em meio MRSB (Biokar) até  $10^{-5}$ . Esta diluição foi plaqueada por espalhamento em meio MRSA (Biokar), previamente preparado segundo instruções do fabricante, e distribuído em placas de *Petri* ( $\varnothing = 90\text{mm}$ ), e incubadas a 30°C durante 48 horas.

Para cada cultura foram isoladas 4 a 5 colônias, de morfologia distinta. Cada colônia foi inoculada em 1mL de MRSB (Biokar) e incubada a 30°C durante a noite.

Foi obtido o CFS de cada cultura por centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos (Hettich) e testada a sua atividade inibitória como descrito em 3.2.

As culturas, cujo CFS apresentou poder de inibição, foram renovadas em MRSB (Biokar) e incubadas a 30°C durante a noite. Posteriormente foram criopreservadas a -80°C com 20% (v/v) de glicerol (Merck).

### **3.2. Atividade inibitória**

A determinação da atividade inibitória foi realizada através do método *spot-on-the-lawn*, descrito por Stecchini e colaboradores (Stecchini *et al.*, 1995), em placas de Petri com meio TSA (Biokar) previamente inoculadas, por incorporação, com *L. monocytogenes* B218 (estirpe selvagem, isolada de uma amostra alimentar, coleção UMA, Viana do Castelo, Portugal) com  $10^5$  UFC/mL e incubadas a 30°C durante a noite.

### **3.3. Efeito de enzimas proteolíticas nas bacteriocinas**

O CFS de cada cultura o.n. (18h, 30°C) foi obtido por centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos (Hettich) e foi tratado com tripsina 12mg/mL (Fluka, St. Louis, Missouri, USA) e catalase 10mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), com uma concentração final de 1mg/mL, como descrito por Guerreiro e colaboradores (Guerreiro *et al.*, 2014) e incubou-se a 37°C e 25°C, respetivamente, durante 2 horas. Findo o período de incubação efetuou-se uma inativação térmica das enzimas a 100°C durante 3 minutos (MAXI-GENE, Stuart Scientific, Red Hill, UK) e arrefecimento imediato em gelo. Para efeitos de controlo foi utilizado o CFS de cada cultura sem tratamento enzimático. O ensaio foi realizado em duplicado.

A atividade inibitória dos CFS's foi testada segundo descrito em 3.2.

### **3.4. Caracterização e Identificação das bactérias ácido lácticas (LAB) produtoras da bacteriocina**

#### **3.4.1. Caracterização Fenotípica e Morfológica**

As LAB produtoras de bacteriocinas foram caracterizadas fenotipicamente através do método da coloração de Gram, reação da Catalase utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (Sigma) e reação da Oxidase (Bactident Oxidase, Merck). Foram, ainda, analisadas quanto à morfologia das células por microscopia ótica a 100x (Nikon Eclipse 400, Japan).

#### **3.4.2. Identificação de LAB produtoras de Bacteriocinas**

A identificação das LAB produtoras de bacteriocinas foi realizada através da utilização de galerias bioquímicas API 50 CHL (BioMerieux SA, Marcy-l' Etoile, France), segundo as instruções do fabricante.

### **3.5. Espectro de ação das bacteriocinas isoladas contra diferentes estirpes bacterianas**

Uma vez neutralizado o pH das culturas LAB com uma solução de NaOH 3 M (Merck), foi obtido o CFS de cada cultura, por centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos (Hettich) e a sua atividade inibitória foi medida através do método *spot-on-the-lawn*, como descrito anteriormente. Para o efeito foram utilizadas placas de *Petri* com meio TSA (Biokar) ou TSC (Biokar) no caso do *C. perfringens*, previamente inoculadas, por incorporação, com culturas de estirpes bacterianas Gram positivas (*B. subtilis* (ATCC 6633); *S. aureus* (ATCC 25923); *E. faecalis* (ATCC 19433); *B.cereus* (ATCC 11778); *C. perfringens* (ATCC 13124); *L. plantarum* B391; *L. monocytogenes 4b* (ATCC 13932); *L. ivanovii* B021; *L. innocua* B020; *L. monocytogenes* B218 e 57 estirpes selvagens de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de alimentos) e Gram negativas (*E. coli* (ATCC 8739); *P. aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella entérica* (ATCC 13076)) (coleção UMA, Viana do Castelo, Portugal) com, aproximadamente, 10<sup>5</sup> UFC/mL e incubadas a 30°C durante 24 horas.

A *L. monocytogenes* B218, inoculada nas mesmas condições, foi utilizada como controlo na determinação da atividade anti microbiana. O presente ensaio foi realizado em duplicado.

### **3.6. Influência de agentes físicos e químicos na atividade da bacteriocina**

#### **3.6.1. Estabilidade da bacteriocina quando exposta a diferentes temperaturas**

Obteve-se o CFS de cada cultura LAB, como descrito anteriormente, e tratou-se termicamente a diferentes temperaturas, nomeadamente 44°C, 65°C, 80°C 100°C (MAXI-GENE, Stuart Scientific) e 121°C (Sterilclav AES-28, Raypa, Barcelona, Espanha), por períodos de 10 e 20 minutos e em duplicado. Foi medida a atividade inibitória através do método descrito em 3.2.

#### **3.6.2. Efeito do pH na estabilidade da bacteriocina**

Inocularam-se 50mL de MRSB (Biokar) com 1mL da cultura LAB a testar e incubou-se a 30°C durante a noite.

Mediu-se o pH inicial (Orion 4 star, Thermo Scientific) e retirou-se amostra em quadruplicado (1mL x 4). Acertou-se o pH a 5.0, 6.0, 7.0 e 8.0, retirando as amostras entre cada acerto, como descrito anteriormente. Após obtenção do CFS o mesmo foi sujeito a filtração estéril (Sterile Syringe Filter 0.2µm, VWR, U.S.A.). Dois tubos de cada amostra foram submetidos a tratamento térmico (121°C, 20 min; Sterilclav AES-28, Raypa) e os restantes foram colocados a 4°C.

Efetuaram-se 11 diluições 1:2 sucessivas, mediu-se a atividade inibitória de cada suspensão, através do método descrito em 3.2., em UA/mL. As UA/mL foram calculadas segundo descrito por Guerreiro e seus colaboradores (Guerreiro, et al., 2014), em que estas foram definidas pela diluição onde não se observou nenhuma zona de inibição, sendo calculadas segundo a fórmula:  $2^n \times 100$ , em que n = nº da diluição que não apresentou zona de inibição.

