UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina

LUIZ ROGÉRIO LUDWIG FARINHA

Tese para obtenção do grau de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina

LUIZ ROGÉRIO LUDWIG FARINHA

Versão Original

Tese para obtenção do grau de DOUTOR
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo

2016

LUIZ ROGÉRIO LUDWIG FARINHA

Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina

Tese para obtenção do grau de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – Área de Tecnologia de Fermentações – da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Farinha, Luiz Rogério Ludwig
F227e Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina / Luiz Rogério Ludwig Farinha. -- São Paulo, 2016.
121p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza

1. Tecnologia da fermentação 2. Leite 3. Soros 4. Bactérias láticas I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador.

664.02 CDD

Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina

Comissão Julgadora da

Tese para a obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
orientador/presidente

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo, de de 2016

Dedico esta tese à toda a família Ludwig Farinha, com especial atenção à minha mãe e ao meu pai,
Ignêz Ludwig Gonçalves & Luiz Gonçalvez Farinha

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

Dedico esta tese a Luiz Gonçalvez Farinha, Ignêz Ludwig Gonçalves, Raquel Gonçalves Greiter, Roberto Greiter, Cilene Gonçalves Leone, Roberto Leone, José Lucas Greiter, Luiz Mateus Greiter, Lara Gonçalves Leone, João Gonçalves Leone e tia Irene Ludwig (*in memoriam*). Ofereço esse trabalho de tese, com todo o meu amor, dedicação, respeito e companheirismo a minha amada família.

Ao orientador da tese, Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

À grande e amada amiga, formidável e companheira, acolhedora e condutora da revisão do português desse trabalho de pesquisa, Amanda de Camargo Mendes. Aos amigos graduados em Letras, com quem estabeleço uma fortunável amizade – entre eles, se destacam Ana Carolina Ribeiro, Gracia Regina Gonçalves, Thiago Moyano, Cecília de Diego Criado, Thales Augusto Barreto, Maira Mesquita e Luciana Avila.

Aos amigos, amados, incentivadores plenos da arte e alegria de viver, dentre os quais se sobressaem Fábio Bitelli, Paulo Almeida, Franciane Cabello Veloso, Camila Evangelista, Giuliane Zafanelli, Marjurie Simionato Iamashita, Marinela Rosa Ribeiro, amigos do Andaraí, entre outros tantos e bons amigos da cidade de São Paulo, como aqueles esparramados pelo Brasil e ao redor do mundo.

Aos presentes e motivadores colegas do Laboratório de Biomoléculas Microbianas. Com destaque para as amigas Eleane de Almeida Cezare Gomes e Samarina Rodrigues Wlodarczyk.

À CAPES, pelo fomento para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT
1. INTRODUÇÃO 19
2. OBJETIVO 22
2.1 Objetivos específicos 22
3. REVISÃO DA LITERATURA 23
3.1 Importância dos micro-organismos probióticos 23
3.1.1 Importância dos micro-organismos probióticos como culturas iniciadoras 25
3.1.2 Efeitos das culturas probióticas na fermentação 26
3.2 Prebióticos e suas aplicações em elementos funcionais 27
3.2.1 Inulina 28
3.3 Importância do soro do leite 30
3.4 Propriedades reológicas na sobrevivência de probióticos 33
3.5 Bacteriocinas produzidas por bactérias láticas 35
3.6 Características, classificação e propriedades antimicrobianas das bacteriocinas 38
3.7 Aplicação de bacteriocinas nos campos alimentar e farmacêutico 41
4. MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1 Culturas microbianas 45
4.2 Preparação dos meios de cultivo 45
4.2.1 Soro de leite 45
4.2.2 Meios de cultura sintéticos 45
4.2.3 Suplemento inulina..... 46
4.3 Preparação do inóculo 46
4.3.1 *Lactococcus lactis* CECT 4434 46
4.3.2 *Streptococcus thermophilus* TA040 47

4.3.3 *Lactobacillus sakei* ATCC 1552 47
4.4 Crescimento celular 47
4.5 Determinação de lactose e ácido lático 48
4.6 Curva-padrão da nisina 48
4.6.1 Atividade antimicrobiana 48
4.7 Sistema de fermentação *Cinétique d'acidification* (CINAC) 49
4.8 Viscosidade 50
4.9 Análise estatística 50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
5.1 Cinética de acidificação 51
5.1.1 *Streptococcus thermophilus* TA040 51
5.1.2 *Lactococcus lactis* CECT 4434 53
5.1.3 *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA040 55
5.2 Contagem microbiológica 58
5.3 Teores de lactose e de ácido lático 60
5.4 Viscosidade do produto fermentado 62
5.5 Atividade antimicrobiana da bacteriocina 65
6. CONCLUSÕES 70
7. PERSPECTIVAS FUTURAS 71
REFERÊNCIAS 72
ANEXO 1 90
ANEXO 2 98
ANEXO 3 105
ANEXO 4 112
ANEXO 5 114
ANEXO 6 115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da inulina e das oligofrutoses 29

Figura 2 - Avaliação reológica do soro de leite fermentado na ausência e na presença de inulina em monocultura (A) de *Streptococcus thermophilus* TA 040 a 25 ºC e em cocultura *S. thermophilus* TA 040 com *Lactococcus lactis* CECT 4434 (B) no final da fermentação no pH de 4,5 63

Figura 3 - Curva de calibração associando concentração da nisina (UA/mL) em relação ao diâmetro do halo de inibição..... 65

Figura 4 - Halos de inibição obtidos por *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cultura pura (A) e em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 (B) frente à cepa bioindicadora *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. A determinação da atividade antimicrobiana foi obtida no final do cultivo em soro de leite sem e com adição de 2% de inulina 66

Figura 5 - Atividade antimicrobiana da nisina produzida por *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cultura pura (A) e em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 (B). Legendas: ■ (0% de inulina); ■ (2% de inulina); ■ (4% de inulina) 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações das bacteriocinas na biopreservação de alimentos.. 37

Tabela 2 - Classificação das bacteriocinas 39

Tabela 3 - Exemplo de algumas bacteriocinas e suas aplicações farmacêuticas 43

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *S. thermophilus* TA 040 51

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *Lactococcus lactis* CECT 4434 em soro de leite a 37 °C até atingir o pH 4,5 53

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *L. lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 em soro de leite a 37 °C até atingir o pH 4,5 55

Tabela 7 - Contagem microbiológica das culturas microbianas de *Streptococcus thermophilus* TA 040 (ST) e do *Lactococcus lactis* CECT 4434 (LL) fermentadas em soro de leite tanto em monocultura quanto em culturas mistas (ST-LL) com ou sem a suplementação de inulina a 37 ºC 59

Tabela 8 - Concentração de lactose (gL^{-1}) e lactato (gL^{-1}) do soro de leite fermentado pela cultura pura de *L. latis* (LL) e *S. thermophilus* (ST) ou pela cocultura binária de *L. latis* com *S. thermophilus* (ST-LL) na ausência e na presença de inulina. No tempo final da fermentação ($T_{pH4,5}$) 61

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	*American Type Culture Collection*
BAL	Bactérias ácido-láticas
B. animalis subsp. *lactis*	*Bifidobacterium animalis* subsp. lactis
B. breve	*Bifidobacterium breve*
B. lactis	*Bifidobacterium lactis*
B. longum	*Bifidobacterium longum*
B. longum subsp. *Infantis*	*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*
C. beijerinckii	*Clostridium beijerinckii*
BOD	Demanda Bioquímica do Oxigênio
CA	Califórnia
CECT	*Colección Española de Cultivos Tipo*
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CINAC	*Cinétique d'acidification*
DO	Densidade óptica
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FOS	Fruto-oligossacarídeos
Fru	Frutose
G	Grama
Glu	Glucose
GOS	Galacto-oligossacarídeos
GP	Grau de polimerização
GRAS	*Generally Recognized as Safe*
h	Hora
H^+	Hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
IN	Inulina
IOM	Isomalto-oligossacarídeos
Kcal	Quilocaloria

L	Litro
ST	*Streptococcus thermophilus*
LL	*Lactococcus lactis*
L. lactis subsp. *lactis*	*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*
L. acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
L. curvatus	*Lactobacillus curbatus*
L. helveticus	*Lactobacillus helveticus*
L. gasseri	*Lactobacillus gasseri*
L. plantarum	*Lactobacillus plantarum*
L. sakei	*Lactobacillus sakei*
L. paracasei	*Lactobacillus paracasei*
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LDL	*Low Density Lipoproteins*
M	Molar
M17	Meio de cultivo TERZAGHI & SANDINE
Min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRS	Meio de cultivo DE MAN, ROGOSA & SHARPE
MO	Missouri
nm	Nanômetros
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potêncial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
St	Saint
S. thermophilus	*Streptococcus thermophilus*
S. fragilis	*Saccharomyces fragilis*
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
µm	Micrômetro
USP	Universidade de São Paulo
UA	Unidades arbitrárias
α	Alfa

β	Beta
WHO	World Health Organization

FARINHA, L. R. L. **Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina**. 2016. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2016.

RESUMO

As bactérias ácido-láticas (BAL) são micro-organismos que auxiliam nas características organolépticas, funcionais e de bioconservação de produtos fermentados. A utilização do soro de leite como meio de cultivo natural enaltece o conceito da produção de biomoléculas de alto valor agregado, como bacteriocinas, já que é um subproduto gerado por indústrias de laticínios e considerado um agente poluidor. A inulina é um ingrediente prebiótico que promove seletivamente o crescimento de culturas probióticas. Nesse âmbito, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da composição da cultura de *Lactococcus lactis* (LL) em cocultura com *Streptococcus thermophilus* (ST) e da suplementação da base de soro de leite com inulina: (i) nos parâmetros cinéticos de acidificacão, (ii) no crescimento celular, (iii) na viscosidade do produto e (iv) na atividade antimicrobiana da nisina. A fermentação do soro de leite com *Lactococcus lactis* em cocultura com *Streptococcus thermophilus* proporcionou a maior taxa de acidificação (V_{max}=7,93x10^{-3} upH/min), assim como apresentou o menor tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação (T_{vmax}=1,13 h). A adição de 2% de inulina ao soro de leite fermentado pela cocultura binária fez com que o tempo para completar o cultivo fosse o mais curto ($T_{pH4,5}$=4,43 h) quando comparado aos demais ensaios. Quanto ao crescimento celular, pode-se observar que a inulina não afetou significativamente a contagem microbiológica, quando as cepas ST e LL foram utilizadas separadamente no processo fermentativo. Em particular, a adição de 4% de inulina reduziu em 1,2 LogUFC/mL e 0,92 LogUFC/mL a contagem de ST e LL (em monocultura), respectivamente. Por outro lado, em coculturas binárias (ST-LL), percebeu-se ganho na contagem microbiológica nos ensaios que receberam suplementação do ingrediente prebiótico, ou seja, quando adicionados 2% e 4% de inulina, houve aumento de 1 LogUFC/mL e de 1,34 LogUFC/mL na contagem de ST, respectivamente. No caso da cepa LL em cocultura com ST, a suplementação de 2% e 4% do prebiótico aumentou em 0,31 LogUFC/mL e 0,75 LogUFC/mL, respectivamente. A concentração de ácido lático também foi mais elevada nos cultivos realizados com a cocultura binária, sendo 4,56 g/L (na ausência de inulina), 5,28 g/L (com adição de 2% de inulina) e 5,71 g/L (com suplementação de 4% de inulina). A viscosidade foi influenciada tanto pela adição de inulina como pelo efeito sinérgico da cocultura, sendo que o maior valor (7,38 mPas) foi obtido pela cocultura ST-LL e pela adição de 4% do ingrediente prebiótico. Quanto à produção de nisina, observou-se que, no cultivo em cocultura (ST-LL), a concentração de 2% de inulina aumentou em 102% a atividade antimicrobiana quando comparada com a cultura pura LL. Vale ressaltar que ambas as cepas satisfizeram os requisitos tecnológicos relativos à produção de laticínios funcionais.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas, cinética de acidificação, soro de leite, nisina.

FARINHA, L.R.L. E**ffect of lactic acid bacteria composition and the supplementation of milk whey on acidification kinetics, cell growth and nisin production**. 2016. 121p. Thesis (Ph.D.) – Pharmaceutical Science School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 2016.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms that help in the organoleptic and functional characteristics and in the biopreservation of fermented products. The use of milk whey as a culture medium extols the concept of the production of high value-added biomolecules, such as bacteriocins, since it is a by-product generated by the dairy industry and considered a pollutant. Inulin is a prebiotic ingredient that promotes selectively the growth of probiotic cultures. In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of culture composition *Lactococcus lactis* (LL) in co-culture with *Streptococcus thermophilus* (ST) and the supplementation of milk whey with inulin on: (i) the acidification kinetic parameters, (ii) the cell growth, (iii) the product viscosity, and (iv) the antimicrobial activity of nisin. The fermentation of milk whey by Lactococcus lactis in coculture with Streptococcus thermophilus provided the highest acidification rate (V_{max} = 7.93x10^{-3} upH/min) and the shortest time to reach the maximum acidification rate (T_{Vmax} = 1.13 h). The addition of 2% inulin in the binary coculture binary led to the shorter time to complete the fermentation ($T_{pH4,5}$ = 4.43) compared to the other tests. With regard to cell growth, it can be observed that the addition of inulin did not affect the microbiological count of pure cultures of ST and LL strains in the fermentation process. In particular, the addition of 4% inulin reduced by 1.2 Log CFU/mL and 0.92 Log CFU/mL the counts of ST and LL (monoculture), respectively. In the other hand, the binary co-cultures cultivations (ST-LL) with the addition of 2% and 4% inulin increased by 1 LogCFU/mL and 1.34 Log CFU/mL in the case of the ST counts and 0.31 log CFU/mL and 0.75 log CFU/mL the counts of LL, respectively. Lactic acid concentration was higher in cultivations carried out by binary cocultures, thus being 4.56 g/L (in the absence of inulin), 5.28 g/L (with addition of 2% inulin) and 5.71g/L (supplemented with 4% inulin). The viscosity was influenced by the addition of prebiotic ingredient and by the synergistic effect of binary coculture, being the highest value (7.38 mPas) obtained by the addition of 4% inulin. Finally, as regards the production of nisin noted that in the binary coculture cultivations (ST-LL), the concentration of 2% inulin increased at 102% the antimicrobial activity when compared to the pure culture LL. It is worth mentioning that both strains met the technological requirements as regards the production of functional dairy products.

Keywords: lactic acid bacteria, acidification kinetics, milk whey, nisin

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os micro-organismos probióticos vêm sendo adicionados em vários tipos de alimentos, especialmente em derivados lácteos funcionais, por seu valor nutracêutico, justificando, deste modo, a sua aplicação biotecnológica nas indústrias de alimento e farmacêutica.

O alimento ou o ingrediente com propriedades funcionais pode, além das funções nutricionais básicas, ser capaz de produzir efeitos metabólicos e fisiológicos e contribuir de forma benéfica para a saúde e o bem-estar daqueles que o consomem, podendo ser ingerido de forma segura e sem supervisão médica (Tripathi et al., 2014; Buriti et al., 2014; Beitāne et al., 2013).

Determinados micro-organismos probióticos, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces*, têm sido classicamente definidos como micro-organismos vivos que melhoram ativamente a saúde humana, pelo aprimoramento do balanço da microbiota no trato intestinal, atuando também de modo favorável no produto alimentício ao qual foram adicionados (Tamime et al., 2005).

Inúmeros trabalhos de pesquisa recentemente publicados (Pasteris et al. 2014.; Tripathi & Giri, 2014; Beitāne & Ciproviča, 2013; Divya et al., 2012; Kolozyn-Krajewska et al., 2012; Capozzi et al., 2012; Franz et al., 2011) tiveram como enfoque principal o estudo da tecnologia de fermentações. Estes trabalhos reportaram a maximização da produção de bactérias ácido-láticas (BAL) e probióticas e puderam comprovar a importância desses micro-organismos, devido às suas propriedades biotecnológicas aplicáveis nos campos alimentício e farmacêutico. Isso se justifica pela capacidade das BAL de produzir substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas – com destaque para a nisina.

Aprovada desde 1988, pela *Food and Drug Administration*, por ser uma biomolécula segura (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) e, por isso, utilizada como bioconservante natural de alimentos, a nisina ganhou interesse comercial na indústria de alimentos por apresentar benefícios nutricionais à saúde humana (Nishie et al., 2012; Ustyugova et al., 2012; Wijnker et al., 2011; Garde et al., 2011; Miller et al., 2010; Kouakou et al., 2010).

Diversos pesquisadores descrevem benefícios terapêuticos associados à ingestão desses micro-organismos probióticos, como ganho competitivo no trato gastrointestinal. Tais autores foram unânimes em afirmar que estas cepas, quando consumidas em grandes quantidades, influenciam positivamente a função intestinal (Van Bueren et al., 2015; Montel et al., 2014; Fernandez et al., 2013; Liu et al., 2011; Giang et al., 2010; Wu et al., 2010). Bactérias probióticas devem estar presentes nos produtos alimentícios em contagens viáveis de consumo para que possam influenciar. Estas contagens podem variar de 10^{-7} a 10^{-8} UFC.mL^{-1}, de acordo com as espécies e as estirpes utilizadas, para produzirem efeitos benéficos na prevenção de certas doenças e/ou alterações em humanos (Ren et al., 2014; Kuda et al., 2013; Rea et al., 2013; Bermudez-Brito et al., 2012; Tiscornia et al., 2012; Bendali et al., 2011; Hacini-Rachinel et al., 2009).

A produção de micro-organismos probióticos leva em consideração a acidificação das BAL em leite e derivados lácteos. No entanto, até o momento, existem poucos dados na literatura sobre o perfil de acidificação de bactérias probióticas em soro de leite.

A utilização do soro de leite como meio de cultivo para as BAL, além de seu valor nutricional na suplementação do cultivo, é também importante na redução do impacto ambiental que seu descarte inadequado pode causar em rios e mananciais.

O reaproveitamento do soro de leite destinado para o cultivo de bactérias probióticas proporciona ganhos biotecnológicos no que diz respeito à obtenção de uma biomolécula de alto valor agregado, a nisina, a partir de um subproduto da indústria de laticínios. Dessa forma, justifica-se a relevância do tema, amplamente estudado por alguns pesquisadores na atualidade (Pescuma et al., 2012; Alvarez et al., 2010; Dahal et al., 2010; Wolf-Hall et al., 2009).

Os meios de cultivo alternativos, considerados de baixo custo, podem ser utilizados para a produção de compostos e biomoléculas de baixo ou alto valor agregado. Por estas razões, têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, como é o caso da utilização do milho fermentado, empregado na fabricação do etanol (Wolf-Hall et al., 2009), e do soro de leite para a produção de nisina a partir da cepa de *Lactococcus lactis* subp. *lactis* (Schirru et al.,

(2014). No estudo, comprovou-se a eficiência do soro de queijo na bioprodução da enterocina oriunda da cepa de *Enterococcus faecium*.

A valorização da presente pesquisa está relacionada à produção biotecnológica de uma biomolécula de alto valor agregado, a nisina, que é a base de estudo deste projeto; sua obtenção ocorreu a partir da cultura microbiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434, tanto em monocultura quanto em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040, utilizando o soro de leite como meio de cultivo alternativo.

A cepa de *S. thermophilus* TA 040, empregada nesta pesquisa, é considerada como cultura iniciadora probiótica e produtora de exopolissacarídeos, que pode ser utilizada no processamento de bebidas lácteas funcionais, com o intuito de aprimorar positivamente suas propriedades reológicas e, consequentemente, suas qualidades finais.

Os ingredientes prebióticos, como inulina, frutooligossacarídeos (FOS) e palatinose podem potencializar o efeito probiótico do micro-organismo. Nesse caso, muitos autores sugerem que *Lactobacillus* spp. e *Lactoccocus* spp. podem ser úteis como bactérias probióticas, quando utilizadas juntamente com os prebióticos, que poderiam regular não só o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal, mas também sua atividade antibacteriana (Nyangale et al., 2014; Pranckute et al., 2014; Mei et al., 2011; Rodrigues et al., 2011).

2. OBJETIVO

Estudar o efeito da composição de bactérias láticas (*Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*) e da suplementação do soro de leite com inulina na cinética de acidificação, no crescimento celular, na viscosidade e na produção de nisina.

2.1 Objetivos específicos

- Estudar a cinética de acidificação das cepas *Streptococcus thermophilus* TA 040 e *Lactococcus lactis* CECT 4434 cutivadas separadamente e em cocultura binária.
- Determinar as contagens microbiológicas das cepas *Streptococcus thermophilus* TA 040 e *Lactococcus lactis* CECT 4434 cutivadas separadamente e em cocultura binária.
- Determinar os teores de lactose e de ácido lático.
- Determinar a viscosidade do produto fermentado pelas cepas *Streptococcus thermophilus* TA 040 e *Lactococcus lactis* CECT 4434 cutivadas separadamente e em cocultura binária.
- Determinar a atividade antimicrobiana da nisina.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Importância dos micro-organismos probióticos

Os micro-organismos reconhecidos como probióticos, principalmente os que pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, têm despertado, nos últimos anos, grande interesse por suas propriedades biotecnológicas na preparação e no desenvolvimento de alimentos funcionais, além de proporcionar vantagens à saúde e bem-estar aos indivíduos que os consomem (Arena et al., 2014a; Tripathi et al., 2014).

Geralmente, os micro-organismos probióticos estão disponíveis comercialmente nas formas seca ou congelada, podendo ser adicionados em produtos alimentícios (fermentados ou não). A demanda por cepas probióticas vem crescendo rapidamente, em consequência da maior conscientização por parte dos consumidores relativamente aos alimentos funcionais (Buriti et al., 2014; Divya et al., 2012; Beitāne & Ciproviča, 2013).

As BAL com propriedades probióticas, quando usadas em proporções adequadas na preparação de alimentos ou nos produtos lácteos, sobrevivem à passagem do trato digestivo (Collins et al., 2010), proporcionando, assim, efeitos benéficos à saúde humana (Uroic et al., 2014; Pfeiler & Klaenhammer, 2007; Ferreira, 2003; Capozzi et al., 2012).

Várias pesquisas, baseadas em estudos clínicos, reportam o efeito terapêutico de alimentos probióticos na saúde humana. Os pesquisadores constataram aumento da modulação à resposta imune e prevenção de certas doenças, tais como diarreias, má digestão de lactose, doenças intestinais inflamatórias, constipação, câncer do cólon intestinal e da bexiga, hipercolesterolia, doenças inflamatórias, crescimento desordenado de bactérias intestinais, doenças coronárias, do trato respiratório superior e infecções relacionadas (Kolozyn-Krajewska et al., 2012; Franz et al., 2011; Gioia et al., 2014; Ren et al., 2014).

Para possibilitar os benefícios desejados à saúde humana, um número mínimo viável de cada cepa probiótica deve estar presente no produto final até o momento do consumo. De acordo com Tamime et al. (2005), embora não exista

consenso sobre o número de células probióticas viáveis por grama (g) ou mL de alimento probiótico, usualmente as concentrações de 10^6, 10^7 e 10^8 UFC/mL ou UFC/g são aceitas como níveis mínimos satisfatórios. Um alimento probiótico deve ser consumido regularmente, com valor aproximado de 100g/dia, a fim de fornecer aproximadamente a concentração de 10^7 células viáveis no intestino humano (Korbekandi et al., 2011; Mohammadi et al., 2011; Heydari et al., 2011).

As BAL desempenham grande papel na determinação dos efeitos benéficos e positivos na fermentação de leites e produtos derivados. De acordo com Shiby et al. (2013), *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são as espécies mais conhecidas, devido à sua utilização em alimentos probióticos lácteos. Estes produtos são considerados úteis na manutenção da boa saúde, pois restauram o vigor do corpo e podem atuar na prevenção de infecções gastrointestinais, na redução dos níveis de colesterol e na atividade antimutagênica.

Em recente pesquisa, Arena et al. (2014b) estudaram a aplicação das cepas probióticas *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* com relação ao seu potencial na produção de riboflavina e atestaram que ambas as bactérias são promissoras para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais enriquecidos com riboflavina.

Já os pesquisadores Park et al. (2014) descreveram a metodologia de processamento do *kimchi* e o caracterizaram como um vegetal fermentável com propriedades funcionais. De acordo com a pesquisa, o *kimchi* pode ser considerado um alimento vegetal probiótico, rico em bactérias láticas que contribuem beneficamente, de maneira similar aos micro-organismos probióticos.

Oliveira et al. (2012) exibiram os resultados de uma pesquisa sobre as características sensoriais, físico-químicas e tecnológicas de queijo de cabra (coalho) contendo bactérias probióticas, como *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* (cultura iniciadora de queijos), *Lactobacillus acidophillus* (LA-5), *Lactobacillus paracasei* (*Lactobacillus casei*-01), *Bifidobacterium lactis* (BB-12), *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *B. lactis*. Na pesquisa, os autores puderam assegurar a qualidade do queijo durante 21 dias de armazenamento a 10 ºC.

