

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Interações entre bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e a
microbiota autóctone de charque

Vanessa Bíscola

VERSÃO CORRIGIDA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

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

B621i	Bíscola, Vanessa Interações entre bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e a microbiota autóctone de charque / Vanessa Bíscola. – São Paulo, 2011. 75p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Orientador : Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo
	1. Microbiologia de alimentos 2. Carne : Preservação : Tecnologia de alimentos I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.
	664.07 CDD

Vanessa Biscola

Interações entre bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e a
microbiota autóctone de charque

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 14 de outubro de 2011.

A Deus, pelo dom da vida e presença constante.

Aos meus pais, Fátima Regina e Antonio, por todo apoio, compreensão e amor. Por terem acreditado sempre, tornando este momento possível.

À minha irmã, Cintia, por ser parte da minha vida e estar sempre ao meu lado.

A Dra. Hikmate Abriouel, no sólo por compartir sus conocimientos científicos, sino también por enseñarme lecciones para toda la vida.

À Prof^a Titular Bernadette Dora Gombossy de Melo
Franco, a quem passei a admirar não apenas pelo
grande conhecimento e competência profissional,
mas também pela sincera grandeza de caráter.

Agradecimentos

À Prof^ª Dr^ª Bernadette D.G.M. Franco, pela amizade, orientação, paciência, apoio e oportunidade de aprendizado.

Al prof Dr. Antonio Gálvez Del Postigo Ruiz, por la recepción amable y por la gran oportunidad del crecimiento profesional.

Al Dr. Nabil Ben Omar, por su estímulo y amistad.

A Dra. Elena Ortega Morente, a Dra. Magdalena Martínez Cañamero y a Dra. Rosario Lucas López, por el apoyo y por la agradable convivencia.

Às Prof^ª Dr^ª Mariza Landgraf e Prof^ª Dr^ª Maria Teresa Destro pelo apoio e convívio.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Nero, pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

À Dr^ª Martha Villareal, pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

À Prof^ª. Dr^ª. Mariza Landgraf, pelas sugestões feitas no exame de qualificação.

À Verena Sant'Anna Cabral Capuano, pela amizade e por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos: Adriana, Ana Carolina, Anderson, Aline, Haissa, Isabela, Janaína, Maria Crystina, Maria Fernanda, Matheus, Patrícia, Priscila A., Priscila C., Rafael, Rita, Slavi e Vinicius, pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

Ao grande amigo, Adriano Andreghetto, por fazer parte da minha vida.

Às irmãs que a vida colocou no meu caminho Ana Eucares, Ângela, Cecília, Kátia Leani e Tatiana, por sempre terem estado ao meu lado.

Ao Amigo André Otuki, por todos os momentos de alegria, companheirismo e troca de conhecimentos.

Às companheiras de apê Érica e Patrícia, pelos ótimos momentos desfrutados nos últimos quatro anos.

A los compañeros de laboratorio y cerveza, Antonio Sánchez, Juanma, Leire, Marina, Miguel Ángel, Natacha, Rubén, Wendy y Zouzouni por toda la ayuda, amistad e intercambio de conocimientos, lo que siempre me hace querer volver pronto.

À auxiliar de laboratório Lucia, pelo convívio agradável e por sempre estar disposta a ajudar.

À Cleonice, à Essy e à Mônica da secretaria do departamento, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Ao Edílson, ao Jorge e à Elaine, da secretaria de Pós-Graduação, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

À empresa Kienast & Kratschmer Ltda., pela disponibilização da planta piloto para a elaboração das amostras de charque utilizadas neste trabalho.

À empresa Charque 500 Ltda., pela doação das amostras de charque utilizadas para o isolamento dos micro-organismos utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho de pesquisa.

SUMÁRIO

	pg.
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Charque.....	1
1.2 Fermentação de produtos cárneos.....	2
1.3 Bioconservação de produtos cárneos.....	4
1.3.1 Bacteriocinas da classe I.....	7
1.3.1.1 Nisina.....	7
1.3.2 Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos...	13
1.4 Ecologia microbiana em productos cárneos fermentados.....	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Amostras de charque.....	20
3.2 Obtenção dos micro-organismos utilizados neste estudo.....	20

3.2.1 Isolamento de bactérias halotolerantes a partir de charque.....	20
3.2.2 Identificação das bactérias halotolerantes isoladas do charque.....	21
3.2.3 Isolamento das bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas a partir de charque.....	23
3.3 Seleção dos isolados com atividade bacteriocinogênica.....	23
3.3.1 Confirmação da atividade antimicrobiana.....	24
3.3.2 Sensibilidade das substâncias inibidoras produzidas a tratamento com enzimas proteolíticas, pH, agentes químicos e calor.....	24
3.3.3 Espectro de atividade.....	25
3.3.4 Multiplicação e sobrevivência do isolado 69 em diferentes concentrações de NaCl.....	26
3.3.5 Produção e atividade de bacteriocinas em meio líquido MRS contendo concentração de NaCl similar a do charque (20%).....	26
3.4 Identificação da cepa bacteriocinogênica isolada (isolado 69).....	27
3.5 Investigação da presença de genes codificadores para bacteriocinas produzidas por <i>L. lactis</i> no isolado 69.....	28
3.6 Avaliação do potencial bioconservante da cepa bacteriocinogênica (isolado 69) no charque modelo.....	30
3.6.1 Preparo dos cultivos de bactérias halotolerantes para inoculação no charque modelo.....	30
3.6.2 Preparo do charque modelo.....	30
3.6.3 Avaliação microbiológica.....	32
3.6.3.1 Enumeração de bactérias halotolerantes.....	33

3.6.3.2 Enumeração de bactérias lácticas.....	33
3.6.4 Análise estatística.....	33
3.7 Avaliação da ecologia microbiana do charque modelo.....	34
3.7.1 Isolamento dos micro-organismos presentes no charque modelo nas diferentes etapas de sua produção.....	34
3.7.2 Extração do DNA.....	34
3.7.3 Amplificação da região hipervariável V3 da porção 16S de rDNA.....	35
3.7.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Identificação das bactérias halotolerantes isoladas a partir de charque.....	38
4.2 Obtenção e caracterização da cepa bacteriocinogênica a ser aplicada ao charque modelo.....	41
4.3 Identificação da cepa bacteriocinogênica isolada.....	51
4.4 Investigação da presença de genes codificadores para bacteriocinas produzidas por <i>L. Lactis</i> no isolado 69.....	53
4.5 Avaliação do potencial bioconservante da cepa bacteriocinogênica no charque modelo.....	56
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

		pg.
Figura 1.	Estrutura primária das variantes naturais de nisina: A, Z, Q e U.....	9
Figura 2.	Modelo de formação de poros na membrana, mediada por interações com o lipídeo II, proposto por Chatterjee <i>et al.</i> (2005).....	11
Figura 3.	Fluxograma de processamento do charque modelo, adaptado de Torres <i>et al.</i> (1994).....	31
Figura 4.	Eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) dos fragmentos de DNA das cepas medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes, isoladas de charque, amplificadas na PCR-multiplex com os <i>primers</i> tag765/Tstag422, Sap1/Sap2, XylF/XylR e Sa422-1/Sa422-2.....	40
Figura 5.	Representação gráfica da curva de multiplicação do isolado 69 a 30°C em caldo MRS contendo 0%, 3% e 5% de NaCl.....	50
Figura 6.	Representação gráfica da curva de multiplicação do isolado 69 a 30°C em caldo MRS contendo 10%, 15% e 20% de NaCl.....	50
Figura 7.	Sequência completa de nucleotídeos da porção 16S de rDNA da cepa <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69.....	52
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) dos fragmentos de DNA da cepa <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69 amplificadas com os <i>primers</i> sub-espécie-específicos gadB21 e GAD7.....	52
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos de DNA da cepa <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69 amplificadas com <i>primers</i> para o gene codificador de nisina.....	53
Figura 10.	Média das populações de bactérias medianamente halotolerantes encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias.....	57
Figura 11.	Média das populações de bactérias altamente halotolerantes encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias.....	57
Figura 12.	Média das populações de bactérias lácticas encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias. Letras minúsculas distintas, para um mesmo ponto de análise, indicam diferença estatística entre as contagens observadas ($p \leq 0,05$).....	60