### **3.6.3. Estabilidade da bacteriocina ao tratamento com detergentes e agentes químicos**

Obteve-se e esterilizou-se por filtração (Sterile Syringe Filter 0.2µm, VWR, U.S.A.) o CFS de cada uma das culturas LAB. Em tubos distintos e em duplicado, adicionou-se ao CFS, cada uma das seguintes soluções: Triton (20%), Tween80 (20%), SDS (20%) por forma a obter uma concentração final de 1% (p/v) e EDTA (20%) para obter uma concentração final de 2mM e incubou-se a 30°C durante 2 horas. Um tubo contendo apenas CFS foi submetido às mesmas condições, de tempo e temperatura, apenas para efeito de controlo.

De seguida foi testada a atividade inibitória de cada proteína pelo método descrito em 3.2.

### **3.7. Purificação parcial da bacteriocina**

Inocularam-se 20mL de MRSB (Biokar) com 400µl da cultura fresca de LAB produtora de bacteriocina e incubou-se durante a noite a 30°C. Foram pipetados 15mL do CFS obtido para um frasco e precipitada a proteína por adição de sulfato de amónio a 70% (p/v) (Pronalab), permanecendo a 4°C até ao dia seguinte. O precipitado foi recolhido e ressuspenso em 1.5mL (1% do volume inicial) de TAA 25mM, pH 6.5 (Acetato de amónio – PANREAC).

O total do volume foi depositado numa membrana de diálise (Sigma) e esta submersa em TAA 25mM, pH 6.5, substituído varias vezes e mantido a 4°C até ao dia seguinte.

O dialisado, sobrenadante contendo proteína parcialmente purificada, foi esterilizado por filtração (Sterile Syringe Filter 0.2µm, VWR), testado quanto à sua atividade inibitória em UA/mL como descrito anteriormente e conservado a 4°C.

Este procedimento foi realizado para cada uma das culturas de LAB produtoras das bacteriocinas em estudo, nomeadamente B1271, B1272, B1273, B1275 e B1276.

### **3.8. Modo de ação da bacteriocina**

Este procedimento foi adaptado do método descrito por Mardones e Venegas (Mardones & Venegas, 2000), em que a partir de uma cultura o.n. de *L. monocytogenes* B218 com 18 horas de incubação a 37°C, realizaram-se diluições decimais e a suspensão com 10<sup>7</sup> UFC/mL foi espalhada, com o auxílio de uma zaragatoa, em placas com meio ALOA (Oxoid, Basingstoks, Hants, England) previamente preparado segundo instruções do fabricante.

Foi colocado por *spot-on-the-lawn* 10µL de cada proteína parcialmente purificada, obtidas como descrito em 3.8, nas placas com ALOA. Para efeito de controle colocaram-se, também, *spot's* com Nisina 20000UA/mL (Singma), MRSB (Biokar) e TAA 25mM, pH 6.5 (Acetato de amónio - PANREAC). Após secagem durante aproximadamente 30 minutos, as placas foram a incubar a 30°C durante 48 horas.

### **3.9. Análise eletroforética da proteína parcialmente purificada por Tricina SDS-PAGE**

As bacteriocinas parcialmente purificadas foram separadas por electroforese em gel de Tricina SDS-PAGE. Este gel, composto por três camadas (empacotamento, intermédio e separação), foi preparado conforme descrito por Schägger & von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987), utilizando o sistema vertical Blue vertical 100, Serva Electrophoresis (Heidelberg, Germany).

As amostras foram preparadas adicionando NR-Sample Buffer (glicerol a 30% (w / v), 12% de SDS (w / v), 1% azul de Coomassie G-250 (Serva), 150mM Tris-HCl (pH 7,0)) às proteínas parcialmente purificadas (obtidas como descrito em 3.8) na proporção 3:1. Como padrões de massa molecular foram usados, *Protein Molecular Weight Markers (LMW)* (low range rainbow, Bio-Rad) e Insulina 3,5mg/mL (Lilly, Houten, Holand) juntos no mesmo poço do gel. Tanto as amostras como os padrões de massa molecular foram a incubar durante 1 hora a 37°C.

Colocaram-se as amostras e os padrões de massa molecular (Marker LMW + Insulina) nos respetivos poços do gel e ligou-se a fonte de alimentação E865



(Consort, Turnhout, Belgium) aplicando, inicialmente, uma corrente de 10mA, 150V durante 20 minutos aproximadamente, fazendo as amostras percorrerem a 1ª camada do gel (gel de empacotamento). Quando as amostras atingiram o gel intermédio aumentou-se a intensidade da corrente para 14mA e quando alcançaram o gel de separação aumentou-se, novamente, a intensidade da corrente para 18mA.

No fim deste processo a metade do gel contendo o marcador foi corada com solução corante de azul de *Coomassie* (0.025%) (FLUKA) e a outra metade foi colocada, assepticamente, numa placa de Petri (Ø= 150mm) com TSA (Biokar) e coberta com meio BHI agar, previamente inoculado com *L. monocytogenes* B218, com 10<sup>4</sup> UFC/mL e incubou-se a 30°C durante a noite.

### **3.10. Influência da proteína parcialmente purificada no crescimento da *L. monocytogenes* B218**

Regenerou-se uma cultura de *L. monocytogenes* B218 em meio BHI (Biokar) e incubação a 37°C durante a noite. Inoculou-se BHI com a cultura regenerada, monitorizando o seu crescimento até esta atingir uma O.D. = 0,05 (início da fase exponencial) (600nm - Helios Gamma, Unicam, England). Uma vez atingida esta O.D., foram adicionados 250µL de cada uma das bacteriocinas parcialmente purificadas a 25mL desta suspensão. Antes e após incubação (1 hora; 30°C), foi efetuada uma quantificação (UFC/mL), da *L. monocytogenes* B218 presente, por *drop-plate* em meio OXFORD (Oxoid).

Este trabalho foi realizado em duplicado.

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 4.1. Rastreio de bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas

O rastreio de bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas foi realizado em duas fases complementares. Primeiro, foi efetuado um isolamento das LAB a partir de 99 culturas provenientes de amostras de alimentos utilizando o método de rastreio descrito em 3.1 que consistiu, essencialmente, em realizar um enriquecimento seletivo em meio MRSB seguido de um isolamento em meio MRSA. O meio MRS é um meio que proporciona um bom crescimento de LAB, principalmente do género *Lactobacillus* spp. Posteriormente o CFS do meio onde cresceram os isolados foram testados quanto à sua atividade inibitória contra *L. monocytogenes* B218, como descrito em 3.2 e obtiveram-se os seguintes resultados (Tabela 1):