Dentro desse contexto, a utilização do *S. thermophilus* TA 040, considerado uma cepa produtora de exopolissacarídeos, tem sido largamente estudada como cultura iniciadora, devido a sua influência positiva sobre as

propriedades tecnológicas e funcionais em bebidas lácteas (London et al., 2015; Prasanna, 2013). As propriedades biotecnológicas da cepa de *S. thermophilus* contribuíram para a qualidade das bebidas lácteas em relação aos parâmetros reológicos, textura e viscosidade. Os atributos relacionados à textura, proporcionados pela cepa de *S. thermophilus*, têm sido crescentemente apontados em diversos trabalhos de pesquisa (De Vuyst et al., 2011; Oliveira et al., 2011a; Marafon et al., 2011).

Mohammadi et al. (2011) evidenciaram várias características relevantes, quando do uso de micro-organismos probióticos como cultura iniciadora na produção de leites fermentados, tais como aumento de células probióticas viáveis, incremento da taxa de acidificação e propriedades organolépticas satisfatórias que denotam qualidade e propriedade do produto final.

3.1.1 Importância de micro-organismos probióticos como culturas iniciadoras

Os trabalhos de pesquisa abaixo relacionados tiveram como foco principal a investigação da influência de coculturas iniciadoras probióticas na fabricação de bebidas lácteas funcionais. Os autores mencionados investigaram a utilização de coculturas iniciadoras probióticas e os ganhos biotecnológicos por elas proporcionados no campo alimentício.

A pesquisa de Ng et al. (2011) teve como base de estudo o efeito de culturas probióticas iniciadoras de iogurte na sobrevivência da cepa de *Lactobacillus acidophilus,* em coculturas com *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Os autores reportaram que o decréscimo do pH e o acúmulo de ácidos orgânicos, durante o período de armazenamento refrigerado a 4 ºC, atuaram positivamente na sobrevivência de *L. acidophilus*.

Champagne et al. (2010) identificaram a capacidade de três cepas probióticas, seja em culturas puras e em coculturas de *S. thermophilus* ST5, *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, na produção de isoflavonas e de vitamina B em uma bebida fermentada de soja. Neste estudo em particular, foi constatado que a cocultura de *S. thermophilus* ST5 com

L. helveticus R0052 reduziu significativamente a capacidade de bioconversão de isoflavonas de soja.

Agata et al. (2012) produziram uma bebida fermentada com leite de cabra, utilizando uma composição de culturas de bactérias ácido-láticas e leveduras. Na pesquisa, foram utilizadas as cepas de *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *S. thermophilus* e *L. delbruckii* subsp. *bulgaricus*, além da levedura *Saccharomyces fragilis*, como culturas iniciadoras. A utilização das cepas supracitadas diminuiu o tempo para completar a fermentação e atingir o pH de 4,5.

Além disso, Nambou et al. (2014) reportaram que combinação dos micro-organismos *Kluyveromyces marxianus* BD01004, *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus* BD00014, *Lactobacillus kefiri* BD00002, *L. lactis* BD00736 em cocultura com *S. thermophilus* BD00089 apresentou características físico-químicas e reológicas apropriadas para um produto à base de kefir.

3.1.2 Efeitos das culturas probióticas na fermentação

A produção de iogurtes contendo micro-organismos probióticos vem crescendo significativamente e de forma sendo bem-sucedida, uma vez que os consumidores, cada vez mais, se mostram dispostos a incluí-los em seus hábitos alimentares (ASHRAF e SHAH, 2011).

Segundo Settachaimongkon et al. (2014), a cooperação entre *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi um dos fatores-chave que determinou o processo fermentativo e a qualidade final de iogurtes. O resultado desta cooperação aumentou significativamente a população das duas espécies estudadas, favorecendo a acidificação do leite com aumento abundante de compostos voláteis e não voláteis derivados do metabolismo destas cepas, que proporcionaram a boa qualidade organoléptica do iogurte.

Comprovando a importância das coculturas de *S. thermophilus* e *L. deldrueckii* ssp. *bulgaricus*, sobretudo para a indústria alimentícia, Zhang et al. (2014) estudaram a influência da caseína hidrolisada na síntese dos exopolissacarídeos e puderam concluir que tanto a adição da proteína como a

relação simbiótica dos micro-organismos contribuíram positivamente para a melhor síntese de exopolissacarídeos.

Florence et al. (2012) analisaram a influência de *Bifidobacterium animalis* subsp*. lactis* HN019 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA040 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp*. bulgaricus* na produção de leites fermentados convencional e orgânico. Os resultados adquiridos indicaram que a taxa de acidificação foi maior com o uso de leite orgânico, assim como a contagem bacteriana e a concentração de ácidos linolênico conjugado, α-linolênico, trans-octadecenoico e graxos, em comparação com o leite convencional.

O efeito da composição de coculturas bacterianas probióticas em diferentes tipos de leite (convencional, orgânico e desnatado) e a utilização de meios de cultivos alternativos, tal como o soro de leite, nas propriedades cinéticas de crescimento celular e na firmeza de bebidas lácteas funcionais são objeto de estudo de muitos pesquisadores (Iyer et al., 2010; Ashraf et al., 2011; Mende et al., 2014; Marafon et al., 2011; Badel et al., 2011).

3.2 Prebióticos e suas aplicações em alimentos funcionais

A influência dos prebióticos no crescimento celular das BAL tem despertado, nos últimos anos, cada vez maior interesse pela sua propriedade de alimento funcional, por seus potenciais efeitos benéficos à saúde e ao bem-estar daqueles que os consomem.

Os prebióticos são carboidratos não digeríveis que, pelo processo de adsorção, resistem à hidrólise na parte superior do trato gastrointestinal humano (Mattila-Sandholm et al., 2002). Quando ingeridos em quantidades adequadas, estes ingredientes atingem o cólon ainda intactos, favorecendo a modulação e a composição da microbiota intestinal, proporcionando benefícios à saúde do hospedeiro e, consequentemente, de quem os consomem (Lamichhane et al., 2014; Saad et al., 2013; Roberfroid et al., 2010; Roberfroid, 2007).

Rastall (2010) estudou as aplicações e a industrialização dos prebióticos e constatou que, embora existam vários hidratos de carbono comercializados como prebióticos em todo o mundo, merecem destaque a inulina, os fruto-

oligossacarídeos (FOS) e os galacto-oligossacarídeos (GOS), devido ao histórico bem sucedido em testes clínicos humanos.

Na avaliação da influência de prebióticos, como a inulina e a lactulose, verificou-se a melhora da contagem microbiológica e da acidificação de culturas probióticas puras e coculturas em leite desnatado fermentado; também verificou-se que a suplementação de inulina reduz significativamente o tempo para complementar a fermentação (Oliveira et al., 2009, Oliveira et al., 2011a, Oliveira et al., 2011b).

De acordo com Sims et al. (2014), a definição de simbiose entre os ingredientes prebióticos e as bactérias probióticas pode ser feita com base na exata seleção de um composto prebiótico, o qual favorece seletivamente o crescimento de bactérias probióticas, melhorando, assim, sua sobrevivência e sua persistência no sistema gastrointestinal.

Os oligossacarídeos prebióticos, tais como os FOS e os GOS, podem ser utilizados no meio de cultura para otimizar a produção de espécies de *Bifidobacterium breve*, *B. lactis* e *B. longum* (Kondepudi et al., 2012).

3.2.1 Inulina

A inulina é um polissacarídeo armazenado naturamente em plantas e derivados. Este polissacarídeo está presente como reserva de carboidratos nas raízes e nos tubérculos de plantas, podendo ser encontrado em mais de 30.000 produtos vegetais, dos quais destacam-se *Helianthus tuberosus* (alcachofra-de-jerusalém), *Cichorium intybus* (chicória), *Dahlia pinnata* (dália) e *Polymnia sonchifolia* (yacon), que possuem vasta variedade de aplicações alimentares e farmacêuticas (Apolinário et al., 2014; Wichienchot et al., 2011).

Estudando a estrutura química dos frutanos (Figura 1), alguns autores evidenciaram que o tipo de inulina é constituído por número variável de unidades de frutose com ligações quase que predominantemente β(2→1) D-frutose-frutosílicas e geralmente termina com apenas uma unidade de glicose ligada através de uma α-$_D$-glucopiranosil ou de uma ligação de sacarose α(1→2) (Angus etal., 2005; Apolinário et al., 2014; Chi et al., 2011).

Inulina	Oligofrutose
*GP = 3 a 60	GP = 2 a 7
**G-F-F	
G-F-F-F	G-F-F e F-F
G-F-F-F-F	G-F-F-F e F-F
G-F-F-F-...-F-F-F	G-F-F-F-...-F-F e F-F-...-F-F
↑	↑
β-(2-1)	β-(2-1)

* GP (Grau de polimerização); **G (Glicose), F (Frutose)

Figura 1 - Estrutura química da inulina e das oligofrutoses. Adaptado de Angus et al. (2005).

A partir da estrutura polimérica da inulina descrita acima, fica evidente que o principal aspecto da estrutura química do polissacarídeo está associado com as suas ligações β(2→1), o que impede que a inulina seja digerida como um típico carboidrato, característica que é responsável pelo seu baixo valor calórico e pelo seu comportamento como uma fibra dietética prebiótica (Roberfroid & Slavin, 2000).

Segundo Tárrega et al. (2010), outra propriedade funcional e físico-química da inulina está associada ao grau de polimerização (GP) presente em sua cadeia ramificada. As oligofrutoses de cadeia curta são mais solúveis e mais doces do que a inulina de cadeia longa. Ter cadeia longa, ser menos solúvel, ser mais viscosa e ser mais termoestável são características que fazem com que a inulina contribua para as propriedades reológicas e sensoriais de produtos lácteos como substitutos de gordura. Em particular, a inulina atua como um enchimento ou como quebra de estrutura – da mesma forma como os glóbulos de gordura fazem.

No âmbito da tecnologia de alimentos, a inulina tem sido utilizada para substituir estabilizadores em produtos alimentares, melhorando a estabilidade, por exemplo, de espumas e emulsões em sorvetes e sobremesas aeradas (Franck & Coussement, 1997).

Em pesquisa recente sobre os aspectos tecnológicos, bioquímicos e farmacêuticos da inulina, Apolinário et al. (2014), Patel et al. (2012) e Wouters (2010) estudaram os benefícios nutricionais que essa fibra proporciona para os seres humanos e identificaram que, devido às suas ligações glicosídicas

β(2→1), a inulina não pode ser hidrolisada pelas enzimas digestivas dos seres humanos. Sendo assim, a fibra passa pelo trato gastrointestinal sem sofrer qualquer alteração significativa e sem ser absorvida.

Por este motivo, todos esses compostos são classificados como sendo não digestíveis pelo organismo humano (Roberfroid, 2007). Deste modo, a inulina alcança o cólon virtualmente inalterada, sendo completamente metabolizada pelas bactérias anaeróbicas intestinais. Isto contribui para a energia do metabolismo do hospedeiro, o que explica o valor calórico reduzido de inulina, entre 1,0 e 1,5 kcal/g (Roberfroid, 1999).

A inulina não tem influência sobre os níveis de glicose ou insulina no sangue, quando ingerida por via oral, e tem sido conhecida como um alimento para diabéticos, desde o início do século XX (Beringer & Wenger, 1955).

Apolinário et al. (2014) identificaram que a inulina pode ser considerada um substituto de açúcar ou gordura, pois apresenta valor calórico mais baixo, agindo de maneira similar às fibras dietéticas, contribuindo, assim, para a melhora das condições do sistema gastrointestinal. Os mesmos autores destacaram as possíveis aplicações farmacêuticas da inulina, como a utilização como medicamento de via oral direcionado à saúde do sistema gastrointestinal.

Devido a essas propriedades, tanto as indústrias de alimentos como as farmacêuticas têm diferentes aplicações da inulina e seus derivados (FOS), destinando-os à produção de alimentos funcionais, compostos nutracêuticos e medicamentos.

3.3 Importância do soro de leite

O soro de leite é um subproduto da produção de queijo e da obtenção de caseína da indústria de laticínios. Este resíduo ainda é um grande agente de poluição ambiental, em razão das grandes quantidades produzidas e de sua elevada carga orgânica. Rico em nutrientes, esse subproduto desafia a ciência e a tecnologia quanto ao seu reaproveitamento como matéria-prima. Uma das formas de reaproveitá-lo seria como meio de cultivo alternativo para a produção de uma biomolécula de alto valor agregado, como, por exemplo, a nisina.

Adotando uma filosofia baseada na sustentabilidade ambiental, que visa a redução nos custos de obtenção de biomoléculas microbianas, Jozala et al. (2007) estudaram a produção da nisina, a partir de leite diluído e desnatado, e puderam constatar a viabilidade desse processo.

No Brasil, aproximadamente 50% do soro de leite são descartados – sem tratamento – em rios e, devido às suas altas concentrações de matéria orgânica, são considerados altamente poluentes. Portanto, o reaproveitamento desse subproduto da indústria de laticínios é relevantemente necessário.

Pescuma et al. (2012) avaliaram o crescimento e a atividade proteolítica de diversas BAL em soro de leite e a sua utilização como culturas iniciadoras no desenvolvimento de produtos lácteos funcionais. Eles constataram que o soro de leite pode ser um interessante meio de cultivo na obtenção de bebidas lácteas. As bactérias láticas cultivadas nesse meio de cultivo foram capazes de agregar características nutricionais ao produto, pois sua alta atividade proteolítica proporcionou a disponibilização de aminoácidos essenciais durante o período de armazenamento.

Em outra pesquisa, realizada por Pescuma et al. (2010), objetivou-se a formulação de bebidas lácteas funcionais com baixo teor de lactose a partir de *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 em monocultura ou em cocultura com *S. thermophilus* CRL 804 e *L. delbrueckii* subsp*. bulgaricus* CRL 656*,* cultivados em soro de leite concentrado (35% de proteínas). Nas coculturas, foram alcançados os melhores resultados quanto ao perfil de acidificação, em consequência da rápida redução do pH.

Para estudar a aplicação biotecnológica do soro de leite, Schirru et al. (2014) realizaram uma comparação da produção de bacteriocina pela cepa *Enterococcus faecium* através de dois meios de cultivo: o MRS e o meio de cultivo alternativo – soro de queijo. O estudo comparativo atestou que o soro de queijo, considerado uma grande fonte de poluição da indústria de laticínios, pode ser utilizado como substrato na produção de bacteriocina pela cepa analisada. Vale ressaltar que a substituição de alguns componentes do meio de cultivo comercial MRS pelo meio de cultivo alternativo (soro de queijo) pode ser uma estratégia interessante na otimização da produção de bacteriocina a baixo custo.

A redução de custos na obtenção da nisina, por intermédio da cepa *Lactococcus lactis* UQ2, foi o objeto de estudo de González-Toledo et al. (2010).

O cultivo ocorreu em um biorreator utilizando o soro de leite como meio de cultura alternativo. Diante dos resultados obtidos, os autores puderam constatar ótimas condições para a produção de nisina empregando o meio de cultivo alternativo para o crescimento da cepa de *L. lactis* UQ2.

Por sua vez, Nakamura et al. (2013) empregaram o soro de leite na produção de gassericina A, bacteriocina produzida pela cepa de *Lactobacillus gasseri* LA 39, e verificaram o potencial dessa bacteriocina na preservação de alimentos contra as bactérias patogênicas, entre as quais *Bacillus cereus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Achromobacter denitrificans* e *Pseudomonas fluorescens*. Os resultados indicaram que, após 30 dias de incubação a 30 ºC, todas as bactérias inoculadas foram completamente inibidas na presença da referida bacteriocina. A reutilização do soro de queijo, na pesquisa, pode contribuir para a produção em escala industrial de um antimicrobiano natural para a conservação de alimentos.

Em estudo utilizando soro de queijo hidrolisado suplementado com ácido fenilpirúvico, Rodríguez-Pazo et al. (2013) analisaram a fermentação do *Lactobacillus plantarum* e a expressão de bacteriocina e compostos antimicrobianos correspondentes, bem como a de aromas naturais. Os autores depreenderam, a partir do experimento, que o *L. plantarum* é um potencial produtor de aromas naturais, como o acetofenona, e capaz de aumentar a produção dos compostos antimicrobianos, tais como o ácido fenilático e o ácido lático; além de evidenciar atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus*, a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella entérica*.

Já para o aumento da biomassa de grãos de kefir, as proteínas de soro de leite tiveram papel importante mesmo em condições de crescimento diversas, segundo Guzel-Seydim et al. (2011); no estudo, a maior taxa de crescimento em grãos de kefir foi evidenciada com a suplementação de proteínas de soro de leite.

3.4 Propriedades reológicas na sobrevivência de probióticos

As BAL mesófilas ou termófilas, dentre elas a cepa *Streptococcus thermophius*, são capazes de sintetizar exopolissacarídeos. Estas biomoléculas podem ser utilizadas no processamento de alimentos com o intuito de aprimorar as propriedades físicas de produtos fermentados, tais como iogurtes, sobremesas à base de leite, queijos e massas fermentadas (Mende et al., 2013).

No caso específico da produção de exopolissacarídeos a partir das BAL, Mende et al. (2014) verificaram que a cepa *S. thermophilus* ST-143 exibiu características reológicas desejáveis e que a acidificação do leite foi adequada. No mesmo estudo, pode-se também observar que o aumento da viscosidade do leite, durante a acidificação, foi linearmente proporcional à concentração de exopolissacarídeos.

Ramchandran et al. (2010) evidenciaram a produção de exopolissacarídeos pelas cepas probióticas *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* sobre as propriedades reológicas de iogurtes na presença e na ausência de inulina, durante o armazenamento refrigerado. Os autores constataram que o rendimento bruto dos exopolissacarídeos aumentou 2,4 vezes até o 21º. dia de armazenamento e que a presença desses exibiu efeito protetor sobre a sobrevivência de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*.

Estudando as propriedades reológicas na sobrevivência de probióticos, Laneuville et al. (2014) observaram que houve aumento significativo da viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M em combinação com diferentes polissacarídeos.

Para Settachaimongkon et al. (2014), a cooperação entre *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é um dos fatores-chave que determina o processo fermentativo e a qualidade final de iogurtes. O resultado desta cooperação pode acelerar a acidificação do leite e ocasionar aumento significativo de compostos (voláteis e não voláteis) derivados do metabolismo destas cepas, que proporcionam a boa qualidade organoléptica do iogurte.

Em outra pesquisa, Mende et al. (2012) investigaram a produção de exopolissacarídeos a partir de três diferentes cepas de *S. thermophilus*. A investigação revelou que a produção de exopolissacarídeos por *S. thermophilus*

atuou positivamente sobre a viscosidade inerente, impactando na aparência visual e na estrutura do produto.

Segundo Zhang et al. (2011), o crescimento e a produção de exopolissacarídeos pela cepa de *S. thermophilus* ST1 em leite desnatado foram dependentes das condições do meio de cultivo, tais como: temperatura, pH inicial e composição (carbono e nitrogênio, por exemplo). O leite desnatado, utilizado como meio de cultura, apresentou condições favoráveis para o crescimento de *S. thermophilus* e para a obtenção de exopolissacarídeos, o que proporcionou melhoria das propriedades reológicas em produtos lácteos fermentados.

Por outro lado, Costa et al. (2012) relataram que a produção de exopolissacarídeos por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DPC6532 não apresentou diferença significativa sobre os parâmetros de coagulação do queijo – embora maior rendimento final tenha sido observado. Essa constatação deveu-se à retenção extra de água por parte dos exopolissacarídeos, a qual atuou negativamente sobre os rearranjos micelares do queijo e a coagulação, por conseguinte.

Iogurtes preparados com *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* em cocultura com *S. thermophilus* CIRMBIA 67 e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIRMBIA 1327 tiveram baixo teor de gorduras e propriedades reológicas adequados (Prasanna et al., 2013).

A produção de iogurte com baixo teor de gordura foi também o objeto de pesquisa de Stijepic et al. (2012), quando analisaram bebidas lácteas enriquecidas com soro de leite concentrado, na ausência e na presença de mel, elaboradas com 10% de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 90% de *S. thermophilus*. Os pesquisadores constataram que a adição do mel ao soro de leite concentrado revelou efeitos positivos sobre as propriedades físico-químicas, o pH, o ácido lático e a viscosidade do iogurte, pois tal acréscimo propiciou maior retenção de água.

3.5 Bacteriocinas produzidas por bactérias láticas

Atualmente, o interesse pela pesquisa de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas, especialmente as probióticas, vem ganhando grande impulso biotecnológico e científico, devido ao potencial antimicrobiano que estas cepas podem proporcionar, já que bacteriocinas podem ser utilizadas como antibiótico terapêutico natural (Heel et al., 2011). De acordo com Perez et al. (2014), a capacidade das BAL em produzir bacteriocinas as tornaram particularmente favoráveis às indústrias de alimento e farmacêutica.

As bacteriocinas são consideradas um grupo de peptídeos ou proteínas bioativas sintetizadas ribossomicamente que são liberadas extracelularmente, exibindo interesse biotecnológico por apresentarem atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas (Martinez et al., 2013; Beshkova & Frengova 2012).

As bacteriocinas são consideradas um grupo heterogêneo de peptídeos antimicrobianos, pois apresentam variações no seu espectro de atividade: modo de ação, massa molar, origem genética e propriedades bioquímicas (Arauz et al., 2009; Gupta et al., 2014). Estas biomoléculas são utilizadas na biopreservação de alimentos por inibirem bactérias patogênicas, entre as quais *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* (Banerjee et al., 2013).

Beshkova & Frengova (2012) avaliaram a produção de bacteriocinas, através de BAL, com a finalidade de atestar o potencial bacteriocinogênico dessas culturas e sua importância biotecnológica na indústria de laticínios. Os pesquisadores verificaram que as BAL possuem características que satisfazem tanto os requisitos de relevância tecnológica, como cultura iniciadora padrão na produção de laticínios funcionais, quanto na produção de bacteriocinas com atividade antimicrobiana, atuando como bioconservadoras, de forma a assegurar a qualidade de produtos alimentícios.

As características e as aplicações dos compostos antimicrobianos produzidos por BAL foram estudadas por Reis et al. (2012). A utilização desses compostos é considerada um avanço promissor na indústria alimentícia, por estender a vida útil dos produtos e garantir a saúde dos consumidores. Luo et al. (2011) revelaram que as cepas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis* e

Leuconostoc lactis expressaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia aerogenes*.

Evidenciando estas propriedades supracitadas, Ribeiro et al. (2013) identificaram que a cepa de *L. lactis* apresenta significativa aplicabilidade como cultura adjunta na produção de queijo. O estudo revelou importantes propriedades tecnológicas no que diz respeito à qualidade organoléptica e à segurança alimentar, proporcionada pela ação de bacteriocinas por esta cepa produzida.

Nesse aspecto, Fernandez et al. (2013) constataram que bacteriocinas produzidas por culturas láticas, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diaceylactis* UL719, *L. lactis* ATCC 11454 e *Pediococcus acidilactici* UL5, foram capazes de inibir *Listeria ivanovii* HP28 em condições simuladas do cólon.

As bactérias ácido-láticas probióticas, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, exibem grande potencial biotecnológico nas indústrias de alimento e farmacêutica. Tal potencialidade está principalmente relacionada com a produção de bacteriocinas, incluindo a nisina, largamente empregada na biopreservação de produtos alimentícios por sua ação contra uma variedade de bactérias patogênicas, como *Brochothrix thermosphacta e Listeria monocytogenes* (Tabela 1).

O efeito antimicrobiano da nisina produzida pela cepa de *L. lactis* tem sido reportado em diferentes pesquisas (Aly et al., 2012; Miller et al., 2010; Malheiros et al., 2012; Kumar et al., 2012; Wijnker et al., 2011). Alguns autores já reportaram a capacidade que a nisina oriunda de *L. lactis* tem no controle de *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* e esporos de *Clostridium beijerinckii* (Biscola et al., 2013; Garde et al., 2011).

Tabela 1 - Aplicações das bacteriocinas na biopreservação de alimentos.

Bacteriocinas	**Cepa produtora**	**Micro-organismo alvo**	**Fonte**	**Redução (log UFC/g)**
Nisina	*Lactococcus lactis*	*Brochothrix thermosphacta*	Porco	3,5
Nisina	*L. Lactis*	*Listeria monocytogenes*	Leite fermentado	6,0
Pediocina AcH	*Lactobacillus plantarum*	*L. monocytogenes*	Queijo	1,0-2,0
Enterocina	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus aureus*	Leite	2,0
Enterocina	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus aureus*	Salsicha	5,3
Nisina Z	*Lactococcus lactis*	*S. aureus*	Queijo pitu Afuega'l	2,0

Fonte: Adaptado de Balciunas et al. (2013).

A aplicação biotecnológica do *Lactococcus lactis* no campo da medicina veterinária é consensual entre os pesquisadores. Em particular, Fernández et al. (2008) demonstraram que a nisina, utilizada como subtituta de antibióticos, foi muito eficiente no tratamento de mastite estafilocócica bovina. Espeche et al. (2012) reportaram que algumas BAL possuem eficientes mecanismos de adesão às células epiteliais, agregação e inibição de agentes patogênicos relacionados à enfermidade.