Figura 13. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (poliacrilamida 0,8% p/v) dos amplicons da região V3 de 16S rDNA da microbiota presente em amostras de charque modelo fermentado de maneira natural ou com adição de cultura bacteriocinogênica..... **63**

LISTA DE TABELAS

		pg.
Tabela 1.	Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos, adaptado de Cleveland <i>et al.</i> (2001).....	5
Tabela 2.	Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos, adaptado de Castellano <i>et al.</i> (2008).....	14
Tabela 3.	Potencial de aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos, adaptado de Gálvez <i>et al.</i> (2008).....	15
Tabela 4.	<i>Primers</i> utilizados na PCR-multiplex para confirmação da identificação das cepas halotolerantes.....	22
Tabela 5.	<i>Primers</i> empregados na pesquisa de genes codificadores de lactocinas e outras bacteriocinas produzidas por <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> no isolado 69.....	29
Tabela 6.	Identificação, através de sequenciamento da porção 16S de rDNA, dos micro-organismos medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes isolados de charque	38
Tabela 7.	Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC das bactérias lácticas isoladas de charque à pepsina e à protease.....	42
Tabela 8.	Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC das bactérias lácticas isoladas de charque a diferentes valores de pH.....	42
Tabela 9.	Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC das bactérias lácticas isoladas de charque a agentes químicos.....	42
Tabela 10.	Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC das bactérias lácticas isoladas de charque ao tratamento térmico a 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100°C.....	44
Tabela 11.	Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC dos isolados 69 e 94 contra bactérias halotolerantes isoladas de charque.....	46
Tabela 12.	Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC dos isolados 69 e 94 contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de importância em alimentos.....	48
Tabela 13.	Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC dos isolados 69 e 94 contra bactérias lácticas isoladas de alimentos.....	49

Tabela 14.	Comparação das sequências de nucleotídeos obtidas para o gene codificador de nisina presente nas cepas <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MS27, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> K213 e <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> M78.....	54
Tabela 15.	Comparação da cadeia de aminoácidos obtida após a transcrição da sequência de nucleotídeos do gene codificador de nisina presente na cepa <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69 com as cadeias de aminoácidos descritas para as nisinas produzidas pelas cepas <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MS27, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> K213 e <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> M78.....	55

Resumo

O charque é um produto cárneo tipicamente brasileiro, salgado e seco ao sol, ainda produzido de maneira artesanal. Durante sua produção há uma etapa de fermentação, realizada pela microbiota naturalmente presente na matéria-prima, o que dificulta a padronização do produto, e pode influenciar negativamente em suas características sensoriais e qualidade microbiológica. O controle da etapa de fermentação do charque seria uma alternativa para minimizar este problema e, neste contexto, as bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas se enquadram de forma interessante. A microbiota autóctone de charque inclui principalmente bactérias lácticas e micro-organismos halofílicos e halotolerantes, sendo assim, este produto apresenta potencial como fonte para o isolamento de novas bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas. Assim, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar culturas de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas naturalmente presentes no charque, caracterizar parcialmente as bacteriocinas produzidas por essas culturas, avaliar seu potencial de aplicação neste produto para a melhoria de sua qualidade microbiológica e avaliar seu efeito na ecologia microbiana do charque, nas diferentes etapas de sua fabricação. Através da técnica de tripla camada em ágar foi isolada uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* apresentando o gene codificador para nisina Z e com capacidade de inibir, *in vitro*, micro-organismos medianamente e altamente halotolerantes isolados de charque, além de outros micro-organismos deteriorantes e patogênicos importantes em alimentos, como *Lactobacillus* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. A bacteriocina produzida pela cepa isolada neste estudo também possui características interessantes para sua aplicação na bioconservação de alimentos, como resistência ao calor, presença de agente químicos e altos teores de NaCl, além de não ser afetada pelo pH. A aplicação dessa cepa em charque modelo resultou na redução de até 2 ciclos log na população de micro-organismos halotolerantes, indicando apresentar um potencial de aplicação como agente de bioconservação do produto. Os ensaios de avaliação da ecologia microbiana, empregando DGGE, indicaram que a fermentação natural do charque ocorreu com a participação de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e de micro-organismos halotolerantes do gênero *Staphylococcus*. Além disso, os estudos referentes à dinâmica populacional demonstraram que a adição da cepa bacteriocinogênica ao charque não influenciou, de forma qualitativa, as populações presentes no produto.

Palavras-chave: charque; bioconservação; bactérias lácticas; bacteriocinas; 16S rDNA; DGGE.

Abstract

Charqui is a Brazilian traditional meat product, salted and sun-dried, still manufactured without control of the fermentation step, which is performed by the indigenous microbiota. This fact interferes on the standardization of the product and can negatively affect the sensorial properties and microbiological quality. The application of a known microbiota would be an alternative to minimize this problem and the bacteriocin-producing lactic acid bacteria can fit in this purpose. The charqui indigenous microbiota mainly includes lactic acid bacteria and halophilic and halotolerant microorganisms, therefore, this product presents a potential as a source for the isolation of new bacteriocin-producing lactic acid bacteria. The aim of the present work was to isolate and identify bacteriocin-producing lactic acid bacteria from charqui, characterize the bacteriocins produced by the isolated culture, evaluate its potential as biopreservative in charqui and its influence on the microbial populations during the manufacture of the product. A bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain was isolated from charqui through the triple-layer agar technique. This strain produces a nisin-like bacteriocin capable to inhibit *in vitro* medium and highly halotolerant bacteria isolated from charqui and other food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. The application of this strain for charqui manufacturing caused a reduction of up to 2 log in the halotolerant bacteria population, evidencing its potential application for charqui biopreservation. Studies in the populational dynamics using DGGE indicated that the presence of the bacteriocinogenic strain did not affect the microbial populations in the product.

Keywords: charqui, biopreservation; lactic acid bacteria, bacteriocins, 16S rDNA; DGGE.

1. Introdução

1.1 Charque

Os produtos cárneos são excelentes substratos para o desenvolvimento de micro-organismos, devido a uma série de fatores favoráveis, como pH pouco ácido, alta atividade de água e disponibilidade de nutrientes. A mistura de diferentes tipos de ingredientes e intenso manuseio aumentam a probabilidade de contaminação com micro-organismos indesejáveis (Samelis *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2008; Argiry *et al.*, 2010). Para minimizar a multiplicação desses micro-organismos nos alimentos, pode-se aplicar a tecnologia dos obstáculos descrita por Leistner (2000), que se baseia na utilização simultânea de mais de uma forma de controle microbiano nos alimentos, como salga, acidificação e processamento térmico, para a obtenção de produtos estáveis à temperatura ambiente, com longa vida útil e seguros à saúde dos consumidores (Shimokomaki *et al.*, 2006). A utilização de múltiplos fatores antimicrobianos diminui a probabilidade de multiplicação dos micro-organismos devido ao aumento do gasto energético que leva à morte (Jofré *et al.*, 2008). Um bom exemplo de produto cárneo produzido utilizando-se a tecnologia dos obstáculos é o charque.

O charque é um produto cárneo, salgado e seco ao sol, tipicamente brasileiro. Uma variação deste produto é o *jerked beef* que, além de seco e salgado, é adicionado de nitrito de sódio e embalado a vácuo (Torres *et al.*, 1994; Shimokomaki *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2002; Youssef *et al.*, 2003). As etapas de produção de charque incluem desossa, salga úmida, salga seca, tombos, lavagem e secagem ao sol. Todo o processo dura aproximadamente 15 dias, dependendo das condições climáticas (Torres *et al.*, 1994). Segundo a legislação brasileira, o charque deve conter entre 40-50% de umidade e 10-20% de sal na porção intramuscular (Brasil, 1997) e seu valor final de atividade de água deve estar em torno de 0,70-0,75 (Torres *et al.*, 1994; Shimokomaki *et al.*, 1998). Já o *jerked beef* deve conter 55% de umidade, 50 ppm de nitrito de sódio, 18% de sal e valor final de atividade de água de 0,78 e ser embalado a vácuo (Brasil, 2000). O valor final de atividade de água encontrado no charque caracteriza-o como um produto cárneo com umidade intermediária, que se mantém microbiologicamente estável por longos períodos (aproximadamente seis meses) sem a necessidade de conservação sob refrigeração (Garcia *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 2007). Nessas condições, os micro-

organismos deteriorantes e também importantes patógenos como *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* são inibidos (Lara *et al.*, 2003).