**Tabela 1** – Isolados com atividade anti-*Listeria* provenientes das culturas em estudo

| Ref. interna da amostra | Tipo de amostra  | Nº de isolados com atividade anti- <i>Listeria</i> | Ref. para o presente trabalho |
|-------------------------|--|--|-------------------------------|
| 01.41.13.009            | Leite de cabra cru                                     | 1  | Isolado 1                     |
| 01.15.14.004            | Chouriça de carne                                      | 3  | Isolados 2; 3; 4              |
| 01.13.14.005            | Chouriça para assar                                    | 2  | Isolados 5; 6                 |
| 01.08.14.003            | Carapau fumado   | 1  | Isolado 7                     |
| 01.40.13.005            | Carne de porco crua                                    | 1  | Isolado 8                     |
| 01.40.12.010            | Arroz de Marisco                                       | 1  | Isolado 9                     |
| 01.47.12.006            | Jardineira com arroz seco                              | 1  | Isolado 10                    |
| 01.47.12.025            | Lombo com arroz  | 2  | Isolados 11; 12               |
| 01.48.12.026            | Espetadas de peru com batata frita e arroz             | 2  | Isolados 13; 14               |
| 01.25.14.008            | Polvo fresco   | 1  | Isolado 15                    |
| 01.15.14.007            | Camarão cozido   | 1  | Isolado 16                    |
| 01.10.13.015            | Sande de filete com alface                             | 1  | Isolado 17                    |
| 01.48.13.005            | Salada Mista (cenoura, alface, tomate, feijão e massa) | 1  | Isolado 18                    |
| 01.48.13.008            | Pada de delícias com alface                            | 1  | Isolado 19                    |
| 01.48.13.009            | Salada mista (alface, cenoura e tomate)                | 2  | Isolados 20; 21               |

Das 99 culturas testadas 21 isolados, provenientes de 15 culturas, revelaram ter atividade positiva na inibição da *L. monocytogenes* B218.

Numa segunda fase foi realizado um teste de despistagem aos 21 isolados obtidos com objetivo de verificar se o efeito era, ou não, derivado da produção de bacteriocina. A possibilidade do CFS, de uma determinada cultura, inibir o crescimento de uma determinada bactéria pode ser atribuída a um conjunto de fatores que não apenas a expressão de bacteriocinas, nomeadamente a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o abaixamento de pH. Assim, e por forma a concluir a natureza proteica do fator envolvido na inibição do crescimento da *L. monocytogenes*, foi efetuado o tratamento proteolítico com tripsina, tendo também sido realizado o tratamento do CFS com catalase, degradando assim qualquer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potencialmente existente no CFS. Posto isto foi analisado, o efeito destas enzimas na atividade antimicrobiana das culturas em estudo, através do método simples *spot-on-the-lawn* e verificação da capacidade do CFS em criar um halo de inibição (como descrito em 3.3).

Dos 21 isolados, cujo CFS foi tratado com a enzima catalase, 5 não apresentaram qualquer mudança no seu comportamento antimicrobiano o que permite excluir o envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no processo de inibição. No que diz respeito ao tratamento com a tripsina, os mesmos 5 isolados revelaram uma perda total da atividade, o que confirma a natureza proteica da substância antimicrobiana produzida por estas bactérias.

Assim, pôde confirmar-se que as bactérias provenientes destes 5 isolados, indicadas na tabela seguinte, poderiam ser potenciais produtoras de péptidos com atividade antimicrobiana.

**Tabela 2** – Resultados da verificação da identidade proteica das potenciais bacteriocinas provenientes das bactérias isoladas

| Isolado | CFS sem tratamento enzimático | CFS com Catalase | CFS com Tripsina |
|---------|-------------------------------|------------------|------------------|
| 6       | +                             | +                | -                |
| 9       | +                             | +                | -                |
| 10      | +                             | +                | -                |
| 11      | +                             | +                | -                |
| 13      | +                             | +                | -                |

+ presença de halo de inibição; - ausência de halo de inibição

No estudo realizado por Guerreiro e seus colaboradores (Guerreiro *et al.*, 2014), a bacteriocina B231, produzida por *Lactobacillus pentosus* isolado de um queijo português DOP, apresentou um comportamento idêntico quando submetida aos mesmos tratamentos. Também Yang e colaboradores (Yang *et al.*, 2012) obtiveram resultados semelhantes num estudo realizado a 138 culturas LAB. Concluíram que 20% dos isolados demonstraram ter atividade anti-*Listeria* quando submetidos ao tratamento com a enzima catalase, quando tratados com a tripsina não tiveram qualquer ação antimicrobiana.

#### **4.2. Caracterização das bactérias produtoras de potenciais bacteriocinas**

Após a confirmação da natureza proteica do agente inibidor, as bactérias produtoras foram caracterizadas morfológicamente e bioquimicamente tendo sido identificadas por galeria bioquímica.

Todas as culturas, relativas aos isolados 6, 9, 10, 11 e 13, foram sujeitas a coloração de Gram, observação da morfologia por microscopia ótica e ainda verificação da sua atividade como produtoras de catalase e presença de oxidase (3.4.1).

Através da observação microscópica da coloração de Gram foi possível realizar, também, uma caracterização morfológica das células de cada bactéria em estudo, constatando-se que as estirpes testadas apresentavam forma de bacilos de cor violeta, verificando-se assim a presença de bacilos Gram positivos.

O teste da catalase é utilizado para detetar a presença da enzima catalase que é uma enzima intracelular, que decompõe o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigénio ( $O_2$ ). Esta reação química ocorre na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas que contêm citocromo (Alonso-Urmeneta *et al.*, 2000). As bactérias lácticas são desprovidas de citocromos, logo não apresentam reação aquando do contacto com esta enzima (catalase negativa) (Liu *et al.*, 2014).

Constatou-se que nenhuma das estirpes analisadas apresentou reação positiva aquando do contacto com o peróxido de hidrogénio, deste modo, todas as estirpes são catalase negativa.

Em relação à reação da oxidase, sendo esta uma enzima que ativa os citocromos através da transferência de eletrões para o oxigénio molecular, verificou-se que todas as estirpes demonstraram ser negativas, reforçando a ideia de que se tratavam de bactérias lácticas uma vez que estas não contêm citocromos (Merck KGaA, 2008).

A identificação bioquímica das bactérias em estudo foi realizada através da utilização de galerias bioquímicas API 50 CHL (3.4.2). Os resultados obtidos permitiram identificar os isolados 9, 10, 11 e 13 como *Lactobacillus brevis* com um grau de confiança de 90,2% e o isolado 6 como *Lactobacillus plantarum* com um grau de confiança de 99,8%.

Uma vez confirmada a origem bacteriana dos isolados em estudos, as bactérias lácticas obtidas foram integradas na coleção interna do laboratório UMA, sendo-lhes atribuído uma referência, que foi utilizada como meio de identificação na apresentação dos restantes resultados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Referência interna atribuída, pelo laboratório UMA, aos isolados obtidos

| Isolado | Ref. Interna |
|---------|--------------|
| 6       | B1275        |
| 9       | B1271        |
| 10      | B1272        |
| 11      | B1273        |
| 13      | B1276        |

### 4.3. Caracterização das potenciais bacteriocinas

#### 4.3.1. Espectro de ação

A atividade antimicrobiana das potenciais bacteriocinas B1271, B1272, B1273, B1275 e B1276 produzidas por bactérias lácticas pertencentes ao género *Lactobacillus* spp, como confirmado anteriormente em 4.2, foi testada em bactérias Gram positivas e Gram negativas como descrito em 3.5.