Ustyugova et al. (2012) identificaram e caracterizaram as bacteriocinas produzidas por *L. lactis* subsp. *lactis* 194-k e verificaram que a produção foi dependente do meio de cultivo. A cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* 194 k demonstrou os melhores resultados quanto à expressão da nisina A nos meios de cultivo contendo extrato de levedura, caseína hidrolisada e fosfato de potássio. Os mesmos autores observaram que a biossíntese da bacteriocina ocorreu paralelamente ao seu crescimento bacteriano, no intervalo de 14 a 20h.

3.6 Características, classificação e propriedades antimicrobianas das bacteriocinas

O método mais comum empregado na conservação de alimentos é a utilização de aditivos alimentares ou conservantes, considerados produtos químicos nocivos. Com essa finalidade, também são comumente utilizados tratamentos de aquecimento e secagem, muito embora estes possam contribuir para a redução da qualidade e para a alteração da textura de produtos alimentícios.

Dessa forma, a utilização biotecnológica de BAL, com destaque para *Lactococcus, Oenococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pedicoccus* e *Streptococcus* ssp., é geralmente reconhecida como segura por apresentar propriedades probiótica e antimicrobianas, tais como as bacteriocinas (Mayo et al., 2010; Balciunas et al., 2013).

As bacteriocinas são geralmente definidas como peptídeos bioativos naturais produzidos pelas BAL, com propriedade antimicrobiana que inibe ou mata outros micro-organismos patogênicos, mantendo a qualidade necessária de alimentos, de forma a enriquecer suas qualidades globais e a beneficiar a saúde do consumidor (Gálvez et al., 2007; Khochamit et al., 2015).

De acordo com Hammami et al. (2013), as bacteriocinas são classificadas por suas propriedades bioquímicas e genéticas e pelo perfil de bioatividade. Nos últimos dez anos, essas biomoléculas microbianas foram categorizadas em quatro principais classes (Tabela 2). Bacteriocinas pertencentes à Classe I, chamadas de lantibióticos, que são termicamente estáveis, com baixa massa peptídica molecular de < 5 KDa e distinguíveis por serem sujeitas às modificações pós-translacionais (Willey e Van der Donk, 2007). As da Classe II são peptídeos sem modificações translacionais, que podem ser divididos em quatro subgrupos. Na Classe III, estão as bacteriocinas maiores do que as anteriores, contendo uma massa molecular de >30 KDa, e são consideradas proteínas termolábeis. Finalmente, as da Classe IV incluem os peptídeos com ligações cíclicas covalentes terminais N e C.

Tabela 2 - Classificação das bacteriocinas.

Classificação	**Características**	**Subcategorias**	**Exemplos**
Classe I ou lantibióticos	Lantionina ou peptídeos contendo β-lantionina	Tipo A (moléculas lineares) Tipo B (moléculas globulares)	Nisina, subtilina e epidermina Mersacidina
Classe II	Classe heterogênea de pequenos peptídeos termoestáveis	Subclasse IIa	Pediocina, enterocina, sakacina
		Subclasse IIb (compostos de dois peptídeos)	Plantaricina, lactacina F
		Subclasse IIc (outras bacteriocinas)	Lactococina
Classe III	Peptídeos maiores e termolábeis		Helveticina J, millericina B

Fonte: Adaptado de Balciunas et al. (2013).

A classificação e a produção de bacteriocinas, bem como a sua aplicação em alimentos pela espécie *Lactobacillus acidophilus*, foram estudadas por Anjum et al. (2014), que concluíram que a espécie supracitada é um micro-organismo homofermentativo, microaerofílico, de cadeia curta, pertencente à Classe II de bacteriocinas, produtor de lactacina B, que atua contra *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus leichmani*. A bacteriocina possui massa molecular de 6,6 kDa, com boa estabilidade térmica a 121 ºC por 30 min, demonstra máxima atividade antimicrobiana a pH 6,0 e é sensível a enzimas proteolíticas, dentre elas tripsina, ficina, pepsina, papaína e proteinase K.

Gupta et al. (2014) estudaram as aplicações bioquímicas da plantaricina, bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus plantarum* LD1, quanto à estabilidade a altas temperaturas e ao pH, como também à sua estabilidade na presença de

solventes orgânicos, tais como surfactantes e detergentes. Estes pesquisadores puderam certificar que a atividade antimicrobiana da plantaricina foi de 100% em valores do pH de 2,0 a 6,0 e 61% com pH de 7,0 a 8,0 – e que não houve atividade da bacteriocina com o valor de pH de 10,0. Quanto à estabilidade a altas temperaturas, a bacteriocina produzida pela cepa *L. brevis* OG1 demonstrou-se mais estável a 121 ºC por 60 min, já a bacteriocina produzida pela cepa de *L. plantarum* (plantaricina) exibiu 50% de sua atividade a 121 ºC durante 5 min e perda total de atividade durante 10 min. No que diz respeito aos solventes orgânicos, foi observada a estabilidade da bacteriocina quando tratada com surfactantes e detergentes.

Quanto às propriedades antimicrobianas das bacteriocinas, Furtado et al. (2014) estudaram o potencial bacteriocinogênico do *Lactococcus lactis* subp. *lactis* DF04 Mi isolado do leite de cabra e puderam confirmar que a bacteriocina em questão apresentou grande espectro de atividade antimicrobiana, além das seguintes características: sensível a enzimas proteolíticas (proteinase K, α-quimotripsina e pepsina); resistente a baixas e altas temperaturas (4 ºC e 121 ºC por 20 min); resistente aos diferentes valores de pH (intervalo de 2 a 10); e atividade antimicrobiana não afetada pela presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), Tween 20, Tween 80, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e NaCl.

Em outra pesquisa a respeito das propriedades físico-químicas e compostos antimicrobianos produzidos por *Lactobacillus* isolado de peixe esturjão, Ghanbari et al. (2013) identificaram a produção de bacteriocinas pertencentes à Classe II, com potencial antimicrobiano frente a bactérias patogênicas, as quais se destacam *Escherichia coli, Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus, Aeromonas hydrophila, Vibrio anguillarum* e *Bacillus cereus* com massa molar de 3 a 5 kDa, estáveis à temperatura de -20 ºC a 120 ºC, tolerância ao pH de valores entre 3 e 12 e estabilidade química ao dodecil sulfato de sódio, EDTA, Tween 20 e Tween 80 e sensível a enzimas proteolíticas.

A habilidade de se produzirem bacteriocinas associadas às suas características e classificação foi o objeto de estudo de Grosu-Tudor et al. (2014). No trabalho, foram identificadas seis novas BAL isoladas a partir de alimentos tradicionais fermentados na Romênia, sendo elas: *L. lactis* 19.3, *Lactobacillus plantarum* 26.1, *Enterococcus durans* 41.2, *Lactobacillus*

amylolyticus P40, *Lactobacillus amylolyticus* P50 e *Lactobacillus oris* P49. Demonstraram, ainda, no estudo, que alimentos tradicionais fermentados, como produtos lácteos, legumes, frutas e flores frescas, são importantes fontes suplementares e funcionais no crescimento das BAL. As seis cepas testadas indicaram a expressão de bacteriocinas estáveis, com baixa massa molar, amplo espectro inibitório, provavelmente pertencentes à Classe II. Ainda na pesquisa, foram também detectadas proteínas com espectro inibitório relativamente estreito, supostamente relacionadas à Classe III de bacteriocinas.

3.7 Aplicação de bacteriocinas nos campos alimentar e farmacêutico

A aplicação de bacteriocinas como biopreservativos vem crescendo gradativamente nos últimos anos. As principais aplicações dessas biomoléculas são nas áreas de alimentos e clínica. De acordo com Balciunas et al. (2013), as bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos por três diferentes maneiras: em alimentos fermentados, podem ser produzidas *in situ* pela adição de bactérias láticas bacteriocinogênicas, no lugar das tradicionais culturas iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou parcialmente purificadas.

A inoculação de BAL em alimentos, como culturas iniciadoras, tornou-se uma alternativa funcional e altamente aplicável nas indústrias para o controle de bactérias patogênicas, visto que as propriedades organolépticas dos alimentos são mantidas. Alimentos contendo bioconservantes naturais e alternativos são aqueles que empregam o produto metabólico de micro-organismos considerados antagonistas, denominados bacteriocinas. Estas biomoléculas inibem a ação de bactérias indesejáveis presentes em alimentos e, consequentemente, melhoram a sua qualidade e prolongam a sua vida útil (Khochamit et al., 2015).

A nisina é uma bacteriocina polipeptídica que apresenta atividade antimicrobiana contra micro-organismos que provocam a deterioração de alimentos e agentes patogênicos associados a esses, tais como o *Clostridium botulinum*, o *Bacillus cereus* e a *Listeria mococytogenes* (Ibarguren et al., 2014). A nisina é considerada um aditivo alimentar aprovado pela *Food and Agricuture Organization*/*World Health Organization* (FAO/WHO) e consta da listagem da

Food and Drug Administration (FDA), sendo geralmente reconhecida como segura (GRAS), o que significa que a sua utilização em alimentos é inofensiva aos seres humanos (Thomas & Delves-Broughton, 2005).

De acordo com Arauz et al. (2009), a principal atribuição das bacteriocinas está relacionada à preservação das qualidades nutritivas da matéria-prima orgânica, através da inibição de micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Por essas razões, a nisina teve a aprovação da FDA como aditivo alimentar eficaz na biopreservação natural de alimentos, incluindo produtos lácteos, enlatados e queijos processados. Em particular, a nisina é um peptídeo sensível às proteases digestivas, podendo ser hidrolisada em ácidos aminos no intestino pela enzima α-quimotripsina.

Wijnker et al. (2011) estudaram a importância da nisina no campo alimentício e puderam comprovar que ela apresentou atividade antimicrobiana inibitória contra a esporulação de *Clostridium sporogenes* em salsichas naturais revestidas de tripas de ovinos.

A utilização da nisina na preservação de salada de vegetais foi realizada por Kumar et al. (2012), que observaram redução significativa do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* nos vegetais crus e minimamente processados, tais como nas folhas de espinafre, repolho, nabo, rabanete e couve.

Conforme identificado por Malheiros et al. (2012), a nisina comercial parcialmente purificada e encapsulada em lipossomas de lecitina de soja foi aplicada sobre a superfície de queijo minas frescal e se mostrou capaz de inibir o crescimento da *Listeria monocytogenes* no produto.

Miller et al. (2010) avaliaram a produção de nisina pela cepa de *Lactococcus* spp. e a sua aplicação comercial como conservante natural em produtos alimentícios à base de maionese. Os autores da pesquisa identificaram que a nisina favorece a extensão da vida de prateleira desses produtos, assim como contribui para diminuir os riscos associados à presença de *Listeria monocytogenes*.

No que se refere à aplicação da nisina como antibiótico alternativo, isso é devido ao aumento da resistência dos micro-organismos pelos antibióticos tradicionais, principalmente aqueles que possuem a enzima β-lactamase (Levin et al., 1998). Essa resistência é resultado do uso indiscriminado de antibióticos,

tanto na área da saúde humana e animal como na área agroindustrial. A falta de controle de doenças e agentes profiláticos tem contribuído significativamente para a emergência de bactérias resistentes e patogênicas em animais e plantas (Barton & Hart, 2001; Mcmanus et al., 2002).

Os lantibióticos ou as bacteriocinas de Classe I têm demonstrado aplicações no campo da saúde humana. No que diz respeito à saúde oral, a cepa *Streptococcus salivarius*, produtora do lantibiótico salivaricina A, tem reduzido o número de bactérias causadoras da halitose (Burton et al., 2006), enquanto que produtos lácteos suplementados com esta bacteriocina têm ajudado na redução de infecção por *Streptococcus pyogenes*, micro-organismo causador da faringite oral (Dierksen et al., 2007).

Na área da saúde sexual e contraceptiva, tanto a nisina como a lacticina foram capazes de eliminar espermatozoides de várias espécies animais (Reddy et al., 2004; Silkin et al., 2008).

Nesse contexto, os agentes antibacterianos, como os peptídeos antimicrobianos e as bacteriocinas, vêm sendo apontados por muitos pesquisadores como antimicrobianos naturais a serem explorados em métodos de engenharia genética e química (Ambalam et al., 2015; Farías et al., 1996; Duquesne et al., 2007; Biéler et al., 2010; Balciunas et al., 2013). Algumas bacteriocinas e suas respectivas aplicações farmacêuticas estão exibidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Exemplo de algumas bacteriocinas e suas aplicações farmacêuticas.

Grupos de bacteriocinas	Aplicações farmacêuticas
Lantibióticos	tratamento de pressão sanguínea tratamento de inflamações e alergias tratamento de infecções na pele tratamento da infeção de mastite bovina tratamento de herpes tratamento de cárie dental tratamento de úlcera péctica
Colicina	tratamento de infecção urinogenital tratamento de colite hemorrágica tratamento da síndrome de hemolítico-urêmico
Microcinas	agente antibacteriano tratamento de salmonelose

Fonte: Adaptado de Balciunas et al. (2013).

Yang et al. (2014) e Bali et al. (2014), em pesquisa recente, mencionaram as aplicações das bacteriocinas nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Frequentemente, o uso das bacteriocinas em alimentos está relacionado com biopreservação da qualidade de produtos, de forma a atuarem na extensão de sua vida útil. Já os consumidores que adotam dieta equilibrada, rica em alimentos funcionais probióticos, se beneficiam com a manutenção da boa saúde. Esses alimentos podem ser utilizados no tratamento de infecções provocadas por patógenos, como em terapias de câncer maligno, já que as bacteriocinas exibem importante atividade sobre as células tumorais. De acordo com Chumchalová & Smarda (2003), algumas bacteriocinas, entre as quais a colicina A e E1, foram capazes de inibir o crescimento de 11 linhagens de células tumorais humanas.

Segundo Wang et al. (2014), a jenseniin P, uma bacteriocina produzida a partir da cultura microbiana de *Propionibacterium jensenii* B1264, mostrou-se útil no tratamento da acne. A referida cepa vem despertando grande interesse na indústria farmacêutica, graças ao potencial de aplicação dermatológico, como substituta de antibióticos.

Ainda sobre as aplicações benéficas dos peptídeos antimicrobianos nos campos alimentar e farmacêutico, Sumi et al. (2015) analisaram os peptídeos do gênero *Bacillus*. No experimento, a bacitracina, importante bacteriocina polipeptídica, mostrou-se eficaz na inibição do crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Clinicamente, os autores puderam constatar que a administração via oral da bacteriocina foi eficiente enquanto substituta de antibióticos empregados no tratamento de colite e diarreia causadas por *Clostridium difficile*.

O efeito da atividade antimicrobiana da nisina contra o agente patógeno *Streptococcus suis* foi o tema da pesquisa de Lebel et al. (2013). Nela, utilizaram a cepa *Lactococcus lactis* ATCC 11454 como produtora de nisina e constataram que a mesma foi capaz de inibir o crescimento de *S. suis*. A atividade bactericida da nisina evidenciou potencial, quando comparada com uma série de antibióticos, tais como penicilina, amoxicilina, tetraciclina, estreptomicina e ceftiofur, em tratamentos de infecções severas causadas pelo *S. suis*.

4. Material e métodos

4.1 Culturas microbianas

Nesta pesquisa, foram utilizados os seguintes micro-organismos: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 (LL) (Coleção Espanhola de Cultivos – CECT) e *Streptococcus thermophilus* TA 040 (ST) (Danisco, ZA des Engenières, França). Como cepa bioindicadora, foi utilizado *Lactobacillus sakei* ATCC 1552.

4.2 Preparação dos meios de cultivo

4.2.1 Soro de leite

Como meio de cultivo alternativo, utilizou-se o soro de leite em pó (Cargill S.A., Campinas, SP, Brasil) hidrolisado com *Flavourzyme* (70 µL) (Novozymes, Dinamarca), que foi preparado na concentração de 10% (p/v) de sólidos totais. A seguir, a base de soro de leite foi suplementada ou não (controle) com inulina nas concentrações 2% e 4% (p/v). Posteriormente, o meio de cultivo foi homogeneizado com o auxílio de um agitador magnético, de acordo com Marafon et al. (2011). A seguir, o soro de leite foi termicamente tratado a 90 ºC durante 5 min (Fisatom, Modelo 550A) e resfriado, posteriormente, em banho de gelo por 15 min.

4.2.2 Meios de cultura sintéticos

Os meios de cultivo sintético foram preparados para a enumeração das culturas microbianas estudadas. O caldo MRS (*De Man*, *Rogosa* & *Sharpe*) (De Man et al., 1960) (Difco™, Sparks, MD, USA) foi utilizado como base para quantificação de *L. lactis* CECT 4434. O meio M17/Agar (Difco™, Sparks, MD, USA), identificado por Terzaghi et al. (1975), foi utilizado para contagem seletiva

de *S. thermophilus* TA 040. Todos os meios foram diluídos em água destilada estéril e elaborados conforme o fabricante.

4.2.3 Suplemento inulina

A inulina foi escolhida como ingrediente prebiótico adicionado ao meio de cultivo. Em trabalhos recentes, a inulina foi usada como importante indutora de crescimento para BAL, segundo Oliveira et al. (2009), Oliveira et al. (2012), Mei et al. (2011) e Pranckute et al. (2014).

4.3 Preparação do inóculo

4.3.1 *Lactococcus lactis* CECT 4434

A pré-cultura de *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 foi preparada adicionando-se 100 µL da cultura estoque em 100 mL de caldo MRS em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL, durante 12 horas, até se conseguir o valor de absorbância previamente definido de DO_{600nm}=0,9 nas seguintes condições do processo: 100 rpm/30 ºC. Estas condições foram obtidas através do cultivo em *shaker*. Posteriomente, o pré-inóculo foi centrifugado a 5.000 rpm/4 ºC/20 min, a fim de separar o *pellet* do meio de cultivo e, em seguida, foi lavado com água destilada estéril. Por fim, 10 mL da respectiva lavagem foram transferidos para 90 mL de soro de leite. Verificou-se que o número de bactérias viáveis, através do método *pour plate* em meio MRS/Agar, correspondia a $1,7x10^8$ UFC/mL de *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434.

4.3.2 *Streptococcus thermophilus* TA 040

Foi utilizada inicialmente uma pré-cultura do *S. thermophilus* TA 040, na qual foram adicionados 300 mg de cultura pura em 50 mL de soro de leite previamente pasteurizado em frascos *Schott* (Laborglas). Após a inoculação, os frascos foram levados em banho-maria (Fisatom, Modelo 550A) a 30 ºC durante 30 min. Verificou-se que o número de bactérias viáveis, através do plaqueamento em profundidade em meio M17/Agar, foi de 1,9 x10^8 UFC/mL para o *S. thermophilus* TA 040.

4.3.3 *Lactobacillus sakei* ATCC 1552

Para o teste da atividade antimicrobiana, utilizou-se o micro-organismo *Lactobacillus sakei* ATCC 1552, sensível à ação da nisina (Arauz, 2011; Arauz et al., 2008; Moraes, 2002). O cultivo da referida cepa foi realizado em meio MRS e incubado em agitador rotativo (*shaker*), nas seguintes condições do processo: 100 rpm, 30 ºC e 24 horas de cultivo.

4.4 Crescimento celular

O crescimento celular foi determinado através da diluição em série, ou seja, 0,1 mL de amostra em tubos contendo 0,9 mL de água peptonada esterilizada até atingir grau de diluição de 10^6 e 10^9. A contagem foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura MRS e ágar, para a cultura de *Lactococcus lactis*, e M17, para a cultura de *Streptococcus thermophilus*, expressa na forma de log UFC/mL, através do método *pour plate*. As placas foram armazenadas em câmara de incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 37 ºC por 48 horas.

4.5 Determinação de lactose e ácido lático

A determinação das concentrações de lactose e ácido lático foi realizada mediante cromotografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o método descrito por Donkor et al. (2007). Previamente, cada amostra foi centrifugada a 15.000xg, por 20 minutos, utilizando uma microcentrífuga U-32R (Boeckel, Hamburg, Germany) para remoção de micro-organismos e separação do sobrenadante. Posteriormente, a amostra foi diluída para a concentração entre 0,5 e 2g/L, filtrada, através de membrana de poro 0,45 µm (Milipore), e injetada em cromatógrafo líquido Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan), a 35 ºC, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), a 45 ºC, fase móvel de H_2SO_4 (5mM), com fluxo de 0,6 mL/min. Soluções de glicose, galactose, lactose e ácidos orgânicos (10 g/L cada) foram preparadas para a elaboração da curva de calibração. A quantificação dos açúcares foi executada através de curvas padrão previamente obtidas com soluções padrão de glicose e lactose (Sigma^{TM}, St. Loius, MO, USA) de alta pureza para uso em CLAE. Todas estas análises foram realizadas em triplicata.

4.6 Curva-padrão da nisina

A determinação de atividade da nisina foi realizada pelo método de difusão em ágar previamente descrito por Montville (1992). A curva associando a produção de nisina em UA (unidades arbitrárias) em função do diâmetro do halo de inibição foi obtida a partir de incubação da placa contendo a célula sensível de *Lactobacillus sakei* em estufa a 37 ºC por 24 horas.

4.6.1 Atividade antimicrobiana

Para a detecção da atividade da bacteriocina, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g, a 4 °C durante 10 min. O pH do sobrenadante foi neutralizado a 6,0-6,5, utilizando 1 M de NaOH, a fim de eliminar a ação de

ácidos orgânicos. Além disso, o sobrenadante foi submetido a 80 °C durante 10 min para eliminar possíveis proteases. Após o tratamento do sobrenadante, foi testada a atividade antimicrobiana contra a cepa de *L. sakei* ATCC 1552. Este teste foi realizado pelo ensaio de difusão em agar, quando 10 mL da cepa indicadora foram transferidos para uma placa de Petri contendo 15 mL de meio MRS agar. Uma vez solidificado, 10 µL de sobrenadante foram pipetados sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 30 °C durante 18 a 24 horas e, após este período, foi possível observar a zonas de inibição.

4.7 Sistema de fermentação *Cinétique d'acidification* (CINAC)

As cepas *S. thermophilus* TA 040 e *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 foram inoculadas em 100 mL de soro de leite, o qual foi previamente esterilizado a 121 ºC por 10 min, 5 min antes do uso; a média inicial de contagem microbiana de cada inóculo foi de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Os frascos *Schott* (Laborglas) contendo as bases de soro de leite foram aquecidos e inoculados (na proporção 1:1) na temperatura adequada de fermentação, 30 °C com 1mL de cada cultura, obtendo-se 10^8 UFC/mL como contagem inicial tanto para *S. thermophilus* TA 040 como para *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434. Após a inoculação, as amostras foram incubadas em sistema de fermentação CINAC, descrito por Spinnler & Corrieu (1989). Cada fermentação experimental foi realizada em triplicata.

O sistema CINAC permitiu a medição contínua e a gravação do nível de pH, computando a taxa de acidificação durante o período de fermentação. Os parâmetros cinéticos considerados são: valor inicial do pH, $T_{pH5,5}$ (tempo em horas para atingir o valor de pH 5,5), $T_{pH5,0}$ (tempo em horas para chegar ao valor de pH 5,0), $T_{pH4,5}$ (tempo em horas para completar a fermentação e alcançar o valor de pH 4,5), T_{Vmax} (tempo em horas para atingir a velocidade máxima de acidificação), pH_{Vmax} (valor do pH no momento de alcançar a velocidade máxima de acidificação) e V_{max} (velocidade máxima de acidificação – upH/min). O fermentado foi acondicionado em copos de 50 mL, selado termicamente, usando o equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil), e

rapidamente resfriado em banho de gelo. Após este processo, as amostras foram estocadas a 4 ºC para as análises posteriores.

4.8 Viscosidade

A avaliação reológica foi realizada através de reômetro rotacional Rheotest RN 3.1 (Rheotest, Germany), com um H1 probe cilíndrico concêntrico com rádio de 36 mm e altura de 70 mm. As amostras de soro de leite fermentadas (suplementado ou não com inulina), na quantidade de 50 mL, foram analisadas em triplicata, à temperatura de 25 ºC. Os dados foram capturados pelo programa Rheotest e expressos em mPa.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o *software* Statistica 13.0. Os valores foram comparados usando o teste de Tukey (Sokal and Rohlf, 1979) a $P < 0,05$; diferentes letras foram usadas para identificar as diferenças estatísticas entre eles.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cinética de acidificação

5.1.1 *Streptococcus thermophilus* TA 040

A Tabela 4 reproduz os dados obtidos através do sistema *Cinétique d'acidification* (CINAC), que define os parâmetros cinéticos de acidificação da cepa *Streptococcus thermophilus* TA 040, durante o cultivo em soro de leite, com ou sem suplementação de inulina, a 37 ºC até alcançar o valor de pH 4,5.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *S. thermophilus* TA 040.