Embora a secagem e salga da carne sejam tecnologias aplicadas milenarmente para a conservação deste alimento, o charque ainda é produzido de maneira artesanal, o que pode comprometer a qualidade microbiológica, além de dificultar a padronização do produto final. As altas concentrações de sal do charque podem favorecer a multiplicação de halobactérias que, em alguns casos, provocam deterioração do produto acarretando prejuízos aos fabricantes. Algumas espécies de halobactérias, como *Halobacterium cutirubrum*, produzem um pigmento de coloração vermelha, causando a deterioração conhecida popularmente como “vermelhão”, caracterizada pela alteração de odor e aparecimento de limosidade e manchas vermelhas na superfície do produto.

Durante a produção de charque ocorrem modificações na composição da microbiota, sendo que no produto final observa-se o predomínio de bactérias halofílicas e halotolerantes, principalmente as fermentadoras como *Staphylococcus xylosus* (Shimokomaki *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2002). Em estudos realizados por Shimokomaki *et al.* (1998), observou-se que a microbiota presente em amostras de *jerked beef* ao final do processamento apresentou-se bastante semelhante àquela encontrada em produtos cárneos fermentados produzidos na Europa, corroborando com a idéia de que ocorre uma etapa de fermentação durante a produção deste produto. A descoberta da ocorrência de fermentação na carne durante o processamento do charque trouxe consequências para a indústria processadora, tornando possível propor mudanças na tecnologia de produção, controlando-se esta etapa, com o objetivo de melhorar e padronizar a qualidade do produto (Pinto *et al.*, 2002).

1.2 Fermentação de produtos cárneos

A fermentação constitui o mais antigo método de conservação de alimentos e bebidas por longos períodos. Alimentos fermentados fazem parte da dieta regular da população mundial e são inúmeros os exemplos de produtos fermentados preparados empregando-se bactérias lácticas como culturas iniciadoras (*starter cultures*), incluindo produtos cárneos como charque, linguiças, salames e outros embutidos, que apresentam variações na matéria-prima, formulação e processo de fabricação de acordo com os costumes e hábitos de diferentes países e regiões. Quando estes

produtos são fabricados de maneira artesanal, a fermentação é realizada pela microbiota naturalmente presente na carne. Esses micro-organismos têm origem no abate e no ambiente de fabricação, e suas populações podem aumentar durante o processamento (Talon *et al.*, 2007).

Os principais micro-organismos responsáveis pela fermentação de produtos cárneos enquadram-se em dois grupos: as bactérias lácticas, particularmente *Lactobacillus* spp. com destaque para *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei* e os cocos Gram-positivos coagulase-negativa, especialmente *Staphylococcus* e *Kocuria* spp. também com destaque para *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* (Aymerich *et al.*, 2003; Papamanoli *et al.*, 2003; Rantsiou *et al.*, 2005, Talon *et al.*, 2007). Nos processos fermentativos as bactérias lácticas são responsáveis pela produção de ácido láctico, contribuem para o sabor característico e ainda podem produzir compostos antimicrobianos como as bacteriocinas (Deegan *et al.*, 2006; Najjari *et al.*, 2008). Já os cocos Gram-positivos coagulase-negativa contribuem para o aparecimento e estabilidade da coloração vermelha através da atuação da nitrato redutase com formação de nitrosomioglobina. Além disso, a redução do nitrato a nitrito por estas bactérias contribui para a diminuição na oxidação lipídica (Rantsiou *et al.*, 2005).

A etapa de fermentação nos produtos cárneos é aquela em que ocorre a maior parte das modificações bioquímicas e físico-químicas que determinam as características sensoriais do produto final, principalmente nos atributos de textura e sabor (Hu *et al.*, 2007). Alguns eventos que ocorrem durante o processamento, como lipólise, proteólise e oxidação lipídica, são bastante influenciados pela microbiota presente durante o processo (Shimokomaki *et al.*, 1998; Ammor e Mayo, 2007; Fontán *et al.*, 2007). Lizaso *et al.* (1999) observaram que as altas contagens de bactérias lácticas e *Micrococcus*, presentes durante a fermentação de *salsichón*, foram responsáveis pelo aumento nos níveis de aminoácidos livres e no índice de peróxido, além da diminuição na solubilidade protéica e na porcentagem de ácidos graxos polinsaturados livres. Já Comi *et al.* (2005) caracterizaram a microbiota presente em linguiças fermentadas naturalmente produzidas na Itália e encontraram altas contagens de bactérias lácticas, *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Entre as bactérias lácticas isoladas, observou-se predominância de *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei*. Foi encontrado também elevado número de *Enterococcus faecalis* que, segundo os autores, podem desempenhar importante papel na definição de algumas características sensoriais do produto final. Aymerich *et al.* (2003) também avaliaram a microbiota presente em linguiças fermentadas produzidas artesanalmente e encontraram predominância de

Lactobacillus curvatus, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* e *Enterococcus faecium*. A participação de diferentes micro-organismos nos processos de fermentação origina produtos com características sensoriais distintas. Desta forma, o conhecimento e o controle da microbiota presente na matéria-prima e durante o processamento são essenciais para a garantia da qualidade microbiológica e padronização das características sensoriais do produto final (Aymerich *et al.*, 2003; Rantsiou *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2010).

1.3 Bioconservação de produtos cárneos

A bioconservação é uma tecnologia que visa aumentar a vida útil e a inocuidade de alimentos através da utilização de micro-organismos ou de seus produtos metabólicos que possuam propriedades antimicrobianas, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, enzimas e bacteriocinas (Lücke, 2000; Greer e Dilts, 2006; Castellano *et al.*, 2008). O principal grupo de micro-organismos relacionado com bioconservação de produtos cárneos é o das bactérias lácticas, cuja atividade antimicrobiana pode ser atribuída, em parte, à produção de bacteriocinas (Greer e Dilts, 2006; Ouwenhand e Vesterlund, 2007). Como vantagem adicional, muitas bactérias lácticas são consideradas pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) como seguras para a aplicação em alimentos (GRAS – *Generally Recognised as Safe*) e os peptídeos antimicrobianos produzidos por elas são facilmente quebrados pelas proteases digestivas, não afetando a microbiota intestinal (Castellano *et al.*, 2008).

A aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas na fabricação de produtos cárneos fermentados também pode ser uma forma de controlar a microbiota presente durante a fermentação, inibindo a multiplicação de micro-organismos indesejáveis através de competição ou pela produção de agentes antimicrobianos. A adição de bactérias lácticas a produtos cárneos pode ser considerada um método de conservação natural, uma vez que estas bactérias fazem parte da microbiota autóctone na carne e constituem a microbiota predominante durante o armazenamento. Essas características são importantes quando se observa o comportamento atual dos consumidores que exigem produtos minimamente processados, com maior qualidade, conveniência, longa vida útil e sem conservadores sintéticos, o que constitui um grande desafio para a indústria de alimentos, fazendo-a buscar novos métodos que possam substituir a utilização

de agentes químicos (Devlieghere, *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005; Pranoto *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2008). Dessa forma, a aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas ou suas bacteriocinas apresenta-se como uma alternativa interessante para o controle de micro-organismos em alimentos.

Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas, sintetizadas ribossomicamente, que apresentam ação comprovada contra diversos micro-organismos (Gálvez *et al.*, 2008; Todorov, *et al.*, 2009). Vários autores têm pesquisado o potencial antimicrobiano das bacteriocinas em alimentos, demonstrando sua ação contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes em carne e produtos cárneos (Lisserre, *et al.*, 2002; Kruger, 2006; Bello *et al.*, 2010; Kouakou *et al.*, 2010).

As bacteriocinas diferem dos antibióticos principalmente quanto à síntese, ao espectro e modo de ação, à toxicidade e aos mecanismos de resistência (Deegan *et al.*, 2006, Todorov *et al.*, 2010), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos, adaptado de Cleveland *et al.* (2001).