A avaliação do espectro de inibição constitui um fator importante quando se pretende avaliar uma possível aplicação da bacteriocina ou da sua bactéria produtora como um potencial probiótico, cultura *starter* ou simples inibidor do desenvolvimento microbiano quando adicionado a um alimento (Guerreiro *et al.*, 2014; Koch *et al.*, 2010).

Os testes realizados basearam-se no método *spot-on-the-lawn*, considerando-se que havia inibição aquando da existência de um halo com diâmetro superior a 5mm. Os resultados obtidos permitiram verificar que as bacteriocinas produzidas pelas LAB em estudo, *Lactobacillus brevis* B1271, *Lactobacillus brevis* B1272, *Lactobacillus brevis* B1273, *Lactobacillus plantarum* B1275 e *Lactobacillus brevis* B1276, tinham atividade antimicrobiana contra bactérias pertencentes ao género *Listeria* spp., inclusivamente contra *L. ivanovii* e *L. innocua*, como se pode observar na Tabela 4, sendo ainda particularmente relevante a utilização como alvo, de um número muito elevado de estirpes selvagens de *L. monocytogenes* isoladas a partir de alimentos. A *L. monocytogenes*, devido à sua patogenicidade, é um microrganismo cujo controlo em alimentos é obrigatório. Os seus limites encontram-se estabelecidos no Regulamento da Comissão (CE) Nº 2073/2005 de 15 Novembro de 2005, relativo aos critérios microbiológicos para géneros alimentícios. Posto isto, a possibilidade do controlo do crescimento deste tipo de estirpes é para, um produtor industrial, um requisito fundamental. O facto das bacteriocinas em estudo terem um bom potencial anti-*Listeria* fazem com que estas possam vir a despertar interesse para uso alimentar. Também o *Enterococcus faecalis* e o *Lactobacillus plantarum* B391 demonstraram ser suscetíveis a estas potenciais bacteriocinas. Contudo estas substâncias não foram efetivas contra as bactérias

Gram-negativas testadas. Estudos demonstram que este comportamento é comum a outras bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas (Bromberg *et al.*, 2006; Martin-Visscher *et al.*, 2011; Samelis *et al.*, 2005).

**Tabela 4** – Efeito antimicrobiano das bacteriocinas em estudo, em bactérias Gram positivas e Gram negativas

|  | B1271 | B1272 | B1273 | B1275 | B1276 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b><i>Bacillus cereus</i></b><br>ATCC 11778  | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Bacillus subtilis</i></b><br>ATCC 6633                                       | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Clostridium perfringens</i></b><br>ATCC 13124                                | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Enterococcus faecalis</i></b><br>ATCC 19433                                  | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Escherichia coli</i></b><br>ATCC 8739  | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b><br>ATCC 27853                                 | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Salmonella entérica</i></b><br>ATCC 13076                                    | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Staphylococcus aureus</i></b><br>ATCC 25923                                  | -     | -     | -     | -     | -     |
| <b><i>Lactobacillus plantarum</i> B391</b>   | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Listeria monocytogenes</i> B218</b>  | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Listeria monocytogenes</i> 4b</b><br>ATCC 13932                              | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Listeria ivanovii</i> B021</b>   | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Listeria innocua</i> B020</b>  | +     | +     | +     | +     | +     |
| <b><i>Listeria monocytogenes</i> (57 estirpes selvagens isoladas de alimentos)</b> | +     | +     | +     | +     | +     |

+ presença de halo de inibição; - ausência de halo de inibição

#### 4.3.2. Modo de ação

Quanto ao seu modo de ação este foi testado, para todas as potenciais bacteriocinas, segundo o procedimento descrito em 3.8, onde foi adaptado o método descrito por Mardones e Venegas (Mardones & Venegas, 2000), aproveitando-se o facto do meio ALOA ser um meio específico para o isolamento e quantificação de *Listeria* spp. Este meio possui X-glucósido, substrato cromogéneo que após clivagem pela enzima  $\beta$ -glucosidase, comum a todas as espécies de *Listeria* spp, permite uma identificação presuntiva desta bactéria patogénica.

Quando a bacteriocina tem um efeito bacteriolítico provoca lise celular da bactéria alvo e a  $\beta$ -glucosidase é libertada para o meio onde hidrolisa o substrato X-glucósido desenvolvendo um halo de inibição com bordo azul. Quando o efeito é bacteriostático a coloração azul não se evidencia (Mardones & Venegas, 2000).

Através da visualização dos resultados obtidos (Fig.1) observou-se que todas as potenciais bacteriocinas apresentavam um halo de inibição rodeado por uma coloração azul, resultante da acumulação do substrato hidrolisado, pelo que o seu modo de ação é aparentemente lítico. Este comportamento foi semelhante ao da nisina, uma bacteriocina bacteriolítica amplamente estudada e reconhecida pela comunidade científica (Noonpakdee *et al.*, 2003).

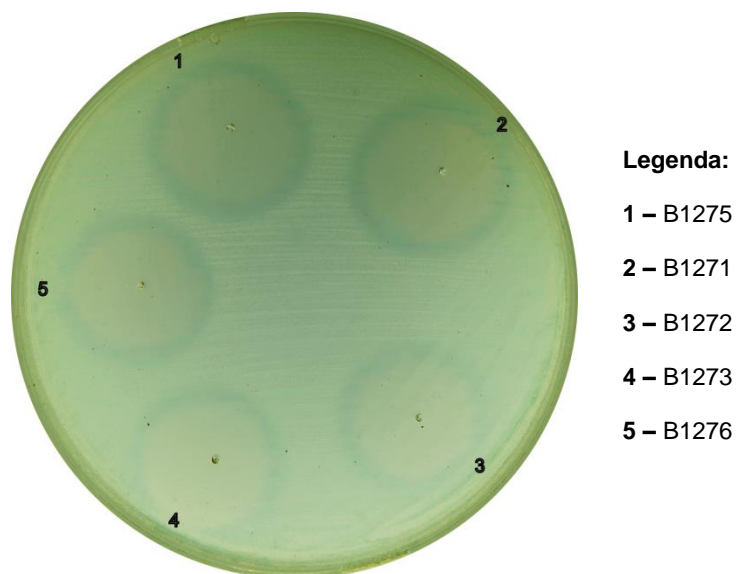


Figura 1 – Modo de ação das bacteriocinas em estudo



### **4.3.3. Influência de agentes físicos e químicos na estabilidade e ação das bacteriocinas**

A utilização das bacteriocinas em processos industriais carece de uma profunda caracterização uma vez que poderá estar sujeita a múltiplos fatores que podem ter um efeito muito significativo na sua atividade, como por exemplo, a temperatura, o pH e agentes químicos.