Inulina (%)	pH_{Vmax}	T_{Vmax} (h)	$T_{pH\ 5,5}$ (h)	$T_{pH\ 5,0}$ (h)	$T_{pH\ 4,5}$ (h)	V_{max} (10^{-3}upH/min)
0	5,62 ± 0,12[a]	2,42 ± 0,19[a]	2,71 ± 0,33[a]	4,20 ± 0,21[a]	6,18 ± 0,23[a]	7,23 ± 0,40[a]
2	5,55 ± 0,22[a]	2,33 ± 0,35[a]	2,67 ± 0,17[a]	4,26 ± 0,13[a]	6,33 ± 0,18[a]	6,95 ± 0,46[a]
4	5,39 ± 0,31[a]	4,02 ± 0,25[b]	3,62 ± 0,19[b]	5,45 ± 0,17[b]	10,85 ± 0,33[b]	5,35 ± 0,64[b]

V_{max}: velocidade máxima de acidificação; T_{pH}: tempo para atingir o pH 5,5, 5,0 e 4,5; T_{Vmax}: tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação; pH_{Vmax}: valor do pH no instante da velocidade máxima de acidificação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas, de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

A média dos valores de pH do soro de leite no início da fermentação foi de 6,09 ± 0,13. Notou-se que houve queda de aproximadamente 10% no que concerne ao valor do pH no instante da velocidade máxima de acidificação (pH_{Vmax}). Observou-se também que o tempo para atingir a máxima velocidade de acidificação (T_{Vmax}) foi menor, tanto na ausência (2,42 h) como na presença de 2% (2,33 h) de inulina. Cassarotti et al. (2014) estudaram fermentação da cepa *S. thermophilus* TA 040 em leite a 42 °C e observaram que os valores de T_{vmax} (2,69 h) e pH_{Vmax} (5,58) foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

No que diz respeito ao tempo para atingir o valor de pH final da fermentação ($T_{pH4,5}$), a concentração de 4% de inulina ocasionou fermentação mais lenta (cerca de 42%) em relação aos tratamentos sem e com suplementação de 2 % do prebiótico. Isso se justifica devido ao menor valor de V_{max} no ensaio que se adicionaram 4% de inulina (5,35x10^{-3} upH/min). Com

relação a este parâmetro, Cassarotti et al. (2014) obtiveram valor de $22x10^{-3}$ upH/min, mas deve-se levar em conta que a temperatura utilizada neste estudo foi de 42ºC, além do meio de cultivo (leite) ter uma composição mais rica em nutrientes – quando comparada com a do soro de leite. De acordo com Acevedo et al. (2010), a temperatura de fermentação pode causar maior desnaturação das proteínas e também aumentar o metabolismo do micro-organismo, o que, consequentemente, leva a aumento da produção de ácido lático e da velocidade máxima de acidificação (V_{max}).

Gaglio et al. (2014) estudaram a taxa de acidificação de BAL como potenciais culturas microbianas iniciadoras na fabricação do queijo Vastedda della Valle del Belice. As cepas *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis* subp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* foram inoculadas em três diferentes meios de cultura: sintético, soro de leite e leite pasteurizado. Os autores concluíram que o meio de cultivo de leite pasteurizado apresentou os melhores resultados quanto ao incremento da taxa de acidificação, em consequência do rápido decréscimo do pH em relação aos outros meios de cultivo analisados.

Os resultados apresentados a respeito do perfil de acidificação do *S. thermophilus* TA 040 em meios de cultivo alternativos, tal como o soro de leite, estão em consonância com recentes trabalhos de pesquisa (Settachaimongkon et al., 2014; Bottari et al., 2013; Champagne et al., 2010; Iyer et al., 2010; Ashraf et al., 2011; Cremonesi et al., 2011). Nesses, os autores recorreram à utilização de culturas iniciadoras, com destaque para a cepa de *S. thermophilus* em monocultura e cocultura com cepas iniciadoras probióticas, a fim de maximizar a biomassa microbiana para proporcionar o incremento na atividade acidificante dos organismos probióticos e, consequentemente, reduzir o tempo de fermentação, a fim de denotar propriedades organolépticas satisfatórias em bebidas lácteas funcionais.

O emprego de meios de cultivo alternativos, de origens animal e vegetal, dentre os quais o soro de leite, é cada vez mais admitido na fermentação de micro-organismos iniciadores probióticos. Nesse contexto, os resultados apresentados no presente trabalho estão em concordância com as análises de Pescuma et al. (2010). Ao empregarem a cepa *Streptococcus thermophilus* CRL 804, em monocultura, ou em cocultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus CRL 656, cultivadas em soro de leite, os autores certificaram que a fermentação das BAL especificadas alcançou bons resultados em razão da rápida redução do pH, podendo essas serem utilizadas para o desenvolvimento de novas formulações de produtos fermentados à base de soro de leite.

5.1.2 *Lactococcus lactis* CECT 4434

Seguem representados, na Tabela 5, os resultados obtidos pelo sistema CINAC, no que se refere à cinética de acidificação da cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434, na presença e na ausência de inulina, em soro de leite a 37 ºC até alcançar o valor de pH 4,5.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *Lactococcus lactis* CECT 4434 em soro de leite a 37 °C até atingir o pH 4,5.

Inulina (%)	**pH_{Vmax}**	**T_{Vmax} (h)**	**$T_{pH\ 5,5}$ (h)**	**$T_{pH\ 5,0}$ (h)**	**$T_{pH\ 4,5}$ (h) (h)**	**V_{max} (10^{-3}upH/min)**
0	5,64± 0,23[a]	2,30± 0,29[a]	2,67± 0,17[a]	4,20± 0,25[a]	6,41± 0,18[a]	6,90± 0,22[a]
2	5,52± 0,13[a]	2,69± 0,15[a]	2,71± 0,20[a]	4,20± 0,31[a]	6,16± 0,15[a]	7,26± 0,39[a]
4	5,23± 0,12[a]	2,71± 0,19[a]	1,84± 0,09[b]	3,56± 0,27[a]	8,07± 0,32[b]	5,64± 0,13[b]

V_{max}: velocidade máxima de acidificação; T_{pH}: tempo para atingir o pH 5,5, 5,0 e 4,5; T_{Vmax}: tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação; pH_{Vmax}: valor do pH no instante da velocidade máxima de acidificação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

Observou-se que, sem a suplementação de inulina, o tempo do processo fermentativo da cepa *L. lactis* CECT 4434 teve duração de 6,41 h. A adição de 2% de inulina diminuiu ligeiramente o tempo total de cultivo, quando comparado com o ensaio que não recebeu a suplementação do prebiótico. Por outro lado, a adição de 4% de inulina retardou o processo fermentativo em aproximadamente 28%, quando comparado aos demais tratamentos. Em particular, notou-se que a adição de 4% de inulina acelerou o processo fermentativo até atingir os valores de pH 5,5 (1,84 h) e 5,0 (3,56h), mas, após este valor de pH, o processo passou a ser mais lento. Neste caso, o excesso de inulina prejudicou o metabolismo do micro-organismo, devido à repressão catabólica (Oliveira et al., 2012).

Além disso, a fermentação mais lenta, no ensaio com adição de 4% de inulina, foi justificada, pois se observou que o valor de V_{max} foi 5% e 28% menor em relação ao valor obtido nos ensaios sem suplementação do prebiótico e com adição de 2% do mesmo, respectivamente. Portanto, através do parâmetro de acidificação do *L. lactis* CECT 4434 fermentado em soro leite, foi possível comprovar que a concentração de 2% de inulina é a mais aceitável para a fabricação de bebidas lácteas funcionais à base de soro de leite.

Os resultados apresentados na Tabela 5, no que concerne aos parâmetros cinéticos analisados, estão em concordância com os obtidos por alguns autores (Jeanson et al., 2009; Acevedo et al., 2010; Londero et al., 2012), os quais avaliaram o perfil de acidificação de BAL, entre estas o *L. lactis*, o qual apresentou perfil de acidificação semelhante ao obtido no presente trabalho.

Com relação aos parâmetros cinéticos de acidificação da cultura *Bifidobacterium lactis* BB12, Lavinia et al. (2014) realizaram diferentes ensaios de fermentação utilizando suco de repolho aquecido a 40 ºC; suco de repolho aquecido a 80 ºC e resfriado a 40 ºC; e suco de repolho filtrado aquecido a 80 ºC e resfriado a 40 ºC. Nesse processo, os valores de V_{max} variaram de $2,66 \times 10^{-3}$ a $5,58 \times 10^{-3}$ upH/min. Ainda sobre os resultados obtidos, o menor tempo para completar a fermentação, em pH 4,2, foi de 23 h no tratamento de suco de repolho tratado termicamente, mediante aquecimento a 80 ºC e resfriamento a 40 ºC.

Os resultados do presente trabalho, no que tange aos parâmetros cinéticos de acidificação da cepa de *L. lactis* CECT 4434, confirmam os estudos de Agata et al. (2012). Na pesquisa referida, os autores observaram que a utilização de bactérias ácido-láticas, como o *Lactococcus lactis* e o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, gerou resultados mais satisfatórios quanto à atividade acidificante, acompanhada de forte acidificação e consequente diminuição do tempo para completar a fermentação e atingir o pH 4,5.

5.1.3 *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos pelo sistema CINAC sobre a cinética de acidificação da cepa *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040, cultivadas em soro leite, com ou sem suplementação de inulina, a 37 ºC até atingir o pH 4,5.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos de acidificação do *L. lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 em soro de leite a 37 °C até atingir o pH 4,5.

Inulina	pH_{Vmax} (h)	T_{Vmax} (h)	$T_{pH\ 5,5}$ (h)	$T_{pH\ 5,0}$ (h)	$T_{pH\ 4,5}$ (h)	V_{max} (10^{-3}upH/min)
0	5,29± 0,15[a]	1,13± 0,16[a]	0,66± 0,04[a]	1,73± 0,16[a]	4,60± 0,31[a]	7,93± 0,15[a]
2	5,30± 0,18[a]	1,18± 0,13[a]	0,65± 0,08[a]	1,83± 0,14[a]	4,43± 0,22[a]	7,82± 0,25[a]
4	5,27± 0,25[a]	2,22± 0,23[b]	1,69± 0,09[b]	3,22± 0,21[b]	6,69± 0,29[b]	6,74± 0,21[b]

V_{max}: velocidade máxima de acidificação; T_{pH}: tempo para atingir o pH 5,5, 5,0 e 4,5; T_{Vmax}: tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação; pH_{Vmax}: valor do pH no instante da velocidade máxima de acidificação. Os ensaios foram realizados em triplicata. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

Percebeu-se claramente que tanto a adição de inulina, na concentração de 2%, como o uso da cocultura probiótica (ST-LL) proporcionaram melhores resultados, em termos de parâmetros cinéticos, quando comparados com os ensaios fermentativos realizados pelas monoculturas separadamente. Em particular, o valor do pH_{vmax}, nos ensaios em coculturas binárias, foi em média 5 % menor em relação às monoculturas ST e LL. Nesse caso, a cocultura ST-LL favoreceu a maior pós-acidificação durante o cultivo.

Em média, os valores de T_{vmax}, $T_{pH5,5}$, $T_{pH5,0}$ e $T_{pH4,5}$ foram 98 %, 245 %, 115 % e 46% menores quando comparados com os obtidos nos ensaios com a cultura simples de ST. Quando comparados com a monocultura LL, os valores de T_{vmax}, $T_{pH5,5}$, $T_{pH5,0}$ e $T_{pH4,5}$ foram 85 %, 210 %, 94 % e 33% menores. Portanto, do ponto de vista tecnológico, a utilização da cocultura ST-LL no processo fermentativo foi muito importante, pois proporcionou tempo de fermentação mais curto (5,2 h em média) com relação à média do tempo final de fermentação obtido por ST (7,8 h) e LL (6,9 h).

A presente pesquisa corrobora os resultados obtidos por Aghababaie et al. (2015). Segundo esses autores, a taxa de acidificação e a velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) foram maiores com a utilização do cultivo binário da cepa de *Lactobacillus bulgaricus* em cocultura com *S. thermophilus*, em relação aos mesmos micro-organismos fermentados em cultura pura.

Outros pesquisadores reportaram que a utilização de coculturas iniciadoras probióticas, como, por exemplo, o *Lactobacillus helveticus* e o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* em cocultura com *Streptococcus thermophilus* e o *Lactobacillus fermentum*, favoreceu a maior quantidade de biomassa microbiana, a maior atividade acidificante e, consequentemente, a redução do tempo para completar a fermentação (Bottari et al., 2010; Bottari et al., 2013; Florence et al., 2012).

Sodini et al. (2000) comprovaram a interação positiva entre *S. thermophilus* ST7 com a cepa de *L. bulgaricus* LB10 durante o processo de acidificação do leite desnatado. Mihail et al. (2009) se atentaram à protocooperação simbiótica entre culturas probióticas iniciadoras na fabricação de iogurtes. Estes últimos constataram que o cultivo da cepa de *S. thermophilus* em cocultura com *Lb. bulgaricus* contribuiu positivamente para o metabolismo e, nesse sentido, acelerou a taxa de acidificação, proporcionando aromas e sabores desejáveis às bebidas lácteas assim fermentadas.

Similares dados foram extraídos da pesquisa de Santos et al. (2014), quando da utilização de coculturas probióticas para o desenvolvimento de uma bebida funcional à base de leite de soja com sabor amendoim. No estudo em questão, os pesquisadores reportaram que a combinação da cepa de *L. acidophilus* em cocultura com *P. acidilactici* e *S. cerevisiae* demonstrou os melhores resultados quanto à viabilidade das células e à rápida acidificação, se comparada ao seu cultivo em monocultura.

Oliveira et al. (2012e) observaram que coculturas binárias de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* mostraram, no leite desnatado, uma interação que é mutuamente favorável e não obrigatoriamente caracterizada pelo fato de cada bactéria produzir uma ou mais substâncias que estimulam o crescimento da outra. Esta relação sinérgica entre cepas já foi estudada por alguns autores, os quais observaram o positivo efeito do “mix” de culturas em comparação com a correspondente cultura pura em termos de crescimento, acidificação, produção

de aromas e exopolissacarídeos e de proteólise (BÉAL et al., 1994). Em particular, *L. bulgaricus* é estimulado pelo ácido fórmico e pelo CO_2 produzidos por *Streptococcus*, enquanto a cepa *S. thermophilus* é estimulada pelos aminoácidos e pequenos peptídeos produzidos pela atividade metabólica do *L. bulgaricus*. O CO_2 é igualmente um fator estimulador para o *L. bulgaricus*, que provém da descarboxilação da ureia através da urease excretada por *S. thermophilus*. Muitos aminoácidos são mencionados na literatura como fatores estimulantes do crescimento de *S. thermophilus*: histidina, glicina, ácido glutâmico, metionina, fenilalanina, arginina, cisteína, valina, leucina, triptofano, tirosina, lisina e serina (BÉAL et al., 1994; MAYO et al., 2010; Oliveira et al., 2012a-e).

A taxa máxima de acidificação (V_{max}) variou de 6,7 x 10^{-3} upH/min (ST-LL com adição de 4% de inulina) a 7,9 x 10^{-3} upH/min (ST-LL sem a adição de inulina). Analisando estes valores, notou-se claramente que a concentração de inulina a 4% retardou a taxa de acidificação e, por conseguinte, o tempo para atingir o pH 4,5 foi o maior (6,69 h) quando comparado aos outros tratamentos.

Resultados semelhantes foram encontrados na pesquisa de Rodrigues et al. (2011) a respeito da influência dos frutooligossacarídeos (FOS) e da inulina no metabolismo e na cinética de acidificação de três cepas probióticas (*L. casei*-01, *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* B94). Esses autores identificaram que os compostos prebióticos não apresentaram efeito positivo no crescimento celular, na viabilidade das células e no incremento da taxa de acidificação das cepas estudadas, com exceção do *L. acidophilus* La-5. Provavelmente, a concentração desses ingredientes prebióticos foi excessiva para as cepas *L. casei*-01, *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* B94.

No presente trabalho, a adição de 2% de inulina favoreceu o tempo de fermentação mais curto (4,43 h) em relação ao ensaio que não recebeu a suplementação do ingrediente prebiótico (4,60 h). Portanto, o efeito sinérgico entre as coculturas binárias foi potencializado pela adição de 2% de inulina.

Zalán et al. (2010) reportaram que o leite desnatado enriquecido com inulina foi fator determinante para maximizar a taxa de acidificação e crescimento celular e a produção de ácidos orgânicos em cepas de *L. casei*, *L. rhammosus*, *L. paracasei* e *L. curvatus*. Oliveira et al. (2009) reportaram que a adição de diferentes ingredientes prebióticos (oligofrutose, maltodextrina e

polidextrose) influenciou positivamente a cinética de acidificação de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em cocultura com *S. thermophilus*. Em particular, a inulina também foi capaz de aumentar a taxa de acidificação (V_{max}) e, consequentemente, diminuir o tempo de fermentação dos micro-organismos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* e *B. lactis* em cocultura com a cepa *S. thermophilus*.

5.2 Contagem microbiológica

A Tabela 7 exibe o crescimento celular das culturas *L. lactis* CECT 4434 (LL), *S. thermophilus* TA 040 (ST) cultivadas em soro de leite, tanto em monocultura quanto em cocultura de ST-LL, com ou sem a suplementação de inulina, no sistema CINAC a 37 ºC.

Observou-se que houve aumento da contagem no tempo final de fermentação (t_f) quando comparado com o tempo inicial do processo (t_0). Em particular, a contagem da monocultura ST aumentou em 42 %, em média, no final do processo fermentativo. O mesmo comportamento ocorreu com a cultura LL, a qual teve, em média, aumento na contagem microbiológica de 32% no final do cultivo. Na cocultura binária, também houve aumento na contagem microbiana ao final do processo, sendo que, em média, as culturas ST e LL cresceram 12% e 14 %, respectivamente. Esses resultados conformam-se com as pesquisas de Ramchandra et al. (2010) e de Florence et al. (2012), que apontaram para a maior concentração celular da cepa de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* quando alcançado o pH 4,5, respectivamente.

Tabela 7 - Contagem microbiológica das culturas microbianas de *Streptococcus thermophilus* TA 040 (ST) e *Lactococcus lactis* CECT 4434 (LL) fermentadas em soro de leite, tanto em monocultura quanto em culturas mistas (ST-LL) com ou sem a suplementação de inulina a 37 ºC.

Ensaios	Contagens (LogUFC/mL)			
	t_0		t_f	
	ST	LL	ST	LL
0% de inulina				
1	5,87± 0,19^{bc}	-	8,41± 0,20^{j}	-
2	-	6,25± 0,25^{cde}	-	8,28± 0,22^{j}
3	6,30± 0,21^{cdef}	6,23± 0,24^{bcd}	6,89± 0,19^{efgh}	7,14± 0,17^{gh}
2% de inulina				
1	6,13± 0,22^{bcd}	-	8,38± 0,16^{j}	-
2	-	6,14± 0,23^{bcd}	-	8,18± 0,15^{j}
3	7,31± 0,33^{hi}	6,89± 0,25^{fgh}	7,89± 0,20^{ij}	7,45± 0,18^{hi}
4% de inulina				
1	4,89± 0,19^{a}	-	7,21± 0,11^{gh}	-
2	-	5,63± 0,21^{b}	-	7,36± 0,31^{hi}
3	6,89± 0,20^{efgh}	6,65± 0,18^{defg}	8,23± 0,13^{j}	7,89± 0,28^{ij}

ST: *Streptococcus thermophilus*; LL: *Lactococcus lactis*; t_0: tempo inicial da fermentação; t_f: tempo final da fermentação em pH=4,5; UFC: Unidade Formadoras de Colônias. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05). Ensaios realizados em triplicata.

De modo geral, a inulina não afetou significativamente o crescimento celular das cepas utilizadas em monocultura no presente estudo. Em particular, a adição de 4% do ingrediente prebiótico reduziu em 1,2 LogUFC/mL e 0,92 LogUFC/mL o crescimento de ST e LL (em monocultura), respectivamente.

Por outro lado, quando utilizado cultivo das coculturas binárias, percebeu-se ganho na contagem microbiológica nos ensaios que receberam a suplementação do polissacarídeo. Quando adicionados 2% e 4% de inulina, houve aumento de 1 LogUFC/mL e de 1,34 LogUFC/mL na contagem de ST, respectivamente. No caso da cepa LL em cocultura com ST, a suplementação de 2% e 4% do prebiótico aumentou em 0,31 LogUFC/mL e 0,75 LogUFC/mL, respectivamente. Esse efeito da inulina é condizente com os resultados de recentes pesquisas, no que concerne à clara ação benéfica do prebiótico sobre a viabilidade das cepas *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, cultivadas em cocultura, para a produção de leite fermentado probiótico e em outros produtos alimentares (Oliveira et al., 2012a; Oliveira et al., 2012b; Oliveira et al., 2012c; Oliveira et al., 2012d).

Ao compararmos os dados obtidos no presente estudo, no que diz respeito às contagens microbianas, valores similares foram encontrados por Grattepanche et al. (2007a) ao final da fermentação (valor de pH 4,8) no cultivo puro de *L. diacetylactis* UL719 a 38 ºC de 8,81 logUFC.mL^{-1}, muito embora façam referência ao leite fermentado e não à fermentação em soro de leite.

Tomando como base o limite mínimo (6,0 LogUFC/mL), recomendado por Tamine et al. (2005), nenhuma das culturas bacterianas testadas, neste trabalho, apresentou contagens inferiores ao valor prescrito para o final do processo fermentativo, tanto nos ensaios que não receberam a adição de inulina como nos que foram suplementados com o ingrediente prebiótico.

5.3 Teores de lactose e de ácido lático

A Tabela 8 mostra o consumo de lactose e a produção de ácido lático no final do cultivo dos micro-organismos *S. thermophilus* e *L. lactis*, tanto em monocultura como em cocultura binária.

É importante frisar que a concentração da lactose inicial do soro de leite foi de 69,5 g/L. O consumo de lactose variou de 59,5 g/L (cocultura ST-LL sem suplementação de inulina) a 63,4 g/L (co-cultura ST-LL na presença de 4% de inulina). Portanto, o consumo de lactose foi de aproximadamente 10g/L durante o processo fermentativo para a cocultura ST-LL (sem suplementação de inulina). Esse resultado pode ser justificado devido à maior atividade metabólica exercida quando as cepas são cultivadas simultaneamente (Mayo et al., 2010; Oliveira et al., 2012a; Tabasco et al., 2014).

No que diz respeito à produção de ácido lático, a adição de inulina (nas concentrações 2% e 4%) não influenciou positivamente na produção desse ácido orgânico quando utilizadas as monoculturas ST e LL, separadamente, no cultivo fermentativo. Por outro lado, tanto a adição do prebiótico como as coculturas binárias levaram à maior concentração de ácido lático (5,7 g/L). Esse resultado está em concordância com o obtido por Oliveira et al. (2012a, 2012c, 2012d), que obtiveram maior produção de ácido lático na presença da inulina quando cultivadas as cepas *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* em cocultura com *S. thermophilus*.

Em particular, nos cultivos em cocultura, se observou que houve menor consumo de lactose quando adicionada a inulina, seja na concentração de 2% como na adição de 4%. Provavelmente, a inulina foi a fonte preferencial de carbono da cocultura ST-LL.

Tabela 8 - Concentração de lactose (gL^{-1}) e lactato (gL^{-1}) do soro de leite fermentado pela cultura pura de *L. latis* (LL) e *S. thermophilus* (ST) ou pela cocultura binária de *L. latis* com *S. thermophilus* (ST-LL) na ausência e na presença de inulina. No tempo final da fermentação ($T_{pH4,5}$).

Ensaios	Lactose residual (g/L)	Ácido lático (g/L)
0% de inulina		
ST	$60,58 \pm 0,66^{a}$	$3,54 \pm 0,19^{ab}$
LL	$62,30 \pm 0,32^{bd}$	$3,76 \pm 0,18^{a}$
ST-LL	$59,53 \pm 0,40^{c}$	$4,56 \pm 0,10^{c}$
2% de inulina		
ST	$60,81 \pm 0,27^{a}$	$3,05 \pm 0,06^{b}$
LL	$61,54 \pm 0,64^{ab}$	$3,17 \pm 0,15^{b}$
ST-LL	$62,00 \pm 0,32^{b}$	$5,28 \pm 0,27^{d}$
4% de inulina		
ST	$62,03 \pm 0,17^{b}$	$3,79 \pm 0,17^{a}$
LL	$60,70 \pm 0,19^{ac}$	$3,94 \pm 0,42^{ac}$
ST-LL	$63,37 \pm 0,34^{d}$	$5,71 \pm 0,09^{d}$

ST: *Streptococcus thermophilus*; LL: *Lactococcus lactis*; ST-LL: *S. thermophilus* em cocultura com *L. lactis*. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$). Ensaios realizados em triplicata. Ensaios realizados em triplicata.