Característica	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicação	Alimentos	Clínica
Síntese	Ribossômica	Metabólitos secundários
Atividade	Espectro limitado	Espectro mais amplo
Auto-imunidade	Sim	Não
Mecanismo de resistência	Normalmente adaptação afetando composição da membrana celular	Normalmente um determinante geneticamente transferível
Modo de ação principal	Formação de poros	Alvos específicos
Toxicidade / Efeitos colaterais	Não conhecidos	Sim

As bacteriocinas agem sobre as células sensíveis através da formação de poros na membrana celular, com a interferência na força próton motriz (FPM), no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e no gradiente de pH (ΔpH), resultando no efluxo dos constituintes celulares e privando a célula de sua fonte essencial de energia (Ammor e Mayo, 2007; Arauz *et al.*, 2009). A FPM controla a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos no interior das células, e com o seu colapso ocorre a paralisação de todas as reações que requerem energia, levando à morte celular. Essas alterações ocorrem em dois estágios. O primeiro consiste na adsorção da

bacteriocina à membrana celular, o que não provoca alterações permanentes à célula, uma vez que a adsorção é reversível. No segundo estágio, a bacteriocina penetra a membrana celular causando alterações letais irreversíveis à célula (Chatterjee *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009).

Bacteriocinas são moléculas carregadas positivamente, com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. As interações eletrostáticas com grupamentos fosfato negativamente carregados contribuem para a ligação inicial das bacteriocinas com a membrana das células sensíveis. Acredita-se que a porção hidrofóbica penetre na membrana formando poros (Chatterjee *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009). Porém, a atividade destes compostos está relacionada apenas a bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada externa composta por fosfolipídeos, proteínas e lipopolisacarídeos que é impermeável à maioria das moléculas e não admite o acesso de partículas com tamanho superior a 600Da (a menor bacteriocina conhecida possui 3 kDa). Entretanto, a presença de outros compostos que alteram a estrutura da membrana externa de micro-organismos Gram-negativos pode permitir a entrada de moléculas maiores, o que seria uma alternativa para a utilização de bacteriocinas no controle da multiplicação destas bactérias (Diep e Nes, 2002, Arauz *et al.*, 2009).

As bacteriocinas inibem a multiplicação de outras bactérias lácticas geneticamente relacionadas, mas não têm ação sobre si mesmas. As células produtoras destes peptídeos antimicrobianos tornam-se imunes às próprias bacteriocinas através da presença de uma proteína de imunidade específica para a bacteriocina por ela produzida (Nes e Holo, 2000; Arauz *et al.*, 2009; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009).

As diferentes bacteriocinas apresentam variações no espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (Deegan *et al.*, 2006; Castelano *et al.*, 2008). Segundo a classificação mais recente proposta por Heng *et al.* (2007), estes peptídeos podem ser divididos em 4 classes de acordo com a estrutura e modo de ação: peptídeos que contém lantionina (classe I); pequenos peptídeos (<10 kDa) não modificados (classe II); grandes proteínas, maiores que 10 kDa (classe III) e proteínas cíclicas (classe IV). Embora tenham sido primeiramente caracterizadas em bactérias Gram-negativas, como as colicinas produzidas por *Escherichia coli*, as bacteriocinas que apresentam interesse na utilização em alimentos são aquelas produzidas por bactérias lácticas (Cleveland *et al.*, 2001; Papagianni, 2003). Mais de 300

bacteriocinas diferentes já foram descritas para os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (Todorov, 2009).

1.3.1 Bacteriocinas da classe I

Também denominadas lantibióticos, as bacteriocinas da classe I são peptídeos pequenos (<5 kDa) caracterizados pela presença dos aminoácidos modificados lantionina e β -metil-lantionina (Guinane *et al.*, 2005). Os lantibióticos são sintetizados em duas etapas, sendo que na primeira são produzidos pré-peptídeos sem atividade, que na segunda fase sofrem uma transformação, tornando-se biologicamente ativos (Chatterjee *et al.*, 2005; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009). Dentro desta classe encontram-se as principais bacteriocinas produzidas pelo gênero *Lactococcus* (nisina, lacticina 3174, lacticina 481, lactococcina A, lactococcina B, lactococcina M, lactococcina G, lactococcina Q e lactococcina 972). Entre todas estas bacteriocinas apenas a nisina é atualmente aplicada na conservação de alimentos (Twomey *et al.*, 2002; Arauz *et al.*, 2009).

Embora a nisina seja atualmente o único lantibiótico utilizado comercialmente, esforços têm sido realizados no intuito de desenvolver aplicações para outras lactocinas, como a lacticina 3147 que apresenta atividade bactericida contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes, além de outras características favoráveis como resistência a altas temperaturas e diferentes valores de pH (Guinane *et al.*, 2005; Castelano *et al.*, 2008).

As bacteriocinas da classe I são divididas em três sub-grupos: peptídeos lineares (tipo A); peptídeos globulares (tipo B) e bacteriocinas multicomponentes (tipo C). O tipo A ainda sofre mais uma sub-divisão formando os sub-tipos AI (bacteriocinas *nisina-like*) e AII (bacteriocinas *SA-FF22-like*) (Heng *et al.*, 2007).

1.3.1.1 Nisina

A nisina é a bacteriocina da classe I mais conhecida. Trata-se de um polipeptídeo com atividade antimicrobiana, produzido por várias cepas de *Lactococcus lactis*. Foi descoberta em 1928 durante a observação de determinados metabólitos de uma espécie de *Streptococcus lactis*

(atualmente reclassificado como *Lactococcus lactis*) que possuíam efeito inibitório sobre outras espécies de bactérias lácticas em leite (Cheigh *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009).

O efeito inibitório da nisina é limitado, com ação predominantemente sobre bactérias Gram-positivas, como *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp. A nisina atua também inibindo células vegetativas ou esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Porém, este lantibiótico não apresenta atividade contra micro-organismos Gram-negativos, bolores e leveduras. Entretanto, sabe-se que seu uso em combinação com agentes que modifiquem a permeabilidade da membrana externa pode representar um potencial de utilização da nisina contra bactérias Gram-negativas (Pranoto *et al.*, 2005; Samelis *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009).

Em 1988, o FDA aprovou o uso da nisina como conservante em alimentos e atualmente sua utilização é permitida em aproximadamente 50 países (Arauz *et al.*, 2009). A aplicação prática da nisina tem sido bastante explorada pela indústria de alimentos devido à sua resistência a temperaturas elevadas e pH ácido, além da capacidade de impedir a germinação de esporos bacterianos (Cheigh *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009). Além disso, as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, como a nisina, são naturalmente encontradas nos alimentos, o que contribui para sua aceitação como conservante natural pelos consumidores (Deegan, *et al.*, 2006).

Quanto à estrutura, a nisina consiste de um pequeno polipeptídeo (3,4 kDa) de característica anfifílica, composto por 34 aminoácidos incluindo os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além de um anel de lantionina e quatro anéis de β -metil-lantionina (Papagianni, 2003; Cheigh *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009; Asaduzzaman e Sonomoto, 2009). Sua biosíntese ocorre nos ribossomos e envolve uma molécula precursora composta de 57 aminoácidos convencionais, que é convertida em nisina através de reações enzimáticas. Os resíduos de dehidroalanina e dehidrobutirina são resultado da desidratação de resíduos de serina e treonina, respectivamente, enquanto os anéis de lantionina e β -metil-lantionina são formados através da ligação de grupos tiol livres presentes em resíduos de cisteína às duplas ligações dos resíduos de dehidroalanina e dehidrobutirina, respectivamente, transformando-se nas moléculas precursoras da nisina. Em um terceiro momento ocorre a clivagem da molécula precursora com a liberação do pré-peptídeo composto por 23 aminoácidos e a secreção da nisina composta por 34 aminoácidos. Esta proteína é produzida apenas durante a fase exponencial da multiplicação de *L.*

lactis subsp. *lactis*, cessando sua produção quando o micro-organismo entra na fase estacionária (Cheigh *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006, Arauz *et al.*, 2009).

Existem cinco variantes naturais de nisina: nisina A (primeira a ser descoberta), nisina Z, nisina Q, nisina U e nisina F. Embora essas variantes possuam diferenças nas cadeias de aminoácidos, apresentam atividade antimicrobiana bastante similar (Kwaadsteniet *et al.*, 2008). Suas estruturas podem ser observadas na Figura 1.