#### **4.3.3.1. Temperatura e pH**

O estudo da estabilidade da bacteriocina quando exposta a diferentes temperaturas demonstrou que as bacteriocinas em análise são termo estáveis. Os resultados que se seguem (Tabela 5) permitiram constatar que os CFS, expostos às temperaturas de 44, 65, 80 e 100°C durante 10 e 20 minutos, mantiveram a atividade inibitória contra a *L. monocytogenes* B218. Por outro lado, quando submetidos a 121°C (10 e 20 minutos) verificou-se uma ligeira diminuição das zonas de inibição, reflexo de uma perda da atividade, embora não muito significativa.

Todorov e Dicks (Todorov & Dicks, 2009) descreveram que a bacteriocina ST44AM permaneceu estável a 25, 30, 45, 60 e 100° C durante 120 minutos. Contudo a sua atividade contra *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC 19119 sofreu uma redução após 20 minutos a 121°C. Também, resultados semelhantes foram descritos para a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus* CA44 (Joshi *et al.*, 2006) e para a lactacina NK24, produzida por *L. lactis* NK24, quando submetidas a várias temperaturas compreendidas entre 40°C e 100°C por 30 minutos e quando autoclavadas a 121°C por 15 minutos (Lee & Paik, 2001).

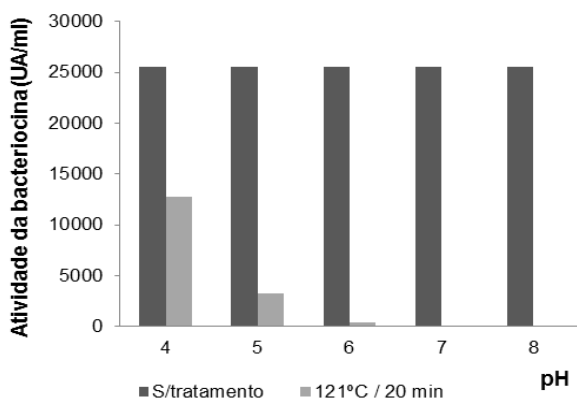
**Tabela 5** – Estabilidade térmica dos CFS, produzidos pelas LAB em estudo, quando submetidos a várias temperaturas

|              | 44°C  |       | 65°C  |       | 80°C  |       | 100°C |       | 121°C |       |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|              | 10min | 20min | 10min | 20min | 10min | 20min | 10min | 20min | 10min | 20min |
| <b>B1271</b> | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++    | ++    |
| <b>B1272</b> | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++    | ++    |
| <b>B1273</b> | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++    | ++    |
| <b>B1275</b> | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++    | ++    |
| <b>B1276</b> | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | +++   | ++    | ++    |

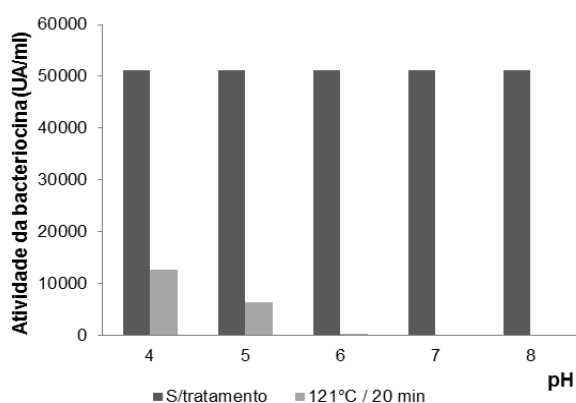
Atividade do CFS – Diâmetro do halo de inibição em cm: + (≥0,5 e <1,0) ++ (≥1,0 e <1,5) +++ (≥1,5 e <2,0)

Sendo, as bacteriocinas proteínas, é natural que a modificação do pH do meio tenha influência na sua estabilidade e atividade, pois este tem certamente influência nas interações entre cadeias laterais dos seus aminoácidos, afetando potencialmente a estrutura e a estabilidade da sua conformação tridimensional, fundamental para a sua atividade (Chen & Hoover, 2003; Mataragas *et al.*, 2003; Van Reenen *et al.*, 2003).

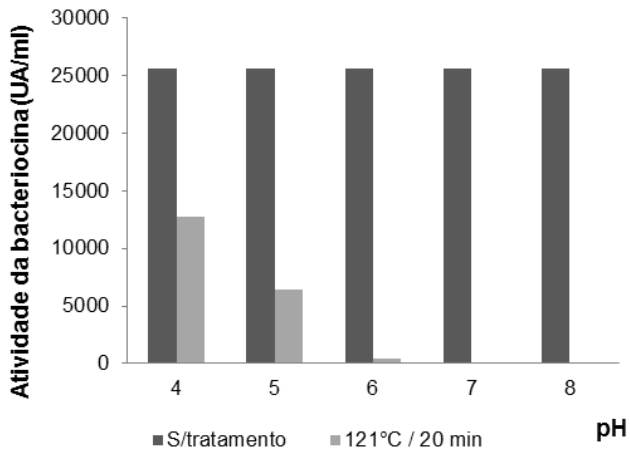
Neste ensaio, avaliou-se o efeito de diversos valores de pH (de 4 a 8) sobre a atividade das bacteriocinas produzidas, pelos *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* em estudo, bem como o efeito do tratamento térmico (121°C/20 min) nas mesmas, como descrito em material e métodos (3.5). Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 2 a 6.



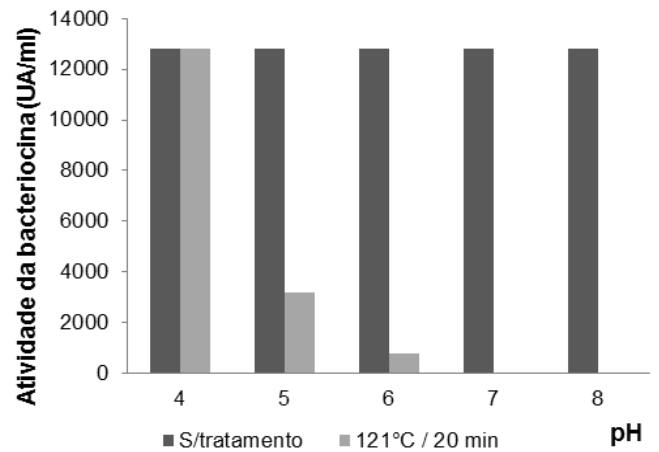
**Figura 2** – Estabilidade da bacteriocina **B1271** quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH



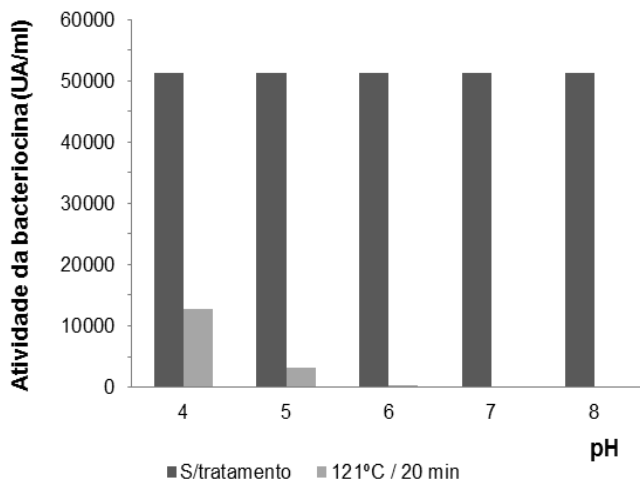
**Figura 3** – Estabilidade da bacteriocina **B1272** quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH



**Figura 4** – Estabilidade da bacteriocina **B1273** quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH



**Figura 5** – Estabilidade da bacteriocina **B1275** quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH



**Figura 6** – Estabilidade da bacteriocina **B1276** quando submetida a altas temperaturas e a diferentes pH

As bacteriocinas em estudo evidenciaram uma excelente estabilidade relativamente à variação do pH. De facto, todas as bacteriocinas estudadas não apresentaram variações significativas e mensuráveis da sua atividade entre pH 4 e pH 8. No entanto, verificou-se que apesar do pH não ter tido muita influência na sua atividade, possuiu uma enorme influência na sua resistência térmica. Para pH's baixos a maior parte das bacteriocinas mantiveram alguma ou mesmo toda a atividade (B1275) após autoclavagem, mas quando o pH se aproximou da neutralidade ou superior, todas as bacteriocinas estudadas foram completamente inativadas quando sujeitas a tratamento térmico.

Estudos comprovam que este comportamento é comum a várias bacteriocinas. A nisina, produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* WNC20, demonstrou ter atividade a valores de pH baixos (3 a 5) quando incubada a 121°C durante 15 minutos, contudo a pH neutro ( $\geq 7$ ) verificou-se perda total da sua atividade (Noonpakdee *et al.*, 2003). Outro estudo refere que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* R1333 permaneceu estável numa gama de pH compreendida entre 2 e 12 após incubação a 30°C durante 30 minutos. Esta estabilidade também foi comprovada após tratamento térmico a 100°C durante 120 minutos a um pH de 5.5 (Todorov *et al.*, 2011).

#### **4.3.3.2. Agentes químicos**

O estudo da influência de agentes químicos na atividade da bacteriocina é um fator importante na caracterização deste composto antimicrobiano, principalmente quando se tem em vista uma potencial utilização no sector alimentar. Neste sector a presença destes agentes é frequente, como potenciais contaminantes ou em reações específicas.

Os resultados obtidos através do procedimento, tal como descrito em 3.6.3, onde foi testado o CFS de cada bactéria em estudo sem adição de detergentes e agentes químicos (controlo) e com adição dos mesmos (Tabela 6), demonstraram que a atividade das bacteriocinas em estudo não foi afetada pelos respetivos tratamentos, nas condições e concentrações usadas.

**Tabela 6** – Influência do tratamento do CFS das bactérias em estudo com detergentes e agentes químicos

|                 | <b>B1271</b> | <b>B1272</b> | <b>B1273</b> | <b>B1275</b> | <b>B1276</b> |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>Triton</b>   | +            | +            | +            | +            | +            |
| <b>Tween 80</b> | +            | +            | +            | +            | +            |
| <b>SDS</b>      | +            | +            | +            | +            | +            |
| <b>EDTA</b>     | +            | +            | +            | +            | +            |
| <b>Controlo</b> | +            | +            | +            | +            | +            |

+ presença de halo de inibição; - ausência de halo de inibição

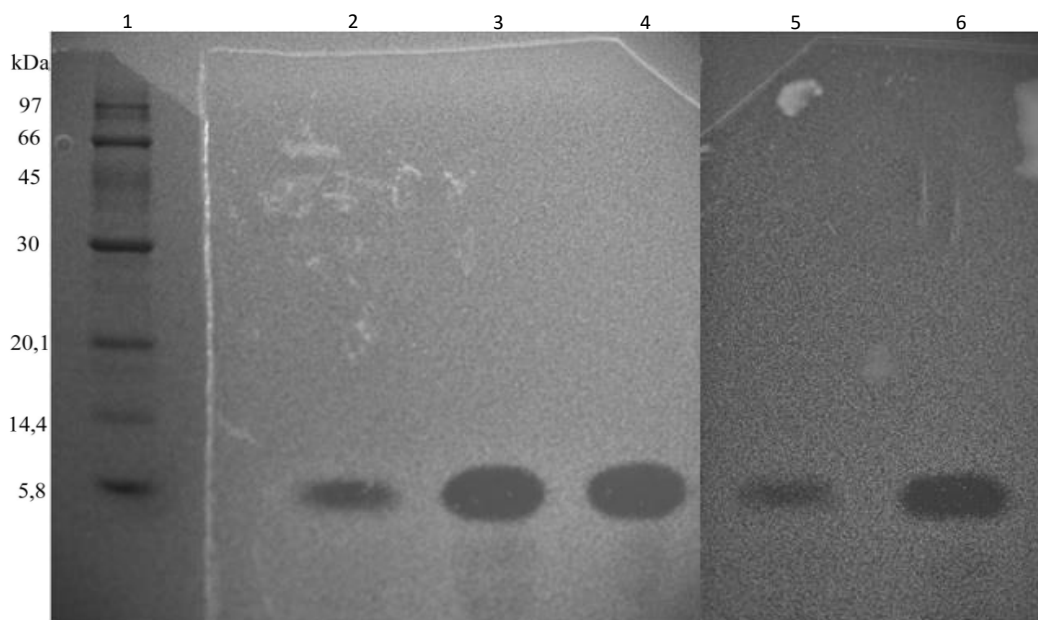
Todorov e colaboradores (Todorov *et al.*, 2011) obtiveram uma resposta semelhante por parte da bacteriocina R1333 quando a submeteram a um tratamento com Triton, Tween 80, SDS e EDTA. O mesmo não se observou num estudo realizado com a plantaricina C19, produzida por uma estirpe de *L. plantarum*, que perdeu toda a sua atividade após tratamento com Triton e SDS (Atrih *et al.*, 2001).