A análise desses resultados demonstrou que a presença da inulina, durante a fermentação do soro de leite pela cepa *L. lactis* em cocultura com *S. thermophilus*, exibiu potencial simbiótico de forma a comprovar o incremento na concentração de ácido lático e, assim sendo, melhor qualidade organoléptica de produtos lácteos funcionais. Tal constatação está em conformidade com os trabalhos de pesquisa de Oliveira et al. (2012a; 2012c).

Similarmente, Zalán et al. (2011) estudaram a produção de ácido lático, ácido acético e ácido succínico por diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. cultivadas em meio MRS enriquecido com inulina. Os autores puderam comprovar que o referido prebiótico influenciou positivamente no metabolismo

destas cepas, além de aumentar significativamente a concentração dos ácidos orgânicos supracitados.

Tabasco et al. (2014) evidenciaram a influência da utilização de frutooligossacarídeos e da cocultura ternária (*S. thermophilus* STY-31, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBY-27 e *L. acidophilus* LA-5) na concentração de ácidos orgânicos, entre eles o ácido lático.

5.4 Viscosidade do produto fermentado

No que diz respeito à viscosidade do soro de leite fermentado pela monocultura *S. thermophilus* TA 040, os valores variaram de 5,52 mPa (sem adição de inulina) a 6,86 mPa (com a adição de 4% de inulina) (Figura 2).

Esses dados estão em concordância com recentes pesquisas (Gentès et al., 2013; Prasanna et al., 2013; Costa et al., 2012; Abdi et al., 2012) que comprovam a habilidade da cepa *S. thermophilus* de sintetizar, de modo extracelular, os exopolissacarídeos, que proporcionaram o incremento da viscosidade em bebidas lácteas fermentadas.

Resultados correlatos quanto ao efeito da produção de exopolissacarídeos por culturas microbianas iniciadoras podem ser depreendidos dos trabalhos de Mende et al. (2012 e 2014). Esses autores demonstraram que a cepa *S. thermophilus* pode ser empregada na fabricação de bebidas lácteas funcionais, com o intuito de aprimorar positivamente as propriedades reológicas, o perfil de acidificação, as propriedades físico-químicas e, por conseguinte, a qualidade organoléptica final desses produtos da indústria de laticínios.

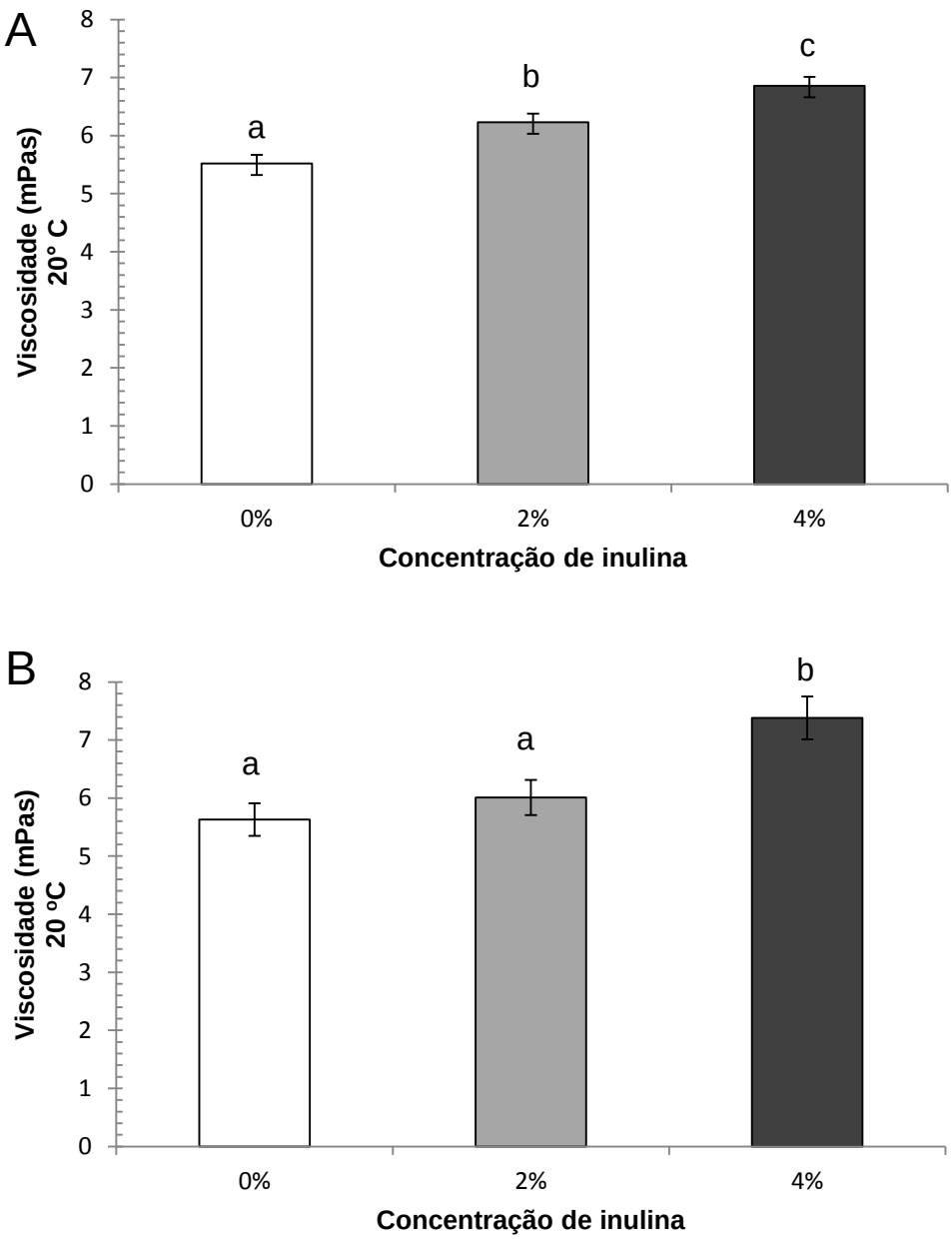

Figura 2 - Avaliação reológica do soro de leite fermentado na ausência e na presença de inulina em monocultura (A) de *Streptococcus thermophilus* TA 040 a 25 ºC e em cocultura *S. thermophilus* TA 040 com *Lactococcus lactis* CECT 4434 (B) no final da fermentação no pH de 4,5. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05). Ensaios realizados em triplicata.

García et al. (2013) reportaram que o emprego de culturas como *Micrococcus*, *Geotrichum*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Brevibacterium* foi muito importante para assegurar a textura de queijo de cabra probiótico.

É possível observar que a monocultura *S. thermophilus* TA 040 cultivada em soro de leite, na presença de inulina, incrementou a produção de exopolissacarídeos, assegurando valores de viscosidade superiores, se comparada ao cultivo sem suplementação. Por outro lado, não foi possível obter valores de viscosidade com a monocultura *L. lactis*. Segundo Oliveira et al. (2011), a cepa *S. thermophilus* é o principal micro-organismo responsável pela firmeza de iogurtes e leites fermentados probióticos. É por este motivo que esta bactéria é amplamente utilizada pela indústria de laticínios.

O estudo realizado por Grosu-Tudor et al. (2013) reforça a dependência da suplementação de inulina à maior produção de exopolissacarídeos por BAL, principalmente o *S. thermophilus*. Essa constatação é coerente com o trabalho de Crispín-Isidro et al. (2015), no que se refere à influência da adição de diferentes concentrações de inulina em culturas iniciadoras de *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e *L. lactis*, para a produção de leite fermentado com teor reduzido de gorduras. Os autores identificaram aumento da viscosidade do produto linearmente proporcional à concentração de inulina suplementada.

Por outro lado, Cruz et al. (2013) elaboraram um iogurte à base de leite cru enriquecido com o prebiótico rafinose e fermentado pelas culturas puras de *S. thermophilus* TA 040 e *Lactobacillus bulgaricus* LB 340. Esses pesquisadores puderam constatar que a rafinose, na concentração acima de 2,5%, resultou em um produto final com características pseudoplásticas.

Com relação ao soro de leite fermentado pela cultura *L. lactis* em cocultura com *S. thermophilus* (ST-LL), se constatou que a adição de 4% de inulina proporcionou, em média, aumento na viscosidade de aproximadamente 23 % em relação aos demais tratamentos, tanto em monocultura como em cocultura binária. Esse resultado corrobora os obtidos por alguns autores, no que diz respeito à utilização de coculturas iniciadoras probióticas, a destacar o *L. lactis* em cultura mista com *S. thermophilus*, a fim de aprimorar as propriedades

reológicas de bebidas lácteas funcionais (Stijepic et al., 2012; Laneuville et al., 2014; Prasanna et al., 2014).

Espirito Santo et al. (2014) evidenciaram aumento na viscosidade, resultante da fermentação de coculturas probióticas, para a fabricação de mingau produzido tanto com leite de arroz como leite de soja, ambos enriquecidos com farelo de maracujá. Constatou-se, ainda, que as coculturas probióticas foram determinantes para redução do tempo de fermentação, em leite de soja e de arroz, e para a obtenção de um produto final com pH e viscosidade semelhantes às de um iogurte.

5.5 Atividade antimicrobiana da bacteriocina

Para fins de cálculo da atividade da nisina, associa-se a medida do halo (mm) de inibição à concentração da bacteriocina, medida em AU/mL, conforme metodologia descrita no trabalho de Jozala et al. (2015), representada, neste trabalho, por meio da curva de calibração da nisina na Figura 3.

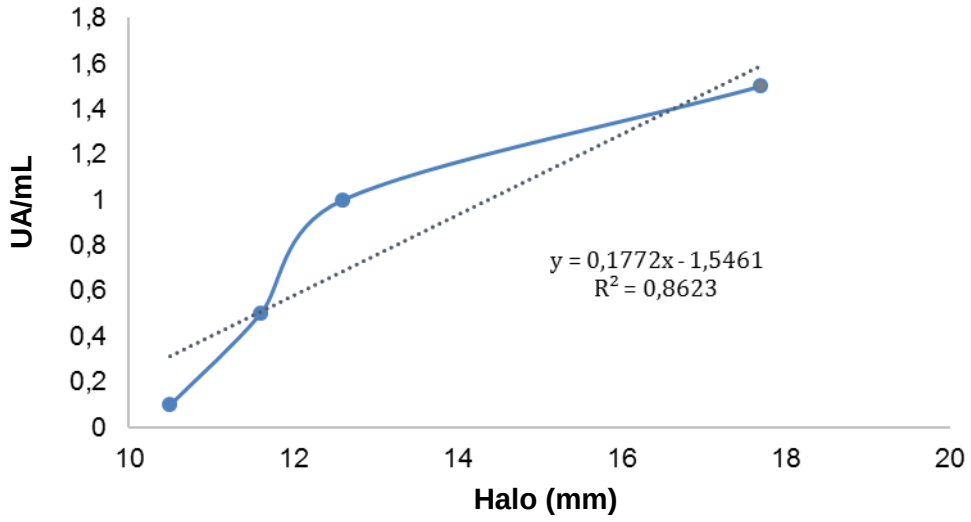

Figura 3 - Curva de calibração associando concentração da nisina (UA/mL) em relação ao diâmetro do halo de inibição.

Os cultivos de *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 como cultura pura e em cocultura *S. thermophilus* TA 040 resultaram na produção de nisina capaz de inibir a cepa bioindicadora *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. Na Figura 4, podem-se observar os halos de inibição.

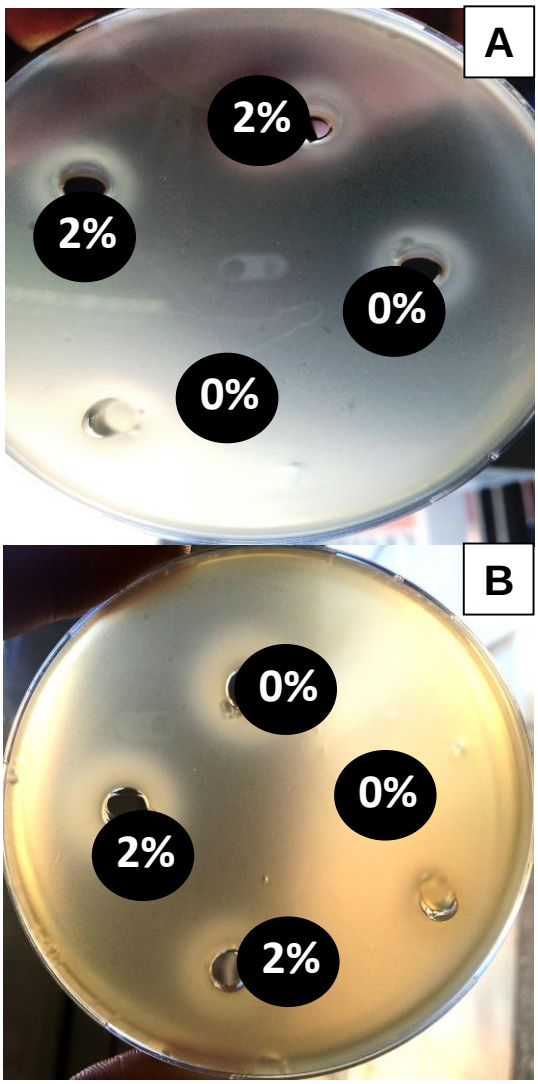

Figura 4 - Halos de inibição obtidos por *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cultura pura (A) e em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 (B) frente à cepa bioindicadora *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. A determinação da atividade antimicrobiana foi obtida no final do cultivo em soro de leite sem e com adição de 2% de inulina.

A atividade antimicrobiana da nisina expressa na cultura pura *L. lactis* CECT 4434 sem a suplementação de inulina foi de 0,46 Log UA/mL. Com a suplementação de 2 e 4% de inulina, notou-se que a atividade antimicrobiana foi de 0,82 Log UA/mL (Figura 3 A).

O resultado supracitado corrobora o estudo de Jozala et al. (2015), no que se refere ao potencial bacteriocinogênico de *L. lactis*. Nesta pesquisa, os autores verificaram a atividade antimicrobiana da nisina (extrato bruto) na ordem de 1 Log AU/mL. Após o processo de purificação, utilizando a técnica de cromatografia de interação hidrofóbica, alcançou-se valor de 3 Log AU/mL. Em estudo anterior, Jozala et al. (2007) utilizaram leite desnatado diluído como meio de cultivo alternativo e obtiveram valores de atividade antimicrobiana da nisina produzida por *L. lactis* ATCC 11454 em torno de 1,9 Log AU/mL frente ao *L. sakei* ATCC 15521.

O emprego da cepa *L. lactis* na produção de nisina e na ação inibitória contra uma variedade de bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* e *Clostridium beijerinckii*, foi evidenciado em diferentes pesquisas (Coelho et al., 2014; Kondepudi et al., 2012; Garde et al., 2011; Taniguchi et al., 2010).

Quando analisada a expressão da nisina de *L. lactis* CECT 4434 em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040, sem a adição de inulina (Figura 3B), observou-se valor de aproximadamente 0,30 Log UA/mL; ou seja, 35% menor em relação à cultura pura. Por outro lado, quando foram adicionados 2% de inulina no meio de cultivo contendo as coculturas binárias, observou-se aumento de 102% na atividade antimicrobiana, quando comparada com a cultura pura (0,46 Log UA/mL), e de 210%, quando comparada com a cocultura binária, no cultivo sem suplementação de inulina (0,30 Log UA/mL). Notou-se que a adição de 4% de inulina não aumentou a produção de nisina na cultura pura, sendo que, na cocultura binária, houve queda de aproximadamente 12 % na produção desse peptídeo antimicrobiano. Esse fato pode ser justificado, pois a inulina em quantidades elevada pode causar repressão catabólica do micro-organismo (Oliveira et al., 2012). No presente trabalho, a concentração de 2% do polissacarídeo foi suficiente para potencializar a produção de nisina.

Balciunas et al. (2016) estudaram o efeito da adição de inulina em soro de leite, como meio de cultivo alternativo, na produção de bacteriocina por

Bifidobacterium lactis. No trabalho, a adição de 1% do ingrediente prebiótico foi o suficiente para aumentar a produção de peptídeo antimicrobiano em 30 %.

Em certas bactérias láticas, assim como em algumas bifidobactérias, os prebióticos conseguem estimular o crescimento celular, assim como aumentar a produção de metabólitos primários. Provavelmente, a inulina aumentou a produção de nisina em *Lactococcus lactis* devido à ação da enzima inulinase, a qual hidrolisa estes polímeros de frutose. Alguns autores já reportaram a hidrólise de inulina pela ação desta enzima (Oliveira et al., 2012a; Mayo et al., 2010; Petrova et al., 2015; Shi et al., 2012).

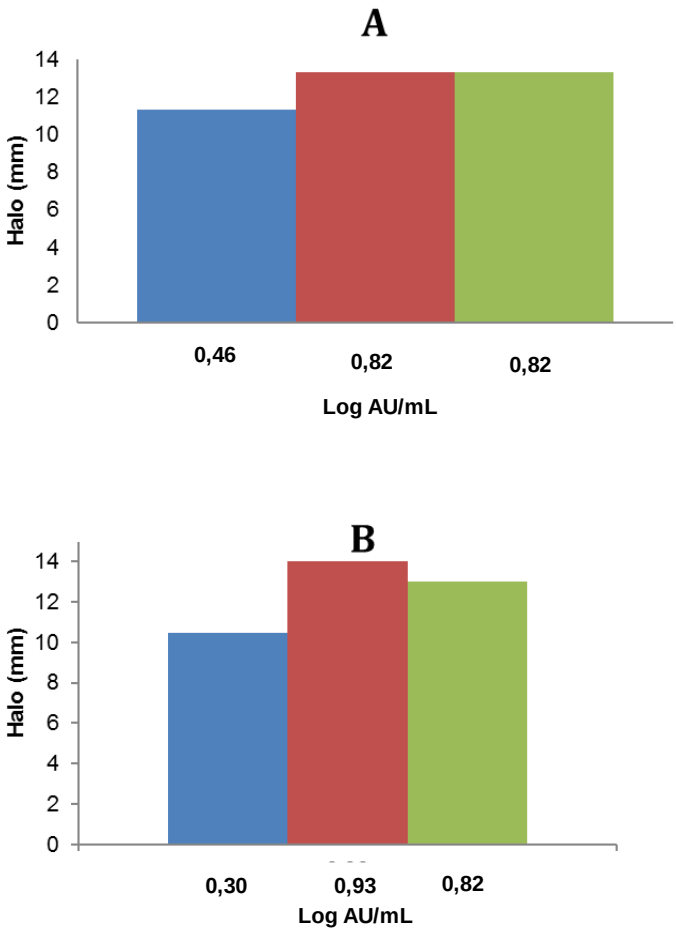

Figura 5 - Atividade antimicrobiana da nisina produzida por *Lactococcus lactis* CECT 4434 em cultura pura (A) e em cocultura com *Streptococcus thermophilus* TA 040 (B). Legendas: ■ (0% de inulina); ■ (2% de inulina); ■ (4% de inulina).

Grattepanche et al. (2007b) reportaram que a produção de nisina Z foi aumentada devido à relação simbiótica de coculturas iniciadoras. Em particular, estes autores constataram que a concentração do peptídeo antimicrobiano

dobrou-se com o uso da cultura *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 em cocultura com *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 M e *L. lactis* subsp. *cremoris*. Tal resultado pode ser explicado devido ao aumento da atividade proteolítica proporcionado pela simbiose entre as coculturas ternárias.

Em contrapartida, o estudo dirigido por Domínguez-Manzano et al. (2013), sobre a produção de bacteriocinas com a utilização da combinação das cepas de *Lactobacillus plantarum* NC8C em cocultura *Enterococcus faecium* 6T1a, revelou o efeito negativo da atividade da nisina. Os autores da pesquisa defenderam que a correta seleção de culturas iniciadoras probióticas deve ser levada em conta, a fim de se obter adequada expressão da bacteriocina e, assim sendo, propiciar melhor qualidade do produto fermentado.

O resultado do papel da inulina na produção de bacteriocina, exibido no presente trabalho de pesquisa, está de acordo com Pranckute et al. (2014). Esses autores comprovaram que a combinação de *Lactobacillus* spp. e *Lactoccocus* spp., cultivados em meio MRS, juntamente com os prebióticos palatinose, inulina e α-ciclodextrina, potencializaram a produção de nisina.

É válido salientar que a utilização do soro de leite com o propósito de produzir biomoléculas de alto valor agregado, como a nisina, reduzindo custos de bioprocessos, foi evidenciada em diversas pesquisas (Bali et al., 2014, 2016; Demers-Mathieu et al., 2013; Mitra et al., 2010; Wolf-Hall et al., 2009). Em particular, o uso de subprodutos da indústria de alimentos, tais como soro de leite, soro de extrato de soja, milho condensado solúvel, resíduos de batatas, resíduos do processamento de mexilhões, resíduos musculares e viscerais de peixes, provaram ser eficientes na produção de nisina a custo menor – quando comparado aos meios de cultivo sintéticos.

6. CONCLUSÕES

- O cultivo das coculturas binárias (ST-LL) em soro de leite apresentou a maior taxa de acidificação, atingindo (V_{max}=7,93 x 10^{-3} upH/min), e o menor tempo para atingir essa taxa (t_{Vmax}=1,13 h).
- A adição de 2% de inulina favoreceu o menor tempo de fermentação, quando utilizada a cocultura binária (4,43 h).
- Nos cultivos que não receberam a suplementação de inulina, a contagem microbiológica das monoculturas ST e LL aumentou em 42 % e 32%, em média, no final do processo fermentativo, respectivamente. Quando utilizada a cocultura binária ST-LL, houve aumento, ao final do cultivo, de 12% (ST) e de 14% (LL), em média.
- Nas monoculturas, a inulina não afetou significativamente o crescimento celular, sendo que a adição de 4% do ingrediente prebiótico reduziu em 1,2 LogUFC/mL e 0,92 LogUFC/mL o crescimento de ST e LL, respectivamente.
- Nos cultivos em cocultura, a suplementação de 2% e 4% de inulina aumentou em 1 LogUFC/mL e em 1,34 LogUFC/mL a contagem de ST, respectivamente. No caso da cepa LL, a mesma suplementação proporcionou aumento de 0,31 LogUFC/mL e 0,75 LogUFC/mL, respectivamente.
- Em monocultura, a adição de inulina não influenciou positivamente na produção de ácido lático, mas em coculturas binárias (ST-LL), o ingrediente prebiótico proporcionou a maior concentração desse ácido orgânico (5,7 g/L).
- Observou-se que tanto o efeito sinérgico da cocultura (ST-LL) como a adição de inulina proporcionaram aumento de 23% na viscosidade do produto fermentado.
- No cultivo realizado pelas coculturas binárias, a concentração de 2% de inulina aumentou em 102% a atividade antimicrobiana da nisina, quando comparada com a cultura pura LL.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

a) Publicações: os resultados serão publicados em revistas internacionais de alto impacto técnico-científico no *SCI Journal Citation Reports* (JCR), principalmente dentro do título:
"Ciência e Tecnologia de Alimentos": *Journal of Food Science* (JCR2015: 1,696); *Journal of the Science of Food and Agriculture* (JCR2015: 1,714); *Food Technology and Biotechnology* (JCR2015: 0,920); *Cyta – Journal of Food* (JCR: 0,824).

b) Estudar o metabolismo das cepas probióticas pesquisadas.

c) Avaliar, com auxílio de planejamento fatorial fracionado, com adição de três ensaios nos pontos centrais, a influência das variáveis (pH; concentração de inulina e lactulose; e temperatura) nos cultivos conduzidos em sistema de fermentação CINAC.

d) Estudar a atividade antimicrobiana da nisina frente a diferentes bioindicadores, como: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeuroginosa* (ATCC 9721), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) e *Staphylococus aureus* (ATCC 10390).

e) Propor um método de purificação da nisina utilizando métodos cromatográficos em coluna de exclusão molecular Superdex peptide (GE Healthcare), sendo que a pureza de fração ativa será determinada por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (Vydac).

f) Propor um método de extração e purificação de exopolissacarídeos sintetizados por *Streptococcus thermophilus* através da técnica de cromatografia de exclusão molecular.

REFERÊNCIAS

ABDI, R.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Efficiency of modified skimmed milk base media to achieve high exopolysaccharide/cell ratios by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SZ2 in optimized conditions defined by the surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, v.47, n.4, p.768-775, 2012.

ACEVEDO, D.; RODRÍGUEZ, A.; FERNANDEZ, A. Efecto de las variables de proceso sobre la cinética de acidificación, la viabilidad y la sinéresis del suero costeño colombiano. *Información Tecnológica*, v.21, n.2, p.29-36, 2010.

AGATA, L.; JAN, P. Production of fermented goat beverage using a mixed starter culture of lactic acid bacteria and yeasts. *Engineering in Life Sciences*, v.12, n.4, p.486-493, 2012.

AGHABABAIE, M.; KHANAHMADI, M.; BEHESHTI, M. Developing a kinetic model for co-culture of yogurt starter bacteria growth in pH controlled batch fermentation. *Journal of Food Engineering*, v.166, p.72-79, 2015.