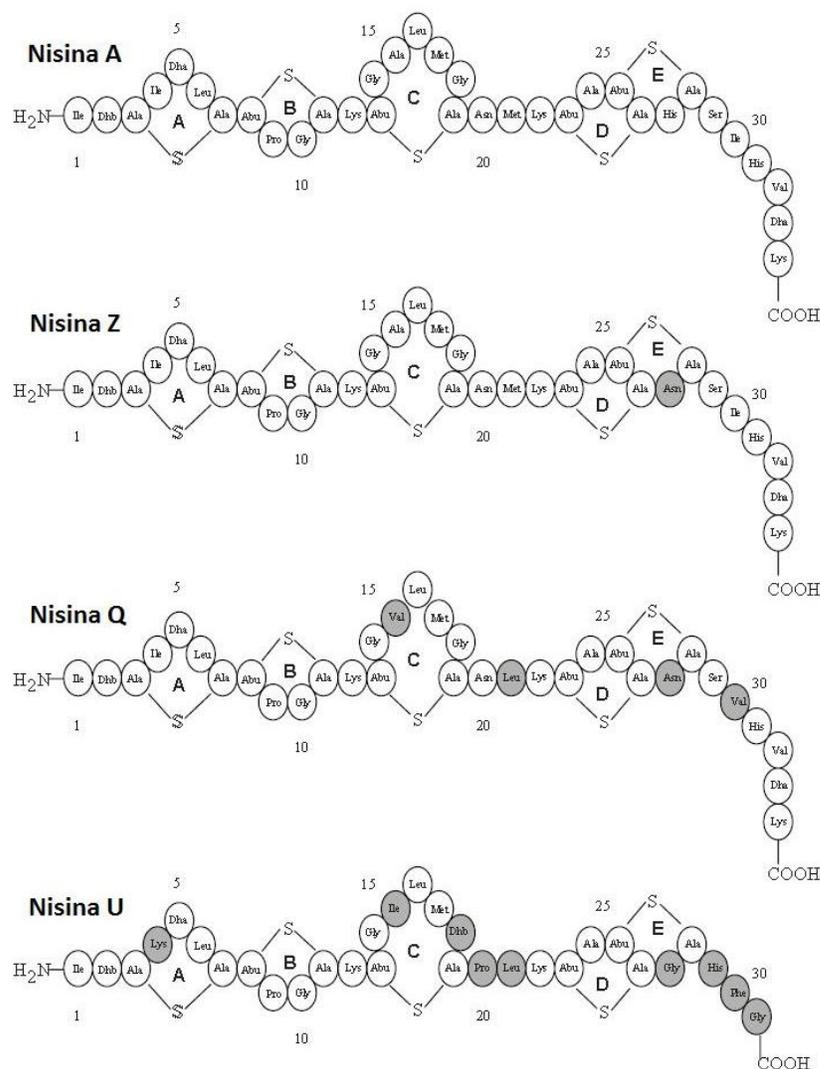


Figura 1. Estrutura primária das variantes naturais de nisina: A, Z, Q e U

Fonte: <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/29669/lantibio.pdf?sequence=1>

Comparando-se a nisina A com a nisina Z, observa-se que elas diferem apenas no aminoácido da posição 27 (histidina na nisina A e asparagina na nisina Z). Já para as demais variantes as modificações observadas são maiores. A nisina Q difere da nisina A nos aminoácidos das posições 15, 21, 27 e 30. A nisina U apresenta modificações nos aminoácidos das posições 4, 15, 18, 20, 21, 27, 29, 30 e 31. A nisina F, recentemente caracterizada por Kwaadsteniet *et al.* (2008), difere da nisina Q por apresentar uma modificação no aminoácido da posição 30 (valina na nisina Z e isoleucina na nisina F).

Segundo Delves-Broughton e Gasson (1994), a ação bacteriostática e/ou bactericida da nisina é influenciada por sua concentração e pela quantidade de células sensíveis a serem atingidas. Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado uma capacidade de inibição na formação da parede celular bacteriana (McAuliffe *et al.*, 2001), o primeiro sítio de ação da nisina é a membrana citoplasmática onde ela atua como agente despolarizador, através de um modelo potencial-dependente. O efeito antibacteriano é decorrente de suas interações com os fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática provocando a formação de poros por onde ocorre o efluxo de constituintes citoplasmáticos de baixo peso molecular como ATP, íons de potássio e aminoácidos (Asaduzzaman e Sonomoto, 2009; Todorov *et al.*, 2009).

O aumento na permeabilidade da membrana provoca o colapso da FPM, ocasionando a rápida parada de todos os processos biossintéticos. A Figura 2 apresenta um modelo de formação de poros na membrana da célula alvo, mediada por interações com o lipídeo II, proposto por Chatterjee *et al.* (2005). O grau de associação da nisina com a membrana é altamente dependente do tipo de lipídeos presentes e principalmente da carga destes lipídeos. Como molécula catiônica, a nisina é mais ativa na presença de moléculas carregadas negativamente na membrana citoplasmática (McAuliffe *et al.*, 2001; Aasen *et al.*, 2003; Todorov *et al.*, 2009).

A ação da nisina sobre esporos bacterianos é predominantemente esporostática. Este fator é de extrema importância para sua aplicação em alimentos, uma vez que um teor residual suficiente de nisina deve ser mantido durante toda a vida útil do produto para que se tenha a manutenção da conservação (Delves-Broughton e Gasson, 1994).

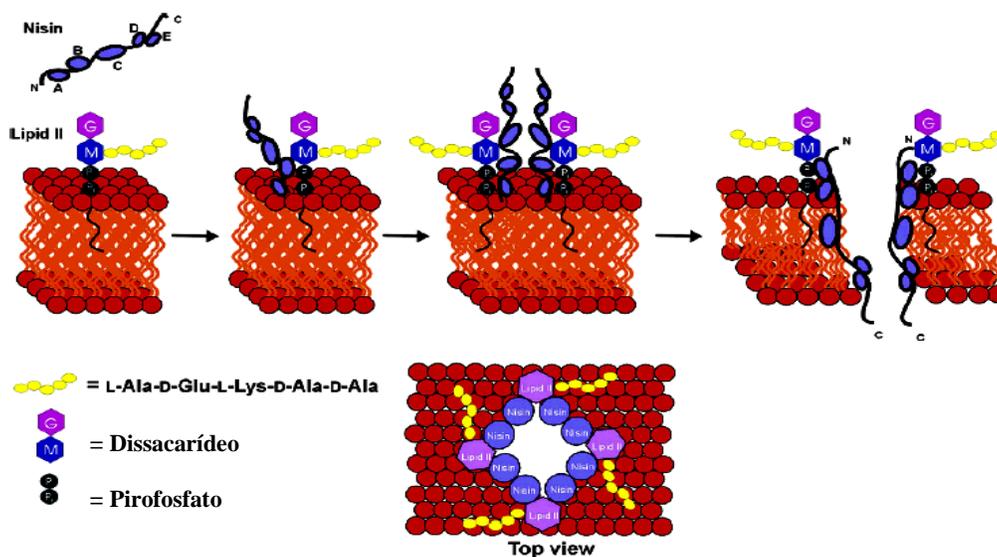


Figura 2. Modelo de formação de poros na membrana, mediada por interações com o lipídeo II, proposto por Chatterjee *et al.* (2005).

Segundo Samelis *et al.* (2005), existem três limitações para o uso de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como conservadores em alimentos: 1- não são ativas contra bactérias Gram-negativas (patogênicas e deteriorantes) e bolores e leveduras; 2- não são ativas contra todas as células ou esporos de bactérias Gram-positivas; 3- existem variantes de cepas de células sensíveis que são resistentes e podem multiplicar-se na presença de bacteriocinas. Além disso, segundo Aasen *et al.* (2003), os componentes presentes na matriz alimentar desempenham um papel fundamental na eficiência da utilização de bacteriocinas como conservadores de alimentos, uma vez que as bacteriocinas são peptídeos anfífilos susceptíveis à adsorção por macromoléculas presentes nos alimentos ou ainda à degradação proteolítica.

Segundo Cotter *et al.* (2005), bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas ou suas bacteriocinas propriamente ditas podem ser empregadas com o intuito de se manipular a microbiota presente em um determinado alimento de forma específica, evitando-se a contaminação por micro-organismos deteriorantes e patogênicos ou ainda influenciando-se a multiplicação de bactérias favoráveis para um fim específico através de exclusão competitiva. Uma vez que as bactérias lácticas são naturalmente encontradas em produtos cárneos, tais micro-organismos são capazes de se multiplicar nesses substratos produzindo os metabólitos de interesse e atuando como bioconservantes (Deegan *et al.*, 2006; Signorini *et al.*, 2006).