#### **4.3.4. Massa molecular relativa das bacteriocinas isoladas**

Analisou-se ainda, a massa molecular de cada uma das bacteriocinas em estudo, por electroforese em gel de Tricina SDS-PAGE. Contudo as bacteriocinas de classe I ou classe II são, na sua maioria, polipeptídeos com peso inferior a 10 KDa, o que dificulta a deteção das bandas destas moléculas através de métodos convencionais de coloração, como a coloração de azul de Coomassie e nitrato de prata (Guerreiro *et al.*, 2014; Nishie *et al.*, 2012). Estudos já realizados comprovam este comportamento em várias bacteriocinas, como por exemplo, a mesentercina Y015, uma bacteriocina de peso molecular 3 KDa (Hechard *et al.*, 1992). Uma justificação possível para este comportamento é a ocorrência de uma difusão da bacteriocina no gel de acrilamida, durante o processo de coloração, em que esta é eluída (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997).

A visualização das bandas que correspondem ao tamanho molecular das bacteriocinas em estudo foi possível através da incubação do gel de acrilamida

sobreposto em uma camada de TSA contendo *L. monocytogenes* B218, conforme descrito em 3.9, observando-se que o seu peso era de aproximadamente 6 KDa (Fig. 7).

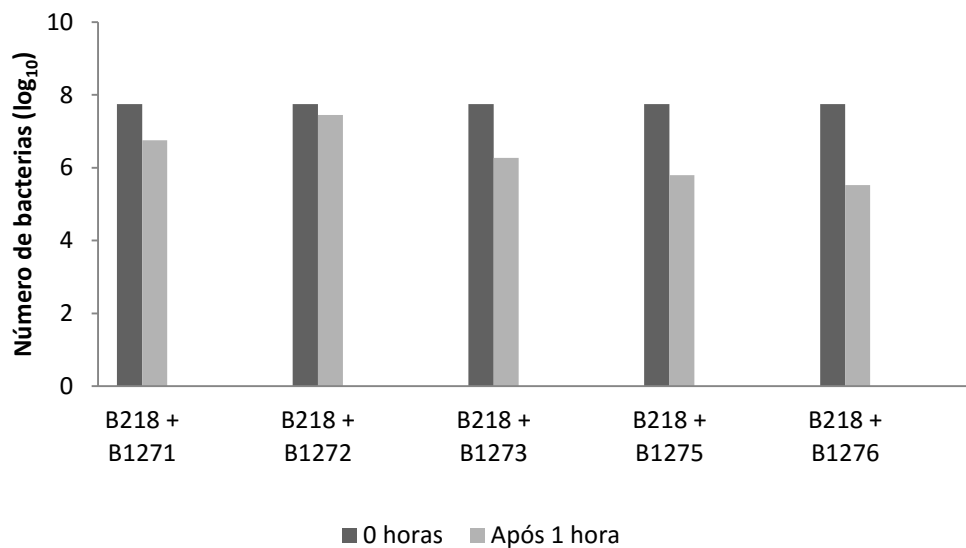


**Figura 7** – Separação molecular das bacteriocinas por método SDS-PAGE e sua inibição contra a *L. monocytogenes* B218. 1 – Marcador molecular; 2 – B1271; 3 – B1272; 4 – B1273; 5 – B1276; 6 – B1275

#### **4.4. Efeito das potenciais bacteriocinas no crescimento da *L. monocytogenes* B218**

Foi analisado o efeito das bacteriocinas no crescimento e viabilidade da *L. monocytogenes* B218, tal como descrito em 3.10 e os resultados apresentados foram obtidos através do cálculo da média das contagens efetuadas após incubação na sua presença.

Após 1 hora de incubação verificou-se que houve inibição da bactéria patogénica em estudo por parte de todas as bacteriocinas, contudo, nem todas demonstraram ter o mesmo efeito, destacando-se a B1275 e B1276 por terem causado uma redução considerável (2 log) da *L. monocytogenes* B218, num período de tempo tão reduzido (Fig.8).



**Figura 8** – Influência das potenciais bacteriocinas em estudo no crescimento e viabilidade da *L. monocytogenes* B218

Num estudo realizado em condições semelhantes, constatou-se que após uma 1 hora de incubação, a pediocina ST18 teve um efeito antimicrobiano contra a *L. innocua* F e após a 2ª hora, foi registada uma completa inibição do crescimento da bactéria patogénica (Todorov & Dicks, 2005).

## 5. CONCLUSÕES

Quando se pretende utilizar uma potencial bacteriocina em futuras aplicações alimentares torna-se necessário, não só aprofundar o conhecimento acerca da sua bactéria produtora bem como estudar todas as características do próprio agente antimicrobiano.

As bactérias lácticas estão presentes em muitos e variados tipos de alimentos, como se pôde comprovar a partir do rastreio efetuado a diferentes amostras de alimentos. Destas foi possível isolar 21 bactérias lácticas cujo crescimento originou de alguma forma o surgimento, no sobrenadante, de fatores com atividade antimicrobiana.

O teste de despistagem realizado aos isolados obtidos, com a tripsina, demonstrou ser importante na identificação da natureza proteica da substância antimicrobiana produzida por estas bactérias. Obtiveram-se 5 isolados que revelaram uma perda total da atividade, o que confirmou a natureza proteica do fator envolvido na inibição. De facto, a produção de péptidos com ação antimicrobiana é relativamente frequente, apresentando-se naturalmente como uma vantagem competitiva para as bactérias produtoras.

As bactérias isoladas a partir destas 5 amostras de alimentos diferentes, foram identificadas como estirpes de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum*. Ambas as estirpes têm um estatuto GRAS pelo que a sua potencial utilização industrial pode ser encarada como promissora.

As bacteriocinas produzidas por estas estirpes foram isoladas, parcialmente purificadas e caracterizadas. Tratam-se de péptidos de baixo peso molecular, como é aliás característica habitual e já estudada das bacteriocinas. Além disto apresentam uma grande estabilidade térmica, uma ação inibitória praticamente independente do pH e uma elevada estabilidade perante diferentes tipos de agentes químicos como por exemplo, Triton, Tween80, SDS e EDTA.



Os péptidos isolados demonstraram ser ativos contra um elevado número de espécies de *Listeria* spp., inclusivamente, *L. ivanovii* e *L. innocua* e várias estirpes selvagens de *L. monocytogenes*, sendo que aparentemente o seu mecanismo de ação é lítico. De destacar ainda, a eficácia de duas das bacteriocinas obtidas (B1275 e B1276), pois apresentaram um enorme poder redutor da carga microbiana num curto espaço de tempo. Por incubação direta com a bacteriocina durante uma hora, foi possível atingir uma redução de 2 log no crescimento da bactéria patogénica utilizada neste estudo.