ALY, S.; FLOURY, J.; PIOT, M.; LORTAL, S.; JEANSON, S. The efficacy of nisin can drastically vary when produced *in situ* model cheeses. *Food Microbiology*, v.32, n.1, p.185-190, 2012.

ALVAREZ, M.M.; AGUIRRE-EZKAURIATZA, E.J.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, A. Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *Journal of Dairy Science*, v.93, n.12, p.5552-5560, 2010.

AMBALAM, P.; KONDEPUDI, K.K.; BALUSUPATI, P.; NILSON, I.; WADSTROM, T.; LJUNGH, A. Prebiotic preferences of human *lactobacilli* strains in co-culture with bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Journal of Applied Microbiology*, v.119, n.6, p.1672-1682, 2015.

ANGUS, F.; SMART, S.; SHORTT, C. Prebiotic ingredientes with emphasis on galacto-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides. In: TAMIME, A.Y., ed. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. cap.6, p.120–137.

ANJUM, N.; MAQSOOD, S.; MASUD, T.; AHMAD, A.; SOHAIL, A.; MOMIN, A. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.54, n.9, p.1241-1251, 2014.

APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, v.101, p.368-378, 2014.

ARAUZ, L.J. *Produção de nisina em leite desnatado diluído por Lactococcus lactis subsp. lactis ATCC 11454 em biorreator*. São Paulo, 2011. 148p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.20, n.3/4, p.146-154, 2009. [Review].

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; PINHEIRO, G.S.; MAZZOLA, P.G.; PESSOA-JUNIOR, A.; PENNA, T.C.V. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, n.3, p.325-328, 2008.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; BARUQUE-RAMOS, J.; MAZZOLA, P.G.; PESSOA-JUNIOR, A.; PENNA, T.C.V. Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology*, v.62, n.1, p.419-426, 2012.

ARENA, M.P.; CAGGIANIELLO, G.; FIOCCO, D.; RUSSO, P.; TORELLI, M.; SPANO, G.; CAPOZZI, V. Barley β-glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, v.15, n.2, p.3025-3039, 2014a.

ARENA, M.P.; RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; LÓPEZ, P.; FIOCCO, D.; SPANO, G. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.98, n.17, p.7569-7581, 2014b.

ASHRAF, R.; SHAH, N.P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt – a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.149, n.3, p.194-208, 2011.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, v.29, n.1, p.54-66, 2011.

BALCIUNAS, E.M.; CASTILLO MARTINEZ, F.A.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, v.32, n.1, p.134-142, 2013.

BALCIUNAS, E.M.; AL ARNI, S.; CONVERTI, A.; LE BLANC, J.G.; OLIVEIRA, R.P.S. Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Bifidobacterium lactis* using whey as a substrate. *International Journal of Dairy Technology*, v.69, n.2, p.236-242, 2016.

BALI, V.; PANESAR, P.S.; BERA, M.B. Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.36, n.2, p.204-214, 2016.

BALI, V.; PANESAR, P.S.; BERA, M.B. Potencial of immobilization technology in bacteriocin production and antimicrobial packaging. *Food Reviews International*, v.30, p.244-263, 2014.

BANERJEE, S.P.; DORA, K.C.; CHOWDHURY, S. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish: Bactoriocin from Lb. brevis FPTLB3. *Journal of Food Science and Technology*, v.50, n.1, p.17-25, 2013.

BARTON, M.D.; HART, W.S. Public health risks: antibiotic resistance: review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.14, p.414-422, 2001.

BÉAL, C.; SPINNLER, H.; CORRIEUX, G. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarus* ssp. thermophilus 404 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. bulgaricus 398. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.41, p.95–98, 1994.

BEITĀNE, I.; CIPROVIČA, I. Nutritional benefits of *Bifidobacterium lactis* in dairy products. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, v.67, n.4/5, p.378-382, 2013.

BENDALI, F.; MADI, N.; SADOUN, D. Beneficial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus* - induced intestinal and colonic injury. *International Journal of Infectious Diseases*, v.15, n.11, p.E787-E794, 2011.

BERINGER, A.; WENGER, R. Inulin in der ernahrung des diabetikers. *Deutsche Zeitschrift fuer Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten*, v.15, p.268, 1955.

BERMUDEZ-BRITO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.J.; ROMERO, F.; GIL, A. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TRL activation. *Plos One*, v.7, n.8, p.E43197-E43197, 2012.

BESHKOVA, D.; FRENGOVA, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, v.12, n.4, p.419-432, 2012.

BIÉLER, S.; SILVA, F.; BELIN, D. The polypeptide core of Microcin E492 stably associates with the mannose permease and interferes with mannose metabolism. *Research in Microbiology*, v.161, n.8, p.706-710, 2010.

BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*, v.93, n.3, p.607-613, 2013.

BOTTARI, B.; SANTARELLI, M.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, n.5, p.1676–1684, 2010.

BOTTARI, B.; AGRIMONTI, C.; GATTI, M.; NEVIANI, E.; MARMIROLI, N. Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic latic acid bacteria in natural whey starters. *International Journal of Food Microbiology*, v.160, n.3, p.290-297, 2013.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.54, n.2, p.139-150, 2014.

BURTON, J.P.; CHILCOTT, C.N.; MOORE, C.J.; SPEISER, G.; TAGG, J.R. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, n.4, p.754–764, 2006.

CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; DUEÑAS, M.T.; LÓPEZ, P.; SPANO, G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.96, n.6, p.1383-1394, 2012.

CHAMPAGNE, C.P.; TOMPKINS, T.A.; BUCKLEY, N.D.; GREEN-JOHNSON, J.M. Effect of fermentation by pure and mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiology*, v.27, n.7, p.968-972, 2010.

CHI, Z.M.; ZHANG, T.; CAO, T.S.; LIU, X.Y.; CUI, W.; ZHAO, C.H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, v.102, n.6, p.4295-4303, 2011.

CHUMCHALOVÁ, J.; SMARDA, J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiologica*, v.48, n.1, p.111-115, 2003.

COLLINS, B.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M., eds. *Biotechnology of lactic acid bacteria*: novel applications. Ames: Wiley-Blackwell, 2010. p.89-109.

COSTA, N.E.; O'CALLAGHAN, D.J.; MATEO, M.J.; CHAURIN, V.; CASTILLO, M.; HANNON, J.A.; MCSWEENEY, P.L.H.; BERESFORD, T.P. Influence of an exopolysaccharide produced by a starter on milk coagulation and curd syneresis. *International Dairy Journal*, v.22, n.1, p.48-57, 2012.

CREMONESI, P.; VANONI, L.; MORANDI, S.; SILVETTI, T.; CASTIGLIONI, B.; BRASCA, M. Development of a pentaplex PCR assay for the simultaneous detection of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum* in whey starter for Grana Padano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.146, n.2, p.207–211, 2011.

CRISPÍN-ISIDRO, G.; LOBATO-CALLEROS, C.; ESPINOSA-ANDREWS, H.; ALVAREZ-RAMIREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT – Food Science and Technology*, v.62, n.1, pt.2, p.438-444, 2015.

CRUZ, A.G.; CAVALCANTI, R.N.; GUERREIRO, L.M.R.; SANT'ANA, A.S.; NOGUEIRA, L.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; DELIZA, R.; CUNHA, R.L.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Developing a prebiotic yogurt: rheological, physicol-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of Food Engineering*, v.114, n.3, p.323-330, 2013.

DAHAL, N.; CHANEY, N.; ELLIS, D.; LU, S.-E.; SMITH, L. Optimization of the production of the lantibiotic mutacin 1140 in minimal media. *Process Biochemistry*, v.45, n.7, p.1187-1191, 2010.

DE MAN, J.D.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, v.23, n.1, p.130-135, 1960.

DEMERS-MATHIEU, V.; GAUTHIER, S.F.; BRITTEN, M.; FLISS, I.; ROBITAILLE, G.; JEAN, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in Cheddar cheese by an anionic peptides-enriched extract from whey proteins. *International Dairy Journal*, v.32, n.1, p.6-12, 2013.

DE VUYST, L.; WECKX, S.; RAVYTS, F.; HERMAN, L.; LEROY, F. New insights into the exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus*. *International Dairy Journal*, v.21, n.9, p.586-591, 2011.

DIERKSEN, K.P.; MOORE, C.J.; INGLIS, M.; WESCOMBE, P.A.; TAGG, J.R. The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricin A - producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin - like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue. *FEMS Microbiology Ecology*, v.59, n.3, p.584-591, 2007.

DIVYA, J.B.; VARSHA, K.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; ISMAIL, B.; PANDEY, A. Probiotic fermented foods for health benefits. *Engineering in Life Sciences*, v.12, n.4, p.377-390, 2012.

DOMÍNGUEZ-MANZANO, J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. *Food Control*, v.30, n.2, p.474-479, 2013.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. α-Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. *Food Chemistry*, v.104, n.1, p.10-20, 2007.

DUQUESNE, S.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; PEDUZZI, J.; REBUFFAT, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*, v.24, n.4, p.708-734, 2007.

ESPECHE, C.M.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; LARRIESTRA, A.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M.E.F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*, v.18, n.1, p.103-109, 2012.

ESPIRITO-SANTO, A.P.; MOUQUET-RIVIER, C.; HUMBLOT, C.; CAZEVIEILLE, C.; ICARD-VERNIÈRE, C.; SOCCOL, C.R.; GUYOT, J-P. Influence of cofermentation by amylolytic *Lactobacillus* strains and probiotic bacteria on the fermentation process, viscosity and microstructure of gruels made of rice, soy milk and passion fruit fiber. *Food Research International*, v.57, p.104-113, 2014.

FARÍAS, M.E.; FARÍAS, R.N.; RUIZ HOLGADO, A.P.; SESMA, F. Purification and N-terminal amino acid sequence of Enterocin CRL 35, a “pediocin-like” bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL 35. *Letters in Applied Microbiology*, v.22, n.6, p.417-419, 1996.

FARINHA, L.R.L.; SABO, S.S.; PORTO, M.C.; SOUZA, E.C.; OLIVEIRA, M.N.; OLIVEIRA, R.P.S. Influence de prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. *Chemical Engineering Transactions*, v.43, p.313-318, 2015.

FERNANDEZ, B.; LE LAY, C.; JEAN, J.; FLISS, I. Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. *Journal of Applied Microbiology*, v.144, n.3, p.877-885, 2013.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de bacterias láticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L. ed. *Prebióticos e probióticos*: atualização e prospecção. Viçosa: UFV, 2003. p.7-33.

FLORENCE, A.C.R.; BÉAL, C.; SILVA, R.C.; BOGSAN, C.S.B.; PILLEGGI, A.L.O.S.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Fatty acid profile, trans-octadecenoic, a--linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. *Food Chemistry*, v.135, n.4, p.2207-2214, 2012.

FRANCK, A.; COUSSEMENT, P. Multi-functional inulin. *Food Ingredients and Analysis International*, Oct., p.8–10, 1997.

FRANZ, C.M.A.P.; HUNCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, v.151, n.2, p.125-140, 2011.

FURTADO, D.N.; TODOROV, S.D; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DFF04Mi isolated from goat milk: Characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.45, n.4, p.1541-1550, 2014.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LOPEZ, R.L.; BEN OMAR, N. Bacteriocin-based strategies for food bio-preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v.120, n.1/2, p.51-70, 2007.

GAGLIO, R.; SCATASSA, M.L.; CRUCIATA, M.; MIRAGLIA, V.; CORONA, O.; DI GERLANDO, R.; PORTOLANO, B.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. *In vivo* application and dynamics of lactic acid bacteria for the four-season production of Vastedda-like cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.177, p.37-48, 2014.

GARDE, S.; ÁVILA, M.; ARIAS, R.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v.150, n.1, p.59-65, 2011.

GARCÍA, V.; ROVIRA, S.; BOUTOIAL, K.; FERRANDINI, E.; LÓPES MORALES, M.B. Effect of starters and ripening time on the physicochemical, nitrogen fraction and texture profile of goat's cheese coagulated with a vegetable coagulant (*Cynara cardunculus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.94, n.3, p.552-559, 2013.

GENTÈS, M-G.; ST-GELAIS, D.; TURGEON, S.L. Exopolysaccharide-milk protein interactions in a dairy model system simulating yoghurt conditions. *Dairy Science & Technology*, v.93, n.3, p.255-271, 2013.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K.J. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by *lactobacilli* isolated from Sturgeon fish. *Food Control*, v.32, n.2, p.379-385, 2013.

GIANG, H.H.; VIET, T.Q.; OGLE, B.; LINDBERG, J.E. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livestock Science*, v.129, n.2/3, p.95-103, 2010.

GIOIA, D.D.; STRAHSBURGER, E.; LACEY, A.M.L.; BREGOLA, V.; MAROTTI, I.; ALOISIO, I.; BIAVATI, B.; DINELLI, G. Flavonoid bioconversion in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* B7003: a potential probiotic strain for functional food development. *Journal of Functional Foods*, v.7, p.671-679, 2014.

GONZÁLEZ-TOLEDO, S.Y.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, B.E.; GARÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; PRADO BARRAGÁN, L.A.; REGALADO-GONZÁLEZ, C. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science*, v.75, n.6, p.M347-M353, 2010.

GRATTEPANCHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C. Enhancement of functional characteristics of mixed lactic culture producing nisin Z and exopolysaccharides during continuous prefermentation of milk with immobilized cells. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.12, p.5361-5373, 2007a.

GRATTEPANCHE, F.; AUDET, P.; LACROIX, C. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*, v.17, n.2, p.123-132, 2007b.

GROSU-TUDOR, S.S.; STANCU, M.M.; PELINESCU, D.; ZAMFIR, M. Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.30, n.9, p.2459-2469, 2014.

GUPTA, A.; TIWARI, S.K. Plantaricin LD1: a bacteriocin produced by food isolate of *Lactobacillus plantarum* LD1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.172, n.7, p.3354-3362, 2014.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; ERTEKIN-FILIZ, B.; SEYDIM, A.C. Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, v.94, n.3, p.1239-1242, 2011.

HACINI-RACHINEL, F.; NANCEY, S.; BOSCHETTI, G.; SARDI, F.; DOUCET-LADEVÈZE, R.; DURAND, P.Y.; FLOURIÉ, B.; KAISERLIAN, D. $CD4^+$ T cells and *Lactobacillus casei* control relapsing colitis mediated by $CD8^+$ T cells. *Journal of Immunology*, v.183, n.9, p.5477-5486, 2009.

HAMMAMI, R.; FERNANDEZ, B.; LACROIX, C.; FLISS, I. Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.70, n.16, p.2947-2967, 2013.

HEYDARI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M.R.; MOHAMMADIFAR, M.A.; EZZATPANAH, H. Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic compounds. *Italian Journal of Food Science*, v.23, n.2, p.153–163, 2011.

IBARGUREN, C.; NARANJO, P.M.; STOTZEL, C.; AUDISIO, M.C.; SHAM, E.L.; TORRES, E.M.F.; MULLER, F.A. Adsorption of nisin on raw montmorillonite. *Applied Clay Science*, v.90, p.88-95, 2014.

IYER, R.; TOMAR, S.K.; MAHESWARI, T.U.; SINGH, R. *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.20, n.3, p.133-141, 2010.

JEANSON, S.; HILGERT, N.; COQUILLARD, M.O.; SEUKPANYA, C.; FAIVELEY, M.; NEVEU, P.; ABRAHAM, C.; GEORGESCU, V.; FOURCASSIÉ, P.; BEUVIER, E. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, v.131, n.1, p.75-81, 2009.

JOZALA, A.F.; ANDRADDE, M.S.; ARAUZ, L.J.; PESSOA-JUNIOR, A.; PENNA, T.C.V. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136/140, n.1/12, p.515-528, 2007.

JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L.; MAZZOLA, P.G.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; PENNA, T.C.V.; TEIXEIRA, J.A.; PASSARINHA, L.A.; QUEIROZ, J.A.; PESSOA-JUNIOR, A. Low-cost purification of nisin from milk whey to a highly active product. *Food and Bioproducts Processing*, v.93, p.115-121, 2015.

KHOCHAMIT, N.; SIRIPORNADULSIL, S.; SUKON, P.; SIRIPORNADUSIL, W. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potencial as probiotic strain. *Microbiological Research*, v.170, p.36-50, 2015.

KIM, Y.J.; PARK, S.Y.; LEE, H.C.; YOO, S.S.; OH, S.J.; KIM, H.S.; CHIN, K.B. Evaluation of fermented sausages manufactured with reduced-fat and functional starter cultures on physicochemical, functional and flavor characteristics. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, v.34, n.3, p.346-354, 2014.

KOLOZYN-KRAJEWSKA, D.; DOLATOWSKI, Z.J. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, v.47, n.1, p.1761-1772, 2012.

KONDEPUDI, K.K.; AMBALAM, P.; NILSSON, I.; WADSTROM, T.; LJUNGH, A. Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe*, v.18, n.5, p.489-497, 2012.

KORBEKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A.M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: SHAH, N.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., eds. *Probiotic and prebiotic foods*: technology, stability and benefits to human health. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2011. p.131–169. (Advances in food safety and food microbiology).

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DORTU, C.; EVARARD, P.; THONART, P. Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *International Journal of Food Science and Technology*, v.45, n.5, p.937-943, 2010.

KUDA, T.; YAZAKI, T.; ONO, M.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. *In vitro* cholesterol - lowering properties of *Lactobacillus plantarum* AN6 isolated from aji-narezushi. *Letters in Applied Microbiology*, v.57, n.3, p.187-192, 2013.

KUMAR, M.; JAIN, A.K.; GHOSH, M.; GANGULI, A. Potential application of an anti-aeromonas bacteriocin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in the preservation of vegetable salad. *Journal of Food Safety*, v.32, n.3, p.369-378, 2012.

LAMICHHANE, S.; YDE, C.C.; FORSSTEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SAARINEN, M.; JENSEN, H.M.; GIBSON, G.G.; RASTALL, R.; FAVA, F.; BERTRAM, H.C. Impact of dietary polydextrose fiber on the human gut metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.62, n.40, p.9944-9951, 2014.

LANEUVILLE, S.I.; TURGEON, S.L. Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides. *International Dairy Journal*, v.37, n.1, p.5-15, 2014.

LEBEL, G.; PICHÉ, F.; FRENETTE, M.; GOTTSCHALK, M.; GRENIER, D. Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides*, v.50, p.19-23, 2013.

LEVIN, B.R.; ANTIA, R.; BERLINER, E.; BLOLAND, P.; BONHOEFFER, S.; COHEN, M.; DEROUIN, T.; FIELDS, P.I.; JAFARI, H.; JERNIGAN, D.;

LIPSITCH, M.; MCGOWAN, J.E.; MEAD, P.; NOWAK, M.; PORCO, T.; SYKORA, P.; SIMONSEN, L.; SPITZNAGEL, J.; TAUXE, R.; TENOVER, F. Resistance to antimicrobial chemotherapy: a prescription for research and action. *American Journal of the Medical Sciences*, v.315, n.2, p.87-94, 1998.

LI, D.; LI, J.X.; ZHAO, F.; WANG, G.H.; QIN, Q.Q.; HAO, Y.L. The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. *Food Chemistry*, v.197, pt.A, p.367-372, 2016.

LIU, C.F.; TSENG, K.C.; CHIANG, S.S.; LEE, B.H.; HSU, W.H.; PAN, T.M. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.91, n.12, p.2284-2291, 2011.

LONDERO, A.; HAMET, M.F.; DE ANTONI, G.L.; GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, v.79, n.3, p.262-271, 2012.

LONDON, L.E.E.; CHAURIN, V.; AUTY, M.A.E.; FENELON, M.A.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Use of *Lactobacillus mucosae* DPC 6426, an exopolysaccharide producing strain, positively influences the techno-functional properties of yoghurt. *International Dairy Journal*, v.40, p.33-38, 2015.

LUO, F.; FENG, S.; SUN, Q.; XIANG, W.L.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YANG, Z. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. *Food Control*, v.22, n.1, p.50-53, 2011.

MALHEIROS, P.S.; DAROIT, D.J.; BRANDELLI, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese free and nanovesicle-encapsulated nisin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.43, n.4, p.1414-1418, 2012.

MARAFON, A.P.; SUMI, A.; ALCÂNTARA, M.R.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. *LWT – Food Science and Technology*, v.44, n.2, p.511-519, 2011.

MARTINEZ, F.A.C.; BALCIUNAS, E.M.; SALGADO, J.M.; GONZÁLEZ, J.M.D.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v.30, n.1, p.70-83, 2013.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, v.12, n.2/3, p.173-182, 2002.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FÉRNANDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M., eds. *Biotechnology of lactic acid bacteria*: novel applications. Ames: Wiley-Blackwell, , 2010. p.3-33.

MCMANUS, P.S.; STOCKWELL, V.O.; SUNDIN, G.W.; JONES, A.L. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p.443-465, 2002.

MEI, G.Y.; CAREY, C.M.; TOSH, S.; KOSTRZYNSKA, M. Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, v.57, n.10, p.857–865, 2011.

MENDE, S.; MENTNER, C.; THOMAS, S.; ROHM, H.; JAROS, D. Exopolysaccharide production by three different strains of *Streptococcus thermophilus* and its effect on physical properties of acidified milk. *Engineering in Life Sciences*, v.12, n.4, p.466-474, 2012.

MENDE, S.; PETER, M.; BARTELS, K.; ROHM, H.; JAROS, D. Addition of purified exopolysaccharide isolates from *Streptococcus thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. *Food Hydrocolloids*, v.32, n.1, p.178-185, 2013.

MENDE, S.; DONG, T.; RATHEMACHER, A.; ROHM, H.; JAROS, D. Physicochemical characterisation of the exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* ST-143. *International Journal of Food Science and Technology*, v.49, n.5, p.1254-1263, 2014.

MILLER, P.; CHUMCHALOVA, J.; McMULLEN, L.M. Nisin-producing *Lactococcus* spp. from mayonnaise-based products and their raw materials. *European Food Research and Technology*, v.231, n.1, p.137-141, 2010.

MIHAIL, A.; KOSTOV, G.; SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; KOPRINKOVA-HRISTOVA, P. Proto-cooperation factors in yogurt starter cultures. *Revue de Génie Industriel*, v.3, p.4-12, 2009.

MITRA, D.; POMETTO III, A.L.; KHANAL, K.S.; KARKI, B.; BREHM-STECHER, B.F.; VAN LEEUWEN, J.H. Value-added production of nisin from soy whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, n.7, p.1819-1833, 2010.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A.M. Review article: technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*, v.27, n.2, p.192–212, 2011.

MORAES, A.D. *Otimização da produção de nisina em meio sintético*. São Paulo, 2002. 159p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MONTEL, M.C.; BUCHIN, S.; MALLET, A.; DELBES-PAUS, C.; VUITTON, D.A.; DESMASURES, N.; BERTHIER, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, v.177, p.136-154, 2014.

NAKAMURA, K.; ARAKAWA, K.; KAWAI, Y.; YASUTA, N.; CHUJO, T.; WATANABE, M.; IIOKA, H.; TANIOKA, M.; NISHIMURA, J.; KITAZAWA, H.; TSURUMI, K.; SAITO, T. Food preservative potential of gassericin A-containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. *Animal Science Journal*, v.84, n.2, p.144-149, 2013.

NAMBOU, K.; GAO, C.; ZHOU, F.; GUO, B.; AI, L.; WU, Z.-J. A novel approach of direct formulation of defined starter culture for different kefir-like beverage production. *International Dairy Journal*, v.34, n.2, p.237-246, 2014.

NG, W.E.; YEUNG, M.; TONG, P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, v.145, n.1, p.169-175, 2011.

NISHIE, M.; NAGOA, J.I.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science*, v.17, n.1, p.1-16, 2012.

NYANGALE, E.P.; FARMER, S.; KELLER, D.; CHERNOFF, D.; GIBSON, G.R. Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers afther dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. Anaerobe, v.30, p.75-81, 2014.

OLIVEIRA, M.E.G.; GARCIA, E.F.; QUEIROGA, R.C.R.E.; SOUZA, E.L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. *Scientia Agricola*, v.69, n.6, p.370-379, 2012.

OLIVEIRA, R.P.S.; FLORENCE, A.C.R.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Use of lactulose as prebiotic and its influence on the growth, acidification profile and viable counts of different probiotics in fermented skim milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.145, n.1, p.22–27, 2011b.

OLIVEIRA, R.P.S.; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R.C.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in non-fat synbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.128, n.3, p.467–472, 2009.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the inulin effect. *Food Research International*, v.48, n.1, p.21-27, 2012a.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Prebiotic effect of inulin on the growth and organic acid profile of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *Chemical Engineering Transactions*, v.27, p.277-282, 2012c.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin as prebiotics and synbiotic interections between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of Food Engineering*, v.107, n.1, p.36-40, 2012b.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, v.47, n.2, p.358-363, 2012d.

OLIVEIRA, R.P.S.; TORRES, B.R.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, v.62, p.62-69, 2012e.