As bacteriocinas podem ser utilizadas nos alimentos de diferentes formas. Em alimentos fermentados, as bacteriocinas podem ser produzidas *in situ* por culturas bacterianas que podem substituir, totalmente ou em parte, a cultura iniciadora, porém é necessário garantir que as bactérias sejam capazes de se multiplicar no substrato ao qual são adicionadas. Pode-se também adicionar bacteriocinas purificadas ou semi purificadas diretamente aos alimentos, ou ainda adicioná-las através de um ingrediente fermentado por uma cepa bacteriana produtora de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005, Gálvez *et al.*, 2007). Muitos são os exemplos de bactérias lácticas que apresentam potencial para aplicação como agentes bioconservadores de alimentos, podendo ser utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de produtos cárneos, com destaque para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* (Ouwenhand e Vesterlund, 2007). Porém o sucesso desta forma indireta de adição de bacteriocinas aos alimentos é dependente da capacidade de multiplicação e produção de bacteriocina pela cepa adicionada durante o processo de fermentação. A produção de certas bacteriocinas em condições de laboratório nem sempre pode ser reproduzida em alimentos (Urso *et al.*, 2006; Ammor e Mayo, 2007, Gálvez *et al.*, 2007). Além disso, a população microbiana presente em produtos fermentados é influenciada pela contaminação inicial presente na matéria-prima crua, e ainda pelas condições de temperatura, potencial de oxi-redução, pH e atividade de água que predominam durante o processo de fermentação (Gálvez *et al.*, 2007). Desta forma, o conhecimento e controle dessas variáveis são essenciais para a garantia das qualidades microbiológica e sensorial dos produtos fermentados. A aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas isoladas do próprio alimento ao qual serão adicionadas aumenta as chances de sucesso em sua atuação como agente bioconservador, uma vez que bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos fermentados estão bem adaptadas a esse ambiente. (Ammor e Mayo, 2007). O charque é um produto cárneo fermentado e, portanto, apresenta potencial para o isolamento de bactérias lácticas bacteriocinogênicas que podem ser aplicadas na bioconservação deste produto.

1.3.2 Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos

Diversas culturas bacteriocinogênicas já foram isoladas de produtos cárneos, evidenciando seu grande potencial como agentes bioconservadores deste tipo de alimento e sua importância em produtos cárneos fermentados (Castellano *et al.*, 2008, Todorov *et al.*, 2009).

Embora a maioria das bactérias lácticas produtoras de lactocinas conhecidas tenha sido isolada de produtos lácteos e vegetais, algumas cepas de *L. lactis* produtoras de nisina já foram isoladas de linguiças fermentadas, apresentando atividade inibitória contra outras bactérias lácticas geneticamente relacionadas, e também *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Rodriguez *et al.*, 1995; Noonpakdee *et al.*, 2003).

Além das lactocinas, outras bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos também já foram descritas. Aymerich *et al.* (1998) descreveram três bacteriocinas que apresentam atividade comprovada contra outras bactérias lácticas, *L. monocytogenes* e algumas cepas de *Clostridium*. As bacteriocinas descritas por estes autores são: pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 e *Pediococcus pentosaceus* Z102, isolados de linguiças produzidas nos estilos “americano” e “espanhol”, respectivamente; sacacina A, produzida por duas cepas diferentes de *Lactobacillus sakei* (Lb706 e CTC494) e por *Lactobacillus curvatus* LTH1174, isolados de linguiças fermentadas e enterocina A, produzida por *Enterococcus faecium* CTC492, isolado de linguiças secas e fermentadas da Espanha. A Tabela 2 apresenta outros exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos.

Tabela 2. Exemplos de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos, adaptado de Castellano *et al.* (2008).

Cepa produtora	Bacteriocina	Classe	Fonte	Efeito antimicrobiano*
<i>Lactococcus lactis</i> BB24	Nisina	I _a	Linguiça fermentada	4,5,7,9
<i>Lactococcus lactis</i> WNC20	Nisina Z	I _a	Linguiça fermentada	1,2,4,6,9
<i>Lactobacillus sakei</i> 148, V18	Lactocina S	I _a	Linguiça fermentada	1,4,5,6
<i>Lactobacillus sakei</i> L45	Lactocina S	I _a	Linguiça fermentada	1,4,5,6
<i>Lactobacillus sakei</i> LTH673, 674	Sakacina K, P	II _a	Carne bovina	1,6,7
<i>Lactobacillus sakei</i> I151	Sakacina P	II _a	Linguiça fermentada	7
<i>Lactobacillus sakei</i> Lb706	Sakacina A	II _a	Produtos cárneos	1,6,7
<i>Lactobacillus sakei</i> CTC494	Sakacina K	II _a	Linguiça fermentada	1,6,7
<i>Lactobacillus sakei</i> MN	Bavaricina MN	II _a	Carne bovina	7
<i>Lactobacillus brevis</i> SB27	Brevicina 27	II _d	Linguiça fermentada	1,2
<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	Curvacina A	II _a	Prod cárneos	1,2,7
<i>Lactobacillus curvatus</i> CRL705	Lactocina 705	II _b	Linguiça fermentada	1,2,3,8
<i>Lactobacillus curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47	II _d	Carne moída	1,2,6
<i>Lactobacillus curvatus</i> L442	Curvaticina L442	II _a	Linguiça fermentada	1,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> CTC305	Plantaricina A	II _d	Linguiça fermentada	1,7
<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL17	Leucocina A	II _a	Carne a vácuo	1,6,7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA33a	Leucocina A	II _a	Carne a vácuo	1,6,7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L124	Leucocina A	II _a	Linguiça fermentada	1,7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> E131	Leucocina A	II _a	Linguiça fermentada	7
<i>Leuconostoc carnosum</i> TA11a	Leucocina A	II _a	Carne a vácuo	1,6,7
<i>Pediococcus aciditactici</i> PAC1.0	Pediocina PA-1/ach	II _a	Linguiça <i>american-style</i>	1,4,5,7,8
<i>Pediococcus aciditactici</i> L50	Pediocina L50	II _d	Linguiça fermentada	1,4,5,6,7,8,9
<i>Pediococcus pentosaceus</i> Z102	Pediocina PA-1	II _a	Linguiça fermentada	1,4,5,7,9
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17B	Carnobacteriocina B2	II _a	Carne a vácuo	7
<i>Carnobacterium piscicola</i> VI	Piscicocina v1a	II _a	Peixe	1,6,7
<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	Carnobacteriocina A	II _d	Carne processada	1,7
<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	Piscicolina 126	II _a	Hamburguer deteriorado	7
<i>Carnobacterium piscicola</i> KLV17B	Carnobacteriocin B1	II _a	Carne a vácuo	1,6,7
<i>Carnobacterium divergens</i> 750	Divergicin 750	II _d	Carne a vácuo	1,5,6,7
<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	Divergicin A	II _d	Carne a vácuo	1
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	Enterocina B	II _d	Linguiça fermentada	1,5,7
<i>Enterococcus faecium</i> CTC492	Enterocina A	II _a	Linguiça fermentada	7
<i>Enterococcus casseliflavus</i> IM416K1	Enterocina 416K1	II _a	Linguiça fermentada	7

(1) Outras bactérias lácticas; (2) *B. cereus*; (3) *B. thermosphacta*; (4) *C. botulinum*; (5) *C. perfringens*; (6) *E. faecalis/ faecium*; (7) *L. monocytogenes*; (8) *Propionibacterium* e (9) *Staphylococcus aureus*.

Segundo Gálvez *et al.* (2008), nas últimas décadas foram realizados vários estudos avaliando o potencial das bacteriocinas como agentes bioconservadores de produtos cárneos e a Tabela 3 apresenta algumas destas aplicações.

Tabela 3. Potencial de aplicação de bacteriocinas em produtos cárneos, adaptado de Gálvez *et al.* (2008).