Uma potencial utilização de qualquer das bacteriocinas isoladas ou das estirpes produtoras, carece ainda de estudos complementares relativamente à sua caracterização. No que diz respeito às estirpes produtoras e apesar de serem consideradas GRAS é fundamental verificar, por exemplo, a presença de genes potencialmente codificantes para toxinas e ainda responsáveis pela resistência a antibióticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Valdivia, E., Galvez, A., Maqueda, M. (2001). Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. *Curr Microbiol*, 42(2), 89-95.
- Ali, A. A. (2010). Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health: A Review. *Research journal of Microbiology*, 5 (12 ), 1213-1221.
- Alonso-Urmeneta, B., Aragón, V., Bengoechea, J. A., Díaz, R., Gamazo, C., García-Jaión, I. (2000). *Manual Prático de Microbiología* (2 ed.).
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Int J Food Microbiol*, 68(1-2), 93-104.
- Bactibase - database dedicated to bacteriocins (2015) . Disponível em: <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/about.php>. Consultado em: (14/11/2015).
- Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R. R., Cintra, H. C. (2006). Características da Bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(1), 135-144.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol*, 34(1), 1-16.
- Chen, H., Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82-100.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F., Hernández, P. E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, 7(4), 281-305.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 1-20.

- Collins, B., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2010). Applications of lactic acid bacteria - produced bacteriocins. In F. Mozzi, R. R. Raya & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (pp. 89-109). Iowa, USA: Wiley-Blackwell
- Comissão das Comunidades Europeias (2005). Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia, L, 338(1), 22.*
- Cotelo, M., Schein, K., Salvo, S., Abirad, P., Techera, S. B. C. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science And Technology, 33(4), 801-804.*
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food (Vol. 3).
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tool for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal, 16(9), 1058-1071.*
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin (Vol. 69).
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal, 14(4), 273-285.*
- Digaitiene, A., Hansen, A. S., Juodeikiene, G., Eidukonyte, D., Josephsen, J. (2012). Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *J Appl Microbiol, 112(4), 732-742.*
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev, 70(2), 564-582.*
- Elinav, H., Hershko-Klement, A., Valinsky, L., Jaffe, J., Wiseman, A., Shimon, H. (2014). Pregnancy-associated listeriosis: clinical characteristics and geospatial analysis of a 10-year period in Israel (Vol. 59).

- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., Laglaoui, A. (2014). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(11), 657-666.
- Ghraiiri, T., Chaftar, N., Hani, K. (2012). Bacteriocins: recent advances and opportunities. *Progress in Food Preservation*, 485-511.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. A. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81(4), 591-606.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79-97.
- Guerreiro, J., Monteiro, V., Ramos, C., de Melo Franco, B. D., Martinez, R. C., Todorov, S. D. (2014). Lactobacillus pentosus B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(2), 95-104.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 142-148.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 51-70.
- Hajikhani, R., Beyatli, Y., Aslim, B. (2007). Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International Journal Of Dairy Technology*, 60(2), 105-108.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*, 113(4), 723-736.
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Gen Microbiol*, 138(12), 2725-2731.

- Heng, N. K., Wescombe, P., Burton, J., Jack, R., Tagg, J. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In M. Riley & M. Chavan (Eds.), *Bacteriocins* (pp. 45-92): Springer Berlin Heidelberg.
- Hernandez-Milian, A., Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in listeriosis? (Vol. 2014).
- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci*, 82(4), 640-647.
- Joshi, V. K., Sharma, S., Rana, N. S. (2006). Production, purification, stability and efficacy of bacteriocin from isolates of natural lactic acid fermentation of vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 44(3), 435-439.
- Karam, L., Jama, C., Mamede, A. S., Boukla, S., Dhulster, P., Chihib, N. E. (2013). Nisin-activated hydrophobic and hydrophilic surfaces: assessment of peptide adsorption and antibacterial activity against some food pathogens (Vol. 97).
- Karpinski, T. M., Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Characteristic of bacteriocines and their application. *Pol J Microbiol*, 62(3), 223-235.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A. (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathog Dis*, 7(12), 1581-1584.
- Lee, N. K., Paik, H. D. (2001). Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18, 17-24.
- Lima, E., Filho, R. (2005). Bacteriocins: Nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3(2), 62-66.
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In H. Zhang & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria - Fundamentals and Practice* (pp. 536 pp.104-204). London: Springer.
- López-Díaz, T. M., Alonso, C., Román, C., García-López, M. L., Moreno, B. (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, 17(1), 23-32.

- Mardones, G., Venegas, A. (2000). Chromogenic plate assay distinguishing bacteriolytic from bacteriostatic activity of an antibiotic agent. *J Microbiol Methods*, 40(3), 199-206.
- Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol Lett*, 317(2), 152-159.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E. H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64(3), 265-271.
- Merck KGaA, G. (2008). Application, *Bactident® Oxidase - For the testing of cytochrome oxidase in microorganisms*.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2, 299-329.
- Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 113-128.
- Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*, 17(1), 1-16.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 137-145.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1-2), 77-89.
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S3-S3.

- Piard, J., Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait*, 72(2), 113-142
- Pritchard, S. R., Phillips, M., Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*, 43(5), 1545-1548.
- Quintavalla, S., Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373-380.
- Rahman, A., Kang, S. C. (2009). In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*, 116(3), 670-675.
- Reeves, P. (1965). The Bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 29(1), 24-45.
- Sabo, S. d. S., Vitolo, M., González, J. M. D., Oliveira, R. P. d. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64(0), 527-536.
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 21-28.
- Sankar, N., Priyanka, V., Reddy, P., Rajanikanth, P., Kumar, V., Indira, M. (2012 ). Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cow Milk. *International Journal of Microbiological Research*, 3(2), 133-137.
- Saranraj, P., Naidu, M. A., Sivasakthivelan, P. (2013). Lactic Acid Bacteria and its Antimicrobial Properties: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 4(6 ), 1124-1133.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Siamansouri, M., Mozaffari, S., Alikhani, F. (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria - Review Article. *Journal of Biology and today's world*, 2(5), 227-234.

- Silk, B. J., McCoy, M. H., Iwamoto, M., Griffin, P. M. (2014). Foodborne listeriosis acquired in hospitals (Vol. 59).
- Stecchini, M. L., Aquili, V., Sarais, I. (1995). Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 25(3), 301-310.
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., Zhang, H. (2014). Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In H. Zhang & Y. Cai (Eds.), *Lactic Acid Bacteria - Fundamentals and Practice* (pp. 536 pp. 531-102). London: Springer.
- Todorov, S., Dicks, L. (2004). Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Official Journal of the Society for Industrial Microbiology*, 31(7), 323-329.
- Todorov, S., Reenen, C., Dicks, L. (2007). Pre-treatment of growth medium with Amberlite® XAD-1180 produces higher levels of bacteriocin plantaricin 423, *Open Life Sciences* (Vol. 2, pp. 588).
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), 365-370.
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. (2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 117-126.
- Todorov, S. D., Franco, B. D. G. D. M. (2010). *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*, 26(3), 205-229.
- Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prevost, H. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17(1), 23-31.



- Van Reenen, C. A., Chikindas, M. L., Van Zyl, W. H., Dicks, L. M. T. (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 29-40.
- Vásquez, M., Suarez, M., Zapata, B. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts *AMB Express* (Vol. 2, pp. 48). Germany.
- Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.