PARK, K.Y.; JEONG, J.K.; LEE, Y.E.; DAILY III, J.W. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *Journal of Medicinal Food*, v.17, n.1, p.6-20, 2014.

PASTERIS, S.E.; PINGITORE, E.V.; ALE, C.E.; NADER-MACÍAS, M.E.F. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.30, n.3, p.1053-1062, 2014.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, v.2, n.2, p.115-125, 2012.

PEREZ, H.R.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, v.13, suppl.1, p.1-13, 2014.

PESCUMA, M.; HÉRBERT, E.M.; BRU, E.; VALDEZ, G.F.; MOZZI, F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. *Journal of Dairy Research*, v.79, n.2, p.201-208, 2012.

PESCUMA, M.; HÉRBERT, E.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.141, n.1/2, p.73-81, 2010.

PETROVA, P.; VELIKOVA, P.; POPOVA, L.; PETROV, K. Direct conversion of chicory flour into L(+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresource Technology*, v.186, p.329–333, 2015.

PFEILER, E.A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, v.15, n.12, p.546-553, 2007.

PRANCKUTE, R.; KAUNIETIS, A.; KUISIENE, N.; CITAVICIUS, D. Development of synbiotics with inulin, palatinose, α-cyclodextrin and probiotics bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, v.63, n.1, p.33-41, 2014.

PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing *Bifidobacterium strains*. *Food Research International*, v.51, n.1, p.15-22, 2013.

PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobactéria in milk products: an overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*, v.55, p.247-262, 2014.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N.P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. *LWT – Food Science and Technology*, v.43, n.5, p.819-827, 2010.

RASTALL, R.A. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, p.305-339, 2010.

REA, M.C.; ALEMAYEHU, D.; ROSS, R.P.; HILL, C. Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*, v.62, pt.9, p.1369-1378, 2013.

REDDY, K.V.; ARANHA, C.; GUPTA, S.M.; YEDERY, R.D. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reproduction*, v.128, n.1, p.117–126, 2004.

REIS, J.A.; PAULA, A.T.; CASSAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, v.4, n.2, p.124-140, 2012.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, v.30, p.1-10, 2014.

RIBEIRO, S.C.; COELHO, M.C.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; DAPKEVICIUS, M.L.E.; SILVA, C.C.G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, v.116, n.3, p.573-583, 2013.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. *Journal of Nutrition*, v.137, n.3, suppl.2, p.830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.B. Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, v.127, n.7, suppl., p.1436S-1437S, 1999.

ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Non digestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.40, p.461–480, 2000.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A.L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I.; WOLVERS, D.; WATZL, B.; SZAJEWSKA, H.; STAHL, B.; GUARNER, F.; RESPONDEK, F.; WHELAN, K.; COXAM, V.; DAVICCO, MJ.; LÉOTOING, L.; WITTRANT, Y.; DELZENNE, NM.; CANI, PD.; NEYRINCK, AM.; MEHEUST, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, v.104, suppl.2, p.S1-63, 2010.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; PEREIRA, C.I.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. The potencial effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT - Food Science and Technology*, v.44, n.1, p.100-108, 2011.

RODRÍGUEZ-PAZO, N.; VÁZQUEZ-ARAÚJO, L.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; CORTÉS-DIÉGUEZ, S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenylpyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.171, n.4, p.1042-1060, 2013.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT – Food Science and Technology*, v.50, n.1, p.1-16, 2013.

SANTOS, C.C.A.A.; LIBECK, B.S.; SCHWAN, R.F. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, v.186, p.32-41, 2014.

SCHIRRU, S.; FAVARO, L.; MANGIA, N.P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R.; FANCELLO, F.; FRANCO, B.D.G.M.; OLIVEIRA, R.P.S.; TODOROV, S.D. Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, v.64, n.1, p.321-331, 2014.

SETTACHAIMONGKON, S.; NOUT, M.J.R.; FERNANDES, E.C.A.; HETTINGA, K.A.; VERVOORT, J.M.; VAN HOOIJDONK, T.C.M.; ZWIETERING, M.H.; SMID, E.J.; VAN VALENBERG, H.J.F. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophiles* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, v.177, p.29-36, 2014.

SHI, Z.; WEI, P.; ZHU, X.; CAI, J.; HUANG, L.; XU, Z. Efficient production of l-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, v.51, n.5, p.263-268, 2012.

SHIBY, V.K.; MISHIRA, H.N. Fermented milks and milk products as functional foods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.53, n.5, p.482-496, 2013.

SILKIN, L.; HAMZA, S.; KAUFMAN, S.; COBB, S.L.; VEDERAS, J.C. Spermicidal bacteriocins: Lacticin 3147 and subtilosin A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, n.10, p.3103–3106, 2008.

SIMS, I.M.; RYAN, J.L.J.; KIM, S.H. *In vitro* fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe*, v.25, p.11-17, 2014.

STIJEPIC, M.; DURDEVIC-MILOSEVIC, D.; GLUSAC, J. Production of low fat yoghurt enriched with different functional ingredients. *Quality of Life*, v.3, n.1/2, p.5-12, 2012.

SUMI, C.D.; YANG, B.W.; YEO, I.C.; HAHM, Y.T. Antimicrobial peptides of the genus bacillus: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, v.61, n.2, p.93-103, 2015.

SODINI, I.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Identification of interacting mixed culture of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of non-interacting mixed cultures. *Applied Microbiology and Biotechnolog*y, v.54, n.5, p.715-718, 2000.

TABASCO, R.; PALENCIA, P.F.; FONTECHA, J.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: fermentative metabolism and colonization. *LWT - Food Science and Technology*, v.55, n.2, p.680-684, 2014.

TAMIME, A.; TAMIME, A.Y.; SAARELA, M.; SONDERGAARD, A.K.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. TAMIME, A.Y., ed. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. cap.3, p.39–72.

TANIGUCHI, M.; ISHIYAMA, Y.; TAKATA, T.; NAKANISHI, T.; KANEOKE, M.; WATANABE, K.I.; YANAGIDA, F.; CHEN, Y.S.; KOUYA, T.; TANAKA, T. Growth-inhibition of hiochi bacteria in namazake (raw sake) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.109, n.6, p.570-575, 2010.

TÁRREGA, A.; ROCAFULL, A.; COSTELL, E. Effect of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. *LWT - Food Science and Technology*, v.43, n.3, p.556–562, 2010.

TERZAGHI, B.E.; SANDINE, W.E. Improved medium for lactic streptococcis and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, v.29, n.6, p.807-813, 1975.

THOMAS, L.V.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L., eds. *Antimicrobials in food*. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. p.237–274. (Food science and technology, 145).

TISCORNIA, I.; SÁNCHEZ-MARTINS, V.; HERNÁNDEZ, A.; BOLLATI-FOGOLÍN, M. Human monocyte-derived dendritic cells from leukoreduction system chambers after plateletpheresis are functional in an *in vitro* co-culture assay with intestinal epithelial cells. *Journal of Immunological Methods*, v.384, n.1/2, p.164-170, 2012.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, v.9, p.225-241, 2014.

USTYUGOVA, E.A.; TIMOFEEVA, A.V.; STOYANOVA, L.G.; NETRUSOV, A.I.; KATRUKHA, G.S. Characteristics and identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-k. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.48, n.6, p.557-563, 2012.

UROIC, K.; NIKOLIC, M.; KOS, B.; PAVUNC, A.L.; BEGANOVIC, J.; LUKIC, J.; JOVČIĆ, B.; FILIPIC, B.; MILJKOVIC, M.; GOLIC, N.; TOPISIROVIC, L.; CADEZ, N.; RASPOR, P.; SUSKOVIC, J. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technology and Biotechnology*, v.52, n.2, p.232-241, 2014.

VAN BUEREN, A.L.; SARAF, A.; MARTENS, E.C.; DIJKHUIZEN, L. Differential metabolism of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacilli* by the human gut symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.81, n.12, p.3973-3983, 2015.

WANG, G.; ABERCROMBIE, J.G.; HUANG, G.; TZENG, T.R.J. Enhanced fed-batch production, partial purification, characterization of jenseniin P, and discovery of a new bacteriocin-like substance produced by *Propionibacterium jensenii* B1264. *European Food Research and Technology*, v.239, n.1, p.79-86, 2014.

WICHIENCHOT, S.; THAMMARUTWASIK, P.; JONGJAREONRAK, A.; CHANSUWAN, W.; HMADHLU, P.; HONGPATTARAKERE, T. ITHARAT, A.; OORAIKUL, B. Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, v.33, n.5, p.517–523, 2011.

WIJNKER, J.J.; WEERTS, E.A.W.S.; BREUKINK, E.J.; HOUBEN, J.H.; LIPMAN, L.J.A. Reduction of *Clostridium sporogenes* sporegenes spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. *Food Microbiology*, v.28, n.5, p.974-979, 2011.

WILLEY, J.M.; VAN DER DONK, W.A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, v.61, p.477–501, 2007.

WOLF-HALL, C.E.; GIBBONS, W.R.; BAUER, N.A. Development of a low-cost medium for production of nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.25, n.11, p.2013-2019, 2009.

WOUTERS, R. Inulin. In: IMESON, I., ed. *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. cap.10, p.181-197.

WU, M, H.; PAN, T.M.; WU, Y.J.; CHANG, S.J.; CHANG, M.S.; HU, C.Y. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*, v.144, n.1, p.104-110, 2010.

YANG, S.-C.; LIN, C.-H.; SUNG, C.T.; FANG, J.-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, v.5, art.241, p.1-10, 2014.

ZALÁN, Z.; HUDACEK, J.; STETINA, J.; CHUMCHALOVA, J.; HALÁSZ, A. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology*, v.230, p.395-404, 2010.

ZALÁN, Z.; HUDÁCEK, J.; TÓTH-MARKUS, M.; HUSOVÁ, E.; SOLICHOVA, K.; HEGYI, F.; PLOCKOVÁ, M.; CHUMCHALOVÁ, J.; HALÁSZ, A. Sensorically and antimicrobially active metabolite production of *Lactobacillus* strains on Jerusalem artichoke juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.91, n.4, p.672-679, 2011.

ZHANG, Q.; YANG, B.; BRASHEARS, M.M.; YU, Z.; ZHAO, M.; LIU, N.; LI, Y. Influence of casein hydrolysates on exopolysaccharide synthesis by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.94, n.7, p.1366-1372, 2014.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; LI, S.; ZHANG, Y.; YANG, Z. Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, n.4, p.1470-1478, 2011.

ANEXO 1
Apresentação de trabalhos

FARINHA, L.R.L., PIAZENTIN, A.C.M., AZEVEDO, P.O.S., SOUZA, E.C., OLIVEIRA, R.P.S. Acidification kinetic and growth of *Streptococcus thermophilus* TA 040 and *Lactococcus lactis* CECT 4434 from whey. Trabalho apresentado na forma de "pôster" durante o **28º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, SC, no período de 18 a 22 de outubro de **2015**.

28º Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 18 a 22 de Outubro de 2015 | Centro Sul - Centro de Convenções de Florianópolis | Florianópolis - Santa Catarina - Brasil

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado ACIDIFICATION KINETIC AND GROWTH OF STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS TA 040 AND LACTOCOCCUS LACTIS CECT 4434 FROM WHEY com a autoria de: FARINHA, L. R. L., PIAZENTIN, A. C. M. , AZEVEDO, P. O. S., SOUZA, E. C. , OLIVEIRA, R. P. S. foi apresentado na forma de pôster durante o 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro de Convenções de Florianópolis, na cidade de Florianópolis, SC, no período de 18 a 22 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Marina Baquerizo
Presidente da SBM

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldmann
1º Secretário

Apoio:

Organização:

Eventos simultâneos: III Simpósio de Fermentação Alcoólica - III Simpósio de Microrganismos Fotossintetizantes - IV Simpósio de Escherichia coli Luiz Rachid Trabulsiv

FARINHA, L.R.L., SABO, S.S., PORTO, M.C.W., OLIVEIRA, R.P.S. Influencia de prebióticos en el crecimiento celular del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434. Trabalho apresentado na forma de “oral” durante o **XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología**. Cartagena, Colombia, no período de 5 a 8 de novembro de 2014.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

ACM Asociación Colombiana de Microbiología

ALAM Asociación Latinoamericana de Microbiología

XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y
4 Congreso Colombiano de Microbiología

CERTIFICAN QUE

Luiz Rogério Ludwig, Sabrina Sabo, Maria Carolina, Ricardo Pinheiro de Souza

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

INFLUENCIA DE PREBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO CELULAR DEL LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS CECT 4434

EN CATEGORÍA ORAL

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

HOWARD JUNCA
Presidente
Asociación Colombiana de Microbiologia y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

FARINHA, L.R.L., SABO, S.S., PORTO, M.C.W., OLIVEIRA, R.P.S. Cellular growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 in synthetic growth. Trabalho apresentado na forma de "pôster" durante a **XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**. São Paulo, SP, no período de 20 a 24 de outubro de 2014.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
XLIX Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
6º Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas
XIV Campanha de Diabetes

CERTIFICADO

Certificamos que **LUIZ LUDWIG FARINHA** apresentou o resumo "*Celular Growth of Lactococcus Lactis Subsp. Lactis Cect 4434 in Synthetic Broth*", de autoria de Luiz Ludwig Farinha, Sabrina Sabo, Carolina Porto e Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, em forma de pôster, no dia 22 de outubro de 2014, na XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 20 a 24 de outubro de 2014.

São Paulo, 24 de outubro de 2014.

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Presidente da Comissão Organizadora

FARINHA, L.R.L., OLIVEIRA, R.P.S. Curva de calibração e atividade antimicrobiana da nisina. Trabalho apresentado na forma de “pôster” durante **IV Congresso Farmacêutico da UNESP**. Araraquara, SP, no período de 16 a 22 de agosto de 2014.

CONGRESSO FARMACÊUTICO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Curva de calibração e a atividade antimicrobiana da nisina

dos autores

Farinha LRL, Oliveira RPS

foi apresentado por

Luiz Rogério Ludwig Farinha

no IV Congresso Farmacêutico da UNESP
realizado no período de 16 a 22 de agosto de 2014.

Rone Aparecido De Grandis
Coordenador Geral Discente da 61ª JFU

Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan
Coordenador Docente do Científico

Profa. Dra. Mara Cristina Pinto
Coordenadora Geral Docente da 61ª JFU

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta
Diretora da FCF-UNESP

JFU
Inovação e Produção de Conhecimento

PORTO, M.C.W., FARINHA, L.R.L., SABO, S.S., OLIVEIRA, R.P.S. Effect of prebiotics fructooligossacharides and polydextrose on growth cells of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 in semi-shyntetic broth. Trabalho apresentado na forma de “oral” durante o **XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología**. Cartagena, Colombia, no período de 5 a 8 de novembro de 2014.

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

ACM Asociación Colombiana de Microbiología

ALAM Asociación Latinoamericana de Microbiología

XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y
4 Congreso Colombiano de Microbiología

CERTIFICAN QUE

Maria Carolina Porto, Luis Rogério Luidwig Farinha, Sabrina Sabo,
Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira

PARTICIPARON CON EL TRABAJO TITULADO:

EFFECT OF PREBIOTICS FRUCTO-OLIGOSSACHARIDES AND POLYDEXTROSE ON GROWTH CELLS OF PEDIOCOCCUS PENTOSACEUSATCC43200 ® IN SEMI-SHYNTETIC BROTH

Cartagena, Colombia
Noviembre 5 al 8 de 2014

HOWARD JUNCA
Presidente
Asociación Colombiana de Microbiología y
Asociación Latinoamericana de Microbiología

LILIANA MARCELA OCHOA GALEANO
Directora
Escuela de Microbiología
Universidad de Antioquia

AZEVEDO, P.O.S., FARINHA, L.R.L., OLIVEIRA, R.P.S. Effect of inulin and sucrose on growth and bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus*. Trabalho apresentado na forma de pôster durante o **28º Congresso Brasileiro de Microbiologia** realizado no Centro de Convenções de Florianópolis, na cidade de Florianópolis, SC, no período de 18 a 22 de outubro de **2015**.

28° Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 18 a 22 de Outubro de 2015 | Centro Sul - Centro de Convenções de Florianópolis | Florianópolis - Santa Catarina - Brasil

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado EFFECT OF INULIN AND SUCROSE ON GROWTH AND BACTERIOCIN PRODUCTION BY PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS com a autoria de: AZEVEDO, P. O. S. , FARINHA, L. R. L. , OLIVEIRA, R. P. S. foi apresentado na forma de pôster durante o 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro de Convenções de Florianópolis, na cidade de Florianópolis, SC, no período de 18 a 22 de outubro de 2015.

Profa. Dra. Marina Baquerizo
Presidente da SBM

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldmann
1º Secretário

Apoio:

Organização:

Eventos simultâneos: III Simpósio de Fermentação Alcoólica - III Simpósio de Microrganismos Fotossintetizantes - IV Simpósio de Escherichia coli Luiz Rachid Trabulsiv

ANEXO 2

Resumos

Resumo apresentado no 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2015

Acidification Kinetic and growth of *Streptococcus thermophilus* TA 040 and *Lactococcus lactis* CECT 4434 from whey

Abstract

Whey is a by-product of dairy industry which has a high nutritional value. Therefore, it would be of great interest to exploit this waste as a fermentation medium for the production of high value biomolecules. In Brazil, it is estimated that approximately 50% of whey are improperly discarded, causing the pollution of rivers and water sources due to its high content of organic matter. On the other hand, studies have been reported the probiotic properties of *Lactococcus lactis*. As a result, *L. lactis* as well as *Streptococcus thermophilus* have been proposed for starter culture preparations in dairy industry. In this context, we examined the acidification kinetic and growth of *S. thermophilus* TA 040 and *L. lactis* CECT 4434 using whey as a culture medium. Cultures of *L. lactis* and *S. thermophilus* were inoculated into 100 mL of whey and the initial average count of each inoculum was approximately 10^8 UFC/mL. After inoculation, the samples were incubated in the *Cinétique d`acidification* (CINAC) fermentation system. The kinetic parameters, particularly maximum acidification rate (V_{max}), time to reach pH 5.0 ($t_{pH5.0}$) and to complete the fermentation ($t_{pH4.5}$) were determined. the time for *S. thermophilus* and *L. lactis* to complete fermentation (i.e., when the pH reached 4.5) was 13.8, 7.9 and 49.2 % shorter than without inulin, respectively. In particular, the V_{max} values were $9.63x10^{-3}$ pH units/min and $5.29x10^{-3}$ for *L. lactis* subsp. *lactis S. thermophilus*, respectively. As expected, the shortest fermentation time ($t_{pH4.5}$=5.33 h) was obtained by *L. lactis*. The counts of *L. lactis* and *S. thermophilus* were about $1.7x10^8$ CFU/mL and 1.9 $x10^8$ CFU/mL, respectively. These fermentations were mainly characterized by a partial consumption of lactose and formation of lactic acid as a main product of the fermentation. It can be concluded that whey can be used as a culture medium with additional carbon source thus providing the power supply needed for the

fermentation product of the microbial cultures studied, the CECT 4434 *L*. *lactis* subsp. *lactis* and *S*. *thermophilus* TA 040.

This work dealt with the effect of whey as a culture medium to improve the quality of dairy fermented products

Key-words: lactic acid bacteria, acidification kinetic, whey

Resumo apresentado sob forma de exposição oral no XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología

Influencia de prebióticos en el crecimiento celular del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434

Resumen

La influencia de los prebióticos, en el crecimiento celular de las bacterias ácidolácticas (BAL), viene generando cada vez mayor interés. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la influencia de ingredientes prebióticos en la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) y en el tiempo de generación (t_g) de la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434. La cepa, adquirida de la Colección Española de Cultivos (CECT), fue cultivada en medio MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*) suplementado o no (control) con frutooligossacarídeos (MRS+FOS), polidextrose (MRS+PD) e inulina (MRS+IN). Los cultivos fueron conducidos en *shaker*, en las condiciones de 100 rpm de agitación por 12 h/30 °C. Las muestras fueron recogidas cada 2 horas, durante 12 horas, y posteriormente cada 12 horas, totalizando 48 horas de cultivo. El proceso de monitorización del crecimiento celular investigó la relación entre D.O. (600 nm) y masa seca (g/mL), obtenida después de la filtración del caldo de cultivo en membrana de 0,22 µm (Millipore). A través de esta relación se llegó a las ecuaciones: $y = 2{,}0076 * x + 0{,}00182$; $\mu max = \frac{1}{(t2-t1)} \ln \frac{X2}{X1}$ e $t_g = \ln 2/\mu max$. La fase exponencial de crecimiento de la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 ocurrió en un intervalo de 2 a 8 horas para MRS, MRS+FOS, MRS+PD y MRS+IN, presentando la masa seca el valor medio de 0,7358; 0,7154; 0,7581 e 0,9481 (g/L), respectivamente; ya la μ_{max} tuvo como resultados 0,14 h^{-1}, 0,48 h^{-1}, 0,67 h^{-1}, 0,69 h^{-1}, e o t_g, 2,65 h, 1,42 h, 1,08 h e 1,06 h. Los prebióticos causaron un aumento de la μ_{max} de la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 y, consecuentemente, la disminución del t_g del microorganismo.

Resumo apresentado na XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia (FCF/USP) e publicado no *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 50, Suppl. 1, 2014.

Cellular growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT4434 in synthetic broth

Introduction and Objectives

The species *Lactococcus lactis*, members of the lactic acid bacteria (LAB), are *generally regarded as safe* (GRAS) and, commonly used in the elaboration of dairy products, which gives them both characteristic flavor and texture, besides improving their microbiological quality.

The main objective of this research was to determine the maximum specific velocity of growth (μ_{max}) for the strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 in MRS.

Material and Methods

The strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434, acquired from the Spanish Type Culture Collection (CECT), was cultivated in MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*), in *shaker*, under 100 rpm of agitation speed by 12 hours in 30 °C from 100 µL of the stock culture. Samples were collected each 2 h, for 12 h, and, afterwards, each 12 h, totalizing 34 h of cultivation. The growth determination was monitored through the relationship between D.O. (600 nm) and dry weight (mg/mL), obtained from the filtering of the cultivation broth in membrane of 0,22 µm (Millipore), resulting in the following equation: $y = 2{,}0076 * x + 0{,}00182$. Therefore, the maximum velocity of growth was determined by the relation between LN of dry mass (mg/mL) *versus* the time (h) expressed in the equation: $y = 0{,}1396 * x - 1{,}122$.

Results and Discussions

The exponential phase of the strain *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434's growth in synthetic MRS happened between a 2 to 8 h gap with μ_{max} of 0,14 h^{-1} and generation time (t_g) of 2,65 h.

These are similar results compared to the ones found by Jozala (2011), whose experiment obtained maximum population of *L. lactis* in synthetic MRS within the first 9 h of cultivation, maintained in stagnate phase until 48 h of incubation.

Sponsor Agencies: CAPES; FAPESP

Resumo apresentado no Congresso Farmacêutico da UNESP/Araraquara

Curva de calibração e a atividade antimicrobiana da nisina

Introdução

A nisina é um importante agente antimicrobiano com ampla utilização industrial, e vem sendo empregada comercialmente para a bioconservação de alimentos (Cao-Hoang et al., 2010). Esta biomolécula apresenta atividade bactericida contra um amplo espectro de bactérias Gram positivas, incluindo as esporogênicas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* (Collins et al., 2010; Cotter et al., 2005; Delve-Broughton, 2005). A habilidade da nisina como composto antimicrobiano fez com que esta biomolécula ganhasse interesse comercial por ser considerada segura na indústria de alimentos *generally recognized as safe* (GRAS) (Mayo et al., 2010). No Brasil, em 1996, o Ministério da Saúde autorizou seu emprego em queijos na concentração de até 12,5 mg.kg (Nascimento et al., 2008).

Objetivo

O objetivo deste trabalho de pesquisa foi avaliar o efeito antimicrobiano da nisina frente ao micro-organismo *Lactobacillus sakei* através de uma curva de calibração.

Metodologia

A determinação de atividade da nisina foi realizada pelo método de difusão em ágar previamente descrito por Montville (1992). A curva associando a produção de nisina em UA (unidades arbitrárias) em função do diâmetro do halo de inibição foi obtida a partir de incubação da placa contendo a célula sensível de *Lactobacillus sakei* em estufa a 37 ºC por 24 horas. As amostras foram padronizadas a pH=6,5 com NaOH 0,1N e, posteriormente 50 µL destas foram aliquotadas em poços de aproximadamente 3 mm de diâmetro. O preparado das soluções foi realizado dissolvendo 0,1 g, 0,5 g, 1,0 g e 1,5 g de *Nisaplin*® em 50 mL de HCL 0,02N, adicionada com 0,75% (m/v) de NaCL. As soluções foram esterilizadas a 121 ºC por 15 min. A medida do halo de inibição fornece uma estimativa da concentração da nisina em AU por mL (unidades arbitrárias por

mililitro). Para a modelagem da curva de calibração, associou-se a concentração da nisina através do diâmetro do halo de inibição. Sendo que para o cálculo foi utilizada a fórmula:

$$D\ (cm) = 0{,}2401 \times \ \mathrm{Log}\, P\ + 1{,}0063\ (r^2\ = 0{,}9833)$$

Onde: $\mathrm{Log}\, P$ é o Log da potência da bacteriocina testada.