Matéria-prima crua (Ex.: Carne crua, carne crua embalada a vácuo e carne moída)

- ◆ Descontaminação da matéria-prima (ex.: lavagem por pulverização)
- ◆ Inibição de micro-organismos deteriorantes e extensão da vida de prateleira de carnes embaladas a vácuo
- ◆ Inibição de *Listeria monocytogenes* da superfície de carne crua e carne moída

Produtos cárneos cozidos

- ◆ Inibição de deterioração por bactérias láticas
- ◆ Extensão da vida de prateleira de produtos cárneos fatiados embalados a vácuo
- ◆ Redução da intensidade do tratamento com alta pressão hidrostática aplicado a produtos cárneos fatiados
- ◆ Utilização de bactérias láticas bacteriocinogênicas como bioconservantes contra *L. monocytogenes* e deteriorantes

Produtos cárneos fermentados

- ◆ Inibição de deterioração por bactérias láticas
 - ◆ Inibição de patógenos como *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*
 - ◆ Utilização de bactérias láticas bacteriocinogênicas como iniciadoras para inibição de *L. monocytogenes* e deteriorantes
 - ◆ Favorecimento da multiplicação de culturas iniciadoras durante a fermentação
-

Segundo Cotter *et al.* (2005), embora existam inúmeras bacteriocinas com potencial para utilização na conservação de alimentos, apenas a nisina e a pediocina PA1/AcH são atualmente empregadas com este fim. Desta forma, o estudo e o desenvolvimento de sistemas de bioconservação relacionados à utilização de bactérias láticas e/ou suas bacteriocinas torna-se de grande interesse na ampliação deste espectro, além de representar uma alternativa tecnológica interessante na indústria de carnes, especialmente quando se considera que as bactérias láticas podem ser benéficas para a saúde.

1.4 Ecologia microbiana em produtos cárneos fermentados

A aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas na produção de alimentos fermentados pode influenciar a microbiota presente durante o processo, implicando diretamente nas características do produto final (Cotter *et al.*, 2005; Talon *et al.*, 2007). Desta forma, torna-se importante o conhecimento das modificações na microbiota de um alimento decorrentes da utilização de bactérias lácticas bacteriocinogênicas ou suas bacteriocinas, para que se possa escolher a melhor cepa a ser adicionada, garantindo a qualidade do produto final.

O primeiro estágio para a obtenção de culturas lácticas a serem aplicadas para a fermentação de produtos cárneos é a identificação das cepas isoladas do próprio alimento em questão, seguindo-se a seleção daquelas que melhor se adaptam para esta utilização. Essa seleção é feita com base em critérios que visam garantir a qualidade do produto final como inativação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes e capacidade de favorecer as condições bioquímicas necessárias para que ocorram as modificações esperadas durante a etapa de maturação (Lücke, 2000; Ammor e Mayo, 2007).

Apesar do grande número de novas bacteriocinas descobertas nas duas últimas décadas, apenas algumas delas tiveram sua caracterização bioquímica e genética realizada (Castellano *et al.*, 2008). Métodos fenotípicos, baseados em critérios fisiológicos e bioquímicos, têm sido utilizados para a identificação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas, porém estas metodologias possuem algumas desvantagens como a interpretação subjetiva e demora na obtenção dos resultados. Para contornar essas desvantagens, podem ser utilizados métodos moleculares capazes de identificar as espécies e ainda estimar a biodiversidade entre as bactérias lácticas presentes em um alimento. Entre as metodologias utilizadas, destacam-se PCR espécie-específica, PCR em tempo real, Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (RAPD-PCR) e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Ammor e Mayo, 2007; Talon *et al.*, 2007; Cocolin *et al.*, 2009).

Outro aspecto relevante para o sucesso da aplicação de bactérias lácticas bacteriocinogênicas como agentes de bioconservação de produtos cárneos fermentados é a compreensão das modificações que ocorrem durante a fermentação destes produtos, muitas das quais são dependentes da microbiota presente. Assim, métodos moleculares para o estudo da ecologia microbiana e dinâmica populacional durante as etapas de fermentação são uma

ferramenta importante para a compreensão dessas modificações, uma vez que métodos cultivo-independentes são capazes de superar alguns problemas encontrados nos métodos tradicionais como dificuldade de cultivo e isolamento de todos os micro-organismos presentes em um determinado ambiente.

A DGGE é uma técnica cultivo-independente, capaz de identificar diferenças entre fragmentos de DNA com mesmo tamanho, porém, com sequências distintas, baseando-se no perfil de desnaturação (*melting*) dos fragmentos de DNA em gel de acrilamida (Ercolini, 2004).

Na DGGE, a quebra do DNA é decorrente do tratamento com formamida e ureia, que são adicionadas aos moldes por camadas em diferentes concentrações, de forma a se obter um gradiente linear crescente de desnaturação. A eletroforese ocorre em temperatura constante, que deve estar entre 55°C e 65°C. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA de fita dupla percorrem o gel, encontrando camadas com concentrações cada vez maiores dos agentes desnaturantes e as fitas se abrem parcialmente em regiões distintas, chamadas domínios de desnaturação (*melting domains*). Uma vez que as fitas estejam parcialmente abertas, há formação de moléculas ramificadas, o que reduz a mobilidade do DNA no gel. Assim, fragmentos de DNA de mesmo tamanho, porém com diferente composição de pares de base, irão apresentar respostas distintas ao gradiente de desnaturação, percorrendo distâncias diferentes no gel de DGGE. Antes da aplicação no gel, o DNA molde é amplificado por PCR e adicionado de fragmentos contendo sequências GC (chamados *GC clamps*), com 30 a 40 pb, responsáveis por impedir que a dupla fita de DNA seja completamente desnaturada (Ercolini, 2004).

Os domínios de desnaturação são dependentes da sequência do DNA e variam de acordo com a composição dos pares de base das regiões variáveis da porção 16S de rDNA, tornando possível distinguir diferentes espécies bacterianas (Ercolini, 2004).

Através da amplificação da porção 16S rDNA por PCR, seguida da DGGE, é possível obter importantes informações a respeito das populações microbianas naturalmente presentes em alimentos fermentados, sendo possível fazer o monitoramento das dinâmicas populacionais e também a detecção de micro-organismos não cultiváveis (de Vuyst e Vancanneyt, 2007; Ruiz *et al.*, 2010). O efeito da aplicação de culturas iniciadoras compostas por *Pediococcus pentosaceus* + *Staphylococcus xylosus* e *Lactobacillus farciminis* + *Staphylococcus saprophyticus* na dinâmica populacional de linguiças fermentadas foi avaliado por Lu *et al.* (2010), verificando que os

resultados obtidos através da técnica de DGGE foram similares aos obtidos por métodos tradicionais cultivo-dependentes. Cocolin *et al.* (2009) também utilizaram esta técnica no estudo da diversidade bacteriana durante a etapa de maturação de três tipos de linguiças fermentadas produzidas no norte da Itália e relataram que as populações dominantes encontradas, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus*, foram as mesmas quando foram utilizados métodos tradicionais. Aquilanti *et al.* (2007), avaliando a ecologia microbiana presente na fermentação de salame italiano, verificaram que, utilizando métodos de cultivo tradicionais, havia uma predominância de bactérias lácticas em relação a cocos coagulase negativa, e ao utilizar DGGE, estas bactérias lácticas predominantes puderam ser identificadas como *L. curvatus* e *L. plantarum*. Estes trabalhos mostram que a DGGE é uma técnica conveniente para o estudo da ecologia microbiana de alimentos, pois apresenta resultados confiáveis em comparação com aqueles obtidos utilizando-se técnicas tradicionais cultivo-dependentes, além de ser muito mais rápida e capaz de detectar mesmo micro-organismos não cultiváveis.

Assim, a obtenção de culturas lácticas produtoras de bacteriocinas a partir de produtos cárneos fermentados, o estudo de seu potencial de aplicação na bioconservação destes produtos e a avaliação de sua influência na dinâmica populacional microbiana representam uma ferramenta interessante para a melhoria da qualidade microbiológica de produtos cárneos fermentados.