Resultados e discussão

Os resultados da análise da curva de calibração da nisina por intermédio do diâmetro do halo de inibição calculado empregando a fórmula descrita em Metodologia. Os resultados permitem demonstrar que houve uma relação de proporcionalidade da concentração da *Nisaplin*® com o diâmetro do halo de inibição. Os resultados da análise evidenciaram que houve influência da concentração de *Nisaplin*® na amplitude do halo de inibição. As concentrações de *Nisaplin*® testadas foram de 0,1g; 0,5g; 1,0g e 1,5g. Os halos de inibição obtidos foram de 0,105 cm; 0,116 cm; 0,126 cm e 0,177cm, respectivamente. A medida do halo de inibição forneceu uma estimativa do potencial antimicrobiano da bacteriocina testada em AU por mL (unidades arbitrárias por mililitros). Portanto, o composto *Nisaplin*® pode ser utilizado como um antimicrobiano para a biopreservação de alimentos.

Palavras-chave: nisina, atividade antimicrobiana, *Lactobacillus sakei*.

Apoio financeiro: Capes

ANEXO 3

Artigo publicado

FARINHA, L.R.L., SABO, S.S., PORTO, M.C.W., SOUZA, E.C., OLIVEIRA, M.N., OLIVEIRA, R.P.S. Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. Vol. 43, 2015. DOI: 10.3303/CET1543053.

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

VOL. 43, 2015

A publication of AIDIC
The Italian Association of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cet

Chief Editors: Sauro Pierucci, Jiří J. Klemeš
Copyright © 2015, AIDIC Servizi S.r.l.,
ISBN 978-88-95608-34-1; **ISSN** 2283-9216

Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*

Luiz R. L. Farinha, Sabrina S. Sabo, Maria C. Porto, Ellen C. Souza, Maricê N. Oliveira, Ricardo P. S. Oliveira

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Brazil
rpsolive@usp.br

Prebiotic ingredients are increasingly added to food preparations containing probiotics in order to enhance probiotic survival and growth. Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* (nisin) have great advantages as a food additive, such as heat stability, nontoxicity and sensitivity to digestive proteases. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of prebiotic ingredients on the fermentation kinetics and antimicrobial activity by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 against *Lactobacillus sakei*. *Lc. lactis* was cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented with or without (control) fructooligosacharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). All cultivations were carried out in shaken flasks at 30 °C with agitation speed of 100 rpm. Samples were collected for analyses (biomass, specific growth rate, generation time and antimicrobial activity) every two hours during the 48 h of cultivation. The exponential growth phase of *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 occurred at intervals of 2-8 h for all runs (MRS, MRS+FOS, MRS+PD e MRS+IN). The use of all prebiotic ingredients increased cell biomass, specific growth rate and consequently decreased generation time when compared with control (only MRS). Antimicrobial activity of nisin produced by *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 was detected against *Lactobacillus sakei* strain.

1. Introduction

Recently, the influence of prebiotic ingredients over the cellular growth of lactic acid bacteria (LAB) has sparked an increased interest due to their properties as a functional food and their beneficial effects to the health and well-being of those ingesting them.

Functional dairy products contain probiotic microorganisms belonging to the *Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus* and *Saccharomyces* genera. These products have been historically defined as food containing live microorganisms that improve the host's health through the improvement of the microbiotic balance in the human intestinal tract (Tamine, Saarela, Sondergaard, Mistry & Shad, 2005). By definition, probiotics, including some species of *Lactococcus*, are known as living microorganisms which, when used in adequate quantities, provide benefits to the host's health due to being capable of surviving the trip through the upper digestive tract, adhering to intestinal cells and contributing to intestinal balance (FAO/WHO, 2002; Martinez et al., 2013).

Prebiotics are non-digestible hydrocarbons that, through an absorption process, resist hydrolysis in the upper gastrointestinal tract of humans (Mattila-Sandholm et al., 2002; Apolinário et al., 2014). When consumed in adequate amounts, these ingredients reach the colon still intact and improve the modulation and composition of the intestinal microbiota, providing benefits to the host's health and, therefore, of the users (Saad et al., 2013; Roberfroid, 2007; Roberfroid et al., 2010).

Rastall (2010) studied the applications and the industrialization of prebiotics and reported that, although several hydrocarbons are marketed as prebiotics throughout the world, the most prominent ones are the

inulin, the fructooligosacharides (FOS) and the galactooligosacharides (GOS). Those are, therefore, the most widely studied hydrocarbons in human clinical tests.
Previous studies have assessed the influence of several prebiotics in the growth and acidification of pure probiotic cultures and co-cultures in skimmed fermented milk. These studies reported that the addition of inulin significantly reduces the fermentation time and increases the viability of probiotic bacteria (Oliveira et al., 2011).
In order to achieve a better understanding of the functional activity of prebiotics over probiotic bacteria, it is necessary to develop better symbiotic preparations. The success in the establishment of the necessary symbiotic condition is closely related to the compatibility between the chosen components, that is to say, between the prebiotic ingredients and the probiotic bacteria (Mei et al., 2011; Pranckute et al., 2014, Muñoz et al., 2012). The authors suggest that strains of *Lactobacillus* sp. and *Lactococcus* sp. may be useful as probiotic bacteria when used together with prebiotics (palatinose, inulin and α-cyclodextrin) so as to create a symbiotic development, which could control not only the grown of beneficial bacteria in the gastrointestinal tract, but also their antibacterial activity.
Under the light of this information, this study aims at assessing the influence of several prebiotic ingredients FOS, polydextrose and inulin over the cellular growth of the *Lactococcus lactis* CECT 4434 bacterial strain and evaluate the growth kinetics parameters (μ_{max} e t_g) when cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented or not (control) with fructooligossacharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). The antimicrobial capacity of the bacteriocin produced by *Lc. lactis* was also evaluation in contrast to the bioindicator strain *Lactobacillus sakei.*

2. Material and methodology

2.1 Microbial culture and growth medium

The strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434, obtained from the Spanish Cultivation Collection (CECT), was cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented or not (control) with fructooligosacharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). The MRS growth medium contains 20 g/L of polydextrose. For the formulation of the MRS+FOS, MRS+PD and MRS+IN, the dextrose polysacharide was substituted respectively by 20 g/L of fructooligosacharides, polydextrose and inulin.

2.2 Inoculum preparation and cultivation conditions

The inoculum was prepared with the addition of 100 µL of the stock culture in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of MRS supplemented with one of the hydrocarbons. The flasks were then incubated in a shaker at 100 rpm and 30°C until a cellular concentration of 0.8 – 0.9 D.O. units at 600 nm.
The cultivation of *Lc. lactis* CECT 4434 was conducted with the addition of 10% (v/v) of the inoculum in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of MRS supplemented individually with the prebiotic ingredient under analysis. The flasks were then incubated at a shaker at 100 rpm and 30°C for 48 hours. Samples were collected every 2 hours for a period of 12 hours and then at intervals of 12 hours, with a total cultivation time of 48 hours.

2.3 Analysis Procedures

In the monitoring process of the cellular growth, the relationship between D.O. (600 nm) and dry mass (mL) was observed after filtration of the growth medium through a 0.22 µm membrane (Millipore). Through this relationship, a calibration curve was obtained, represented by the following equation (1)

$$y = 2.0076 * x + 0.00182 \quad (1)$$

2.4 Growth Kinetics

The growth kinetics for *Lc. lactis* CECT 4434 was investigated during the fermentation, both in the absence of prebiotics (control) and in their presence. The maximum specific speed for the growth (μ_{max}) was calculated during the exponential growth phase through the following equation (2).

$$\mu max = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (2)$$

with X_2 and X_1 representing respectively the dry mass values, in (g/L), at t_1 and t_2.

The generation time was determined through equation (3).

$$t_g = \ln 2 / \mu max \quad (3)$$

2.5 Determination of antimicrobial activity

For detection of bacteriocin activity, samples were centrifuged at 16,000 *g* at 4 °C for 10 minutes. The pH of the supernatant was neutralized to 6.0 – 6.5 using 1 M NaOH in order to eliminate the action of organic acids. In addition, the supernatant was submitted to 80 °C for 10 minutes to eliminate possible proteases. After treatment of the supernatant, it was tested against the strains *L. sakei* ATCC 15521 to evaluate its antimicrobial activity. This test was performed by the agar diffusion assay, in which 10 µL of the indicator strain were transferred to a Petri dish containing 15 mL of MRS agar (Difco, Detroit, MI, USA). Once solidified, 10 µL of supernatant were pipetted on the agar surface. The plates were incubated at 30 °C for 18 to 24 hours and after this period it was possible to observe zones of inhibition.

3. Results and discussion

In the monitoring process of the cellular growth, the relationship between D.O. (600 nm) and dry mass (mL) was observed after filtration of the growth medium through a 0.22 µm membrane (Millipore).
The results shown at Figure 1 enable a comparison between the cellular growth curves of *Lc. lactis* CECT 4434, cultivated in MRS medium supplemented or not (control) with fructooligosacharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN).
Upon analyzing the growth curves regarding the cellular concentration, a behavior similar may be observed in terms of *Lc. lactis* CECT 4434 biomass formation for MRS (control), (MRS+FOS) and (MRS+PD) growth media, with values obtained at the tenth hour respectively of 0.94, 0.88 and 0.86 (g/L). On the other hand, under a prebiotic supplement, such as with (MRS+FOS) and (MRS+PD), there was an increase on the formation of biomass starting at 10 hours in contrast with MRS medium with no supplement.
It is evident that the cultivation of *Lc. lactis* CECT 4434 supplemented with inulin (MRS+IN) presented influence over the increase in the biomass production during the 48 hour cultivation. The cellular concentration values of *Lc. lactis* CECT 4434 with inulin as a supplement (MRS+IN) and with no supplement (control) were 1.48 and 0.98 (g/L) respectively.
These results highlight that the biomass production for *Lc. lactis* CECT 4434 is higher when supplemented with inulin, corresponding to the studies conducted by Oliveira *et al.* (2011), Oliveira *et al.* (2012) and Likotrafiti *et al.* (2014), which reported similar results regarding the capacity to increase the cellular count of probiotic microorganisms in cultivations supplemented with inulin.
In addition, in recent study, Kondepudi *et al.* (2012) demonstrated that prebiotic oligosaccharides, such as FOS and GOS may be used as a promising culture medium to optimize the production of probiotic *Bifidobacterium* species. We also observed an increase in the concentration of the *B. breve*, *B. lactis* and *B. longum* biomass, as well as of some BAL, for instance, the *Lactococcus lactis*. The latter showed antimicrobial activity against *Clostridium difficile*.
The effect of the FOS metabolism, extracted from corn silage and molasses, by *Lactobacillus* strains, in the production of bacteriocin, was investigated by Muñoz *et al.* (2012). In this study, it was confirmed that the different lactic acid bacteria LAB, for instance, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* were able to use the FOS determined by the count of viable cells (CFU) successfully. An increase in viable cells count of BAL in the MRS growing medium, supplemented with FOS, was verified, unlike MRS culture medium without supplementation (control), which had a lower score.
Makelainen *et al.* (2010) evaluated the ability of different prebiotics, such as FOS and xylooligosaccharides (XOS), as potential candidates for carbon source to probiotic bacteria of the genres *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, as well as their spectrum of action to possible intestinal microbe pathogens, such as *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus* in pure cultures. These authors could identify bifidobacteria that had preference for oligosaccharides, thus showing that the culture medium containing FOS and XOS, which have different degrees of polymerisation (DP) showed satisfactory fermentation, especially in strains of *B. lactis* and *B. adolescentis*, the *Lactobacillus*, in their turn, did not metabolize XOS efficiently. The same authors showed, in research published in 2010, that the FOS and GOS were fermented by a wide range of tested microorganisms, especially the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, denoting the non-selectivity of FOS in pure culture studies. The researchers emphasized that the FOS are not selective only to the genera considered beneficial, but also to other intestinal micro-organisms, such as *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, and *Eubacterium spp.*
Mei *et al.* (2011) attributed the growth of probiotic bacteria to the influence of the FOS, which is directly related to the composition of FOS, like the β(2→1) fructans of short chains, once these greatly support the growth of probiotic microorganisms, when compared to the longer-chained β(2→1) fructans. Therefore, the authors could confirm that all β(2→1) fructans with glycosidics links are bifidogenic.

316

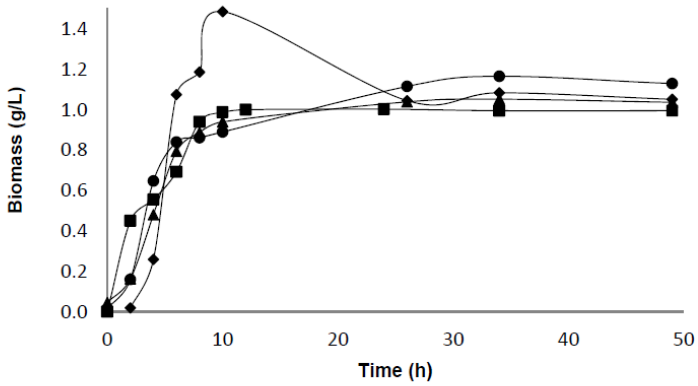

Figure 1. Comparison between the cellular growth curves for Lactococcus lactis subsp. lactis CECT 4434 in MRS medium (control: ■) supplemented with (20g/L) of polydextrose (MRS+PD: ●), (20g/L) of fructooligosacharides (MRS+FOS: ▲) and (20g/L) inulin (MRS+IN: ◆).

Upon observing the cellular concentration of *Lc. lactis* CECT 4434 cultivated in (MRS+IN) as a function of time, it is possible to observe a potential growth during the first 8 hours, reaching the peak biomass production at the eighth hour, with a dry mass value of 1.48 (g/L). Between 8 and 10 hours, the strain of *Lc. lactis* CECT 4434 presented a decrease in cellular production, reaching a dry mass value of 1.04 (g/L), and then presenting stability in cellular growth until 48 hours. These results are in accordance with a recent study conducted by Kassim *et al.* (2014) regarding the effect of chicory leaves, which contain inulin, as a growth medium for cultivating microorganisms from the *Lactococcus* and *Bifidobacterium* genera. The authors have identified a direct relation between the microorganisms' growth, especially those of the *Lactococcus* genus, in a growth medium containing inulin. Similar results have been reported by Oliveira *et al.* (2012), with inulin being among the best functional prebiotic ingredients for preparation of probiotic fermented milk, both for pure cultures and for binary co-cultures. In this study, the authors reported that the addition of inulin significantly reduced the time needed for fermentation, presenting higher biomass growth and an increase in the levels of diacetyl, acetone, lactic acid and acetic acid in both cultures (pure and/or co-culture).
Mei *et al.* (2011) have based themselves on different linear chain compositions of FOS and inulin so as to assess how those are used by different probiotic strains. Therefore, the authors used chicory and oat as a source for FOS and inulin, observing that the twelve probiotic strains tested, from the *Bifidobacterium, Lactobacillus* and *Pediococcus* genera, were capable of metabolizing FOS and inulin so as to optimize the biomass production of these strains.

3.1. Effect of the addition of different prebiotics in the cellular growth kinetics of *Lactococcus lactis subsp. lactis* CECT 4434.

The data for maximum specific speed for growth (μ_{max}) and the generation times (t_g) for *Lc. lactis* CECT 4434 in MRS medium supplemented or not with prebiotics.

Table 1. Values for maximum specific velocity for growth (μ_{max}) for Lactococcus lactis subsp. lactis and generation time (t_g) using MRS medium in the presence of polydextrose, fructooligosacharides and inulin.

Growth media*	Maximum specific speed for growth (μ_{max}) h^{-1}	t_g(h)
MRS	0.13±0.02[a]	2.66±0.08[d]
MRS + FOS	0.48±0.02[b]	1.42±0.04[c]
MRS + PD	0.94±0.03[c]	0.75±0.05[b]
MRS + IN	1.01±0.03[d]	0.68±0.06[c]

Values followed by the same letter in the same column are not different from each other, with probability of 5% by Tukey's test. *MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*); PD (poydextrose); FOS (fructooligosacharides) and IN (inulin)

It is possible to observe that the maximum specific speed for growth (μ_{max}) in MRS medium and no supplement (control) was 0.13 h^{-1}, i.e. the lowest value among the tests, while the growth media supplemented with 20g/L of fructooligosacharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN) presented μ_{max} values of 0.48, 0.94 and 1.01 h^{-1}, respectively. These results showed that the addition of prebiotic ingredients to the MRS medium in combination with the probiotic strain *Lc. lactis* CECT 4434, positively influenced the metabolism, not only increasing the biomass concentration, but also favoring higher values for growth specific speed, especially in the case of inulin. A similar result was observed by Oliveira *et al.* (2012), Sims et al. (2014) and Saad et al. (2013), who studied the symbiotic interaction of inulin as an stimulating factor for the growth of probiotic microorganisms.
Upon analyzing the generation time (t_g) for *Lc. lactis* CECT 4434 in a MRS medium supplemented or not (control) with polydextrose (MRS+PD), fructoligosacharides (MRS+FOS) and inulin (MRS+IN), it is possible to highlight that t_g is inversely proportional to a μ_{max}, that is to say, the lower the growth specific speed, the higher is the generation time for the microorganism in question. The strain of *Lc. lactis* CECT 4434 cultivated in MRS (control) multiplied every 2.65 h. On the other hand, in a MRS medium supplemented with inulin (MRS+IN), the strain multiplied every 0.68 h. These results indicate that the addition of prebiotics, specially polydextrose and inulin, reduced the generation time for the probiotic strain in contrast to the control.

3.2. Bacteriocin antimicrobial activity

Upon testing the antimicrobial activity of the supernatant obtained by treating the growth medium for *Lc. lactis* CECT 4434 in comparison with *L. sakei* ATCC 15521, a formation of inhibition zones which varied as a function of time was observed. The production of bacteriocin begins within 6 hours of cultivation, generating halos of 12.55 mm in diameter (average value obtained in MRS medium). This phase of the cultivation includes the exponential phase for the strain *Lc. lactis* CECT 4434. After 10 hours, the inhibition zones diameter increase to 15.55 mm, but decrease to 14.85 mm at 16 hours, probably due to a peptidic instability caused by the organic acids produced by the strain in question. The values obtained with the addition of prebiotics to MRS medium were on average 12% lower compared to the control (without supplementation). Gomes *et al.* (2012) observed a reduction of bacteriocin activity by approximately 50% and 62% when the inulin and oligofructose were added to MRS medium. On the other hand, Chen et al. (2007) reported that the addition of FOS and trehalose increased the bacteriocin production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C101910.

4. Conclusion

The different prebiotic ingredients used as a growth medium for *Lc. lactis* CECT 4434 presented a positive influence over the growth of microbial biomass. With the fermentation process, it was possible to observe that the prebiotic ingredients foster cellular growth of *Lc. lactis* CECT 4434.
On the different tests conducted, it is possible to observe that the prebiotic ingredients, especially inulin, provided an increase in the maximum specific speed for growth (μ_{max}) and generation time (t_g).
Furthermore, the antimicrobial activity of *Lc. Lactis* CECT 4434 in supplemented cultivations with prebiotic fibers, in contrast with the strain *L. sakei* ATCC 15521, shows promise as food products may be created based on this symbiosis, which may be of commercial interest due to not having chemical preservatives, with the bacteriocin playing that role.

Acknowledgments

We are grateful to São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant 2013/12713-1), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support.

References

Apolinário, A. C., Damasceno, B. P. G. L., Beltrão, N. E. M., Pessoa Jr, A., Converti, A., Silva, J. A., 2014, Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology, Carbohydrate Polymers, 101, 368-378.

Chen, Y.-S., Srionnual, S., Onda, T., Yanagida, F., 2007, Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria, Letters in Applied Microbiology, 45, 190–193.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), 2002, Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.> accessed 04.11.2014.

Gomes, B. C., Rodrigues, M. R., Winkelströter, L. K., Nomizo, A., Martinis, E. C. P., 2012. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1, Journal of Food Protection, 75, 1083-1089.

Kassim, M. A., Baijnath, H., Odhav, B., 2014, Effect of traditional leafy vegetables on the growth of lactobacilli and bifidobacteria, International Journal of Food Science Nutrition, 1-4.

Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Nilsson, I., Wadstrom, W., Ljungh, A., 2012, Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*, Anaerobe, 18, 489-497.

Likotrafiti, E., Tuohy, K. M., Gibson, G, R., Rastall, R. A., 2014, An in vitro study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly fecal microbiota, Anaerobe, 27, 50-55.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Converti, A., Oliveira, R. P. S., 2013, Lactic acid properties, applications and production: A review, Trends in Food Science & Technology, 30, 70-83.

Makelainen, H., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A. C., 2010, Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures, Beneficial Microbes, 1, 139-148.

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogenser, G., Fondén, R., & Saarela, M., 2002, Technological challenges for future probiotic foods, International Dairy Journal, 12, 173-182.

Mei, G. Y., Carey, C. M., Tosh, Tosh, S., Kostrzynska, M., 2011, Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics, Canadian, Journal Microbiology, 57, 857-865.

Muñoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. P., Sánchez, O. F., 2012, Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses, Anaerobe, 18, 321-330.

Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A., 2011, Growth and survival of mixed probiotics in nonfat fermented milk: the effect of inulin. Chemical Engineering Transactions, 24, 457-462.

Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A., 2012, Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect, Food Research International, 48, 21–27.

Pranckute, R., Kaunietis, A., Kuisiene, N., Citavicius, D., 2014, Development of synbiotics with inulin, palatinose, α-cyclodextrin and probiotics bacteria, Polish Journal of Microbiology, 63, 33-41.

Rastall, R. A., 2010, Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture, Food Science Technology, 1, 305-339.

Roberfroid, M., 2007, Prebiotics: the concept revisited, Journal of Nutrition, 137, 830-837.

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., Mccarney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., 2010, Prebiotic effects: metabolic and health benefits, British Journal of Nutrition, 104 (Suppl. 2), S1-63.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressolier, P., 2013, An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, LWT – Food Science and Technology, 50, 1-16.

Sims, I. M., Ryan, J. L. J., Kim, S. H., 2014, In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus spp*, Anaerobe, 25, 11-17.

Tamime, A. Y., Saarela, M., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P., 2005, Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products, Ed. Tamine, A. Y., Probiotic dairy products, 39-72, Oxford, England.

ANEXO 4

Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8816623/1 - Luiz Rogério Ludwig Farinha

Email:	ludwigfarinha@usp.br
Data de Nascimento:	23/11/1975
Cédula de Identidade:	RG - 217321288 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Engenheiro Agrônomo - Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil - 2000
Mestrado:	Magister Scientiae (1) - Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais - Brasil - 2008

Curso:	Doutorado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	26/09/2013
Início da Contagem de Prazo:	26/09/2013
Data Limite para o Depósito:	26/09/2017
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Adalberto Pessoa Junior - 26/09/2013 até 21/01/2014. Email: pessoajr@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Adalberto Pessoa Junior - 22/01/2014 até 08/04/2014. Email: pessoajr@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - 09/04/2014 até o presente. Email: rpsolive@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 26/09/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/11/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 26/09/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016
Impresso em: 11/05/2016 13:59:42

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8816623/1 - Luiz Rogério Ludwig Farinha

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5776-4/9	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	07/10/2013	20/10/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/8	Aprimoramento Didático	15/10/2013	11/11/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5768-4/3	Princípios de Fermentação Contínua	07/02/2014	13/03/2014	75	5	100	A	N	Concluída
FBT5787-1/3	Aplicação Biotecnológica de Bactérias Láticas	04/03/2014	07/04/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5706-3/1	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	10/03/2014	11/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0535 - Biotecnologia Farmacêutica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/07/2014	30/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBT5773-7/5	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	02/03/2015	10/05/2015	30	2	75	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 1418, de 23.12.1998..

2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 03/03/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2016
Impresso em: 11/05/2016 13:59:42

ANEXO 5

Autorização de dispensa do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Av. Prof. Lineu Prestes, n° 580, B.16
05508-000- Cidade Universitária- São Paulo/SP
Tel: 00 55 11 3091 0508
Fax: 55 11 3815 6386

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE AUTORIZAÇÂO DE COMITÊ DE ÉTICA

São Paulo, 19 de maio de 2016

Eu, Luiz Rogério Ludwig Farinha N° USP 8816623, aluno do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica na área de Tecnologia das fermentações, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, venho pelo presente, afirmar que o projeto de pesquisa intitulado como “Efeito da composição de bactérias láticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina, dispensa a autorização pelo Comitê de Ética visto que não serão envolvidos animais ou seres humanos para a realização dos experimentos.

Ass. Aluno: Ass. Orientador:

ANEXO 6

Informações para os membros de bancas julgadoras de mestrado/doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br