2. Objetivos

1. Isolar e identificar cepas de bactérias lácticas potencialmente bacteriocinogênicas, a partir de charque;
2. Isolar e identificar micro-organismos halotolerantes a partir de charque;
3. Avaliar as características das substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas isoladas com relação a sua sensibilidade ao tratamento com calor, diferentes valores de pH, presença de enzimas proteolíticas, NaCl e outros agentes químicos;
4. Avaliar, *in vitro*, o espectro de atividade das cepas bacteriocinogênicas contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de importância em alimentos, incluindo bactérias halotolerantes isoladas de charque;
5. Selecionar a cepa bacteriocinogênica mais adequada para aplicação em charque modelo;
6. Investigar a capacidade de multiplicação, sobrevivência e produção de bacteriocinas da cepa selecionada em concentrações de NaCl semelhantes às encontradas no charque;
7. Proceder à identificação da cepa bacteriocinogênica selecionada e investigar a presença de genes codificadores para as principais bacteriocinas produzidas pela espécie identificada;
8. Avaliar o potencial bioconservante da cepa selecionada em charque modelo, produzido experimentalmente e adicionado de bactérias halotolerantes isoladas de charque;
9. Avaliar o efeito da presença da cepa bacteriocinogênica na diversidade microbiana e dinâmica populacional presentes durante a fabricação e armazenamento do charque modelo.

3. Material e Métodos

3.1 Amostras de charque

As bactérias lácticas utilizadas neste estudo foram isoladas de uma amostra de charque adquirida no comércio na cidade de São Paulo e de uma amostra fornecida por uma indústria produtora de charque, localizada no estado do Rio de Janeiro. Os micro-organismos halofílicos foram isolados de duas amostras de charque, cedidas pela indústria localizada no estado do Rio de Janeiro.

3.2 Obtenção e caracterização dos micro-organismos utilizados neste estudo

3.2.1 Isolamento de bactérias halotolerantes a partir de charque

Para a realização dos experimentos, 25 g de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% com o auxílio de *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra), submetidas à diluição decimal seriada em mesmo diluente e semeadas por profundidade em meio Ágar Triptona de Soja (TSA) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) adicionado de 3% ou 10% de NaCl (Synth, Diadema, Brasil), para o isolamento de bactérias medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes, respectivamente (Pinto, 1996). Após incubação das placas a 37°C por 72 h, foram selecionadas aleatoriamente nove colônias para cada grupo, todas apresentando diferentes morfologias. As colônias foram purificadas em ágar TSA adicionado de 3% ou 10% de NaCl e após incubação a 37°C por 72 h foram reativadas em meio líquido Triptona de Soja (TSB) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) por 72 h a 37°C. Os micro-organismos halotolerantes foram armazenados a -70°C em meio líquido TSB, também adicionado de 3% ou 10% de NaCl e 20% de glicerol (Synth, Diadema, Brasil) até o momento da utilização.

3.2.2 Identificação das bactérias halotolerantes isoladas do charque

Os 18 isolados foram identificados por amplificação do DNA ribossomal (rDNA), sequenciamento e identificação da região intergênica 16S-23S.

O DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o kit comercial *Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare UK Limited), conforme instruções do fabricante. Após a extração do DNA, procedeu-se a amplificação do gene de rDNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com Cibik *et al.* (2000). Para isso, 50 ng de DNA foram adicionados da mistura de reação contendo 60 pmol de cada *primer*; 1,5 mM de MgCl₂; 10 µL de tampão de Taq polimerase; 3,5 U de enzima Taq polimerase; 200 µM de cada oligonucleotídeo (dNTPs) e água bi destilada estéril (todos os reagentes GE Healthcare, EUA). O volume final de reação foi 100 µL. Os *primers* utilizados foram: 5'AGAGTTTGATCMTGGCTC-3' (*forward*), correspondente à posição 8-25 conservada de 16S rDNA de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978) e 5'-CNCGTCCTTCATCGCCT-3' (*reverse*) correspondente à posição 40-60 conservada de 23S rDNA de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1980). O DNA foi amplificado em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 55°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1,5 minutos (polimerização), seguindo-se extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 80 V em gel contendo 1% (p/v) de agarose em tampão 1 x TBE (Tris, EDTA, ácido bórico, Sigma, EUA), utilizando-se marcador molecular de 1 kb, seguida de coloração com brometo de etídio e observação sob luz ultravioleta. A purificação dos fragmentos obtidos foi realizada em colunas Quantum Prep PCR Kleen Spin (BioRad, Madrid, Espanha).

O produto da reação de amplificação foi submetido ao sequenciamento da porção 16S de rDNA para a identificação da espécie, utilizando-se os *primers* SP3 (TACGCATTTACCKCTACA), SP4 (CTCGTTGCGGGACTTAAC) e SP5 (GNTACCTTGTTACGACTT), descritos por Ben Omar *et al.* (2006). O sequenciamento foi realizado pela empresa Lorgen – Genómica y Proteómica (Granada, Espana), utilizando-se o sistema de análise CEQ 2000 XL DNA (Beckman Coulter, CA). Após o sequenciamento, as cepas foram identificadas por comparação das seqüências obtidas com as disponíveis nas bases de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e

GenBank, utilizando-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível *online* em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Para confirmar a identificação também foi realizada uma PCR-multiplex para o gênero *Staphylococcus* e para as espécies *S. saprophyticus*, *S. xylosus* e *S. aureus*, utilizando-se a cepa *S. aureus* ATCC 95923 como controle positivo, de acordo com Morot-Bizot *et al.* (2004). Para isso, 50 ng de DNA foram adicionados à mistura de reação contendo 50 pmol de cada um dos *primers* Xyl F e Xyl R; 50 pmol de cada um dos *primers* Sap1 e Sap 2; 40 pmol de cada um dos *primers* Sa442-1 e Sa442-2; 20 pmol de cada um dos *primers* Tstag 765 e TstaG 422; 3 mM de MgCl₂; 2,5 µL de tampão de Taq polimerase; 2 U de enzima Taq polimerase; 200 µM de dNTPs e água bi-destilada estéril. O volume final de reação foi 25 µL. Os *primers* utilizados para esta reação estão descritos na Tabela 4. O DNA foi amplificado em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 3 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos (polimerização), seguindo-se extensão final a 72°C por 3 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 80 V em gel contendo 2% (p/v) de agarose em tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador molecular de 100 pb, seguido de coloração com brometo de etídio e observação sob luz ultravioleta.

Tabela 4. *Primers* utilizados na PCR-multiplex para confirmação da identificação das cepas halotolerantes.

Micro-organismo	Primer	Sequência	Referência
<i>Staphylococcus</i> spp.	Tstag 765	TIACCATTTCAGTACCTTCTGGTAA	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2004)
	TstaG 422	GGCCGTGTTGAACGTGGTCAAATCA	
<i>S. xylosus</i>	Xyl F	AACGCGCAACGTGATAAAAATTATG	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2004)
	Xyl R	AACGCGCAACAGCAATTACG	
<i>S. saprophyticus</i>	Sap 1	TCAAAAAGTTTTCTAAAAAATTTAC	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2004)
	Sap 2	ACGGGCGTCCACAAAATCAATAGGA	
<i>S. aureus</i>	Sa442-1	AATCTTTGTCTGGTACACGATATTCTTCACG	Morot-Bizot <i>et al.</i> (2004)
	Sa442-2	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA	

3.2.3 Isolamento das bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas a partir de charque

Para a obtenção das bactérias lácticas potencialmente produtoras de bacteriocinas foi aplicada a técnica de tripla camada em ágar *de Man Rogosa and Sharpe* (MRS) (Oxoid Ltda, Basingstoke, Inglaterra), também utilizada por Todorov e Dicks (2004). Desta forma, 25 g de amostra foram homogeneizados com 225 mL de água peptonada 0,1% com o auxílio de um *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra) e a mistura foi submetida à diluição decimal seriada, empregando-se o mesmo diluente. Uma alíquota (100 µL) de cada diluição foi inoculada na superfície de uma fina camada de ágar MRS (10 mL) e recoberta por uma nova camada de 10 mL composta por ágar bacteriológico (1,5% p/v) dissolvido em água esterilizada. Após incubação à 30°C por 48 h, adicionou-se outra camada de 10 mL de ágar MRS semi-sólido (0,75% p/v de ágar) contendo 0,4% de uma cultura do micro-organismo indicador sabidamente sensível a bacteriocinas (*Lactobacillus sakei* ATCC 15521), obtida em meio líquido MRS a 30°C por 24 h. Após nova incubação à 30°C por 24 h, as placas foram analisadas quanto à presença de zonas de inibição do indicador ao redor das colônias de bactérias lácticas presentes nas amostras de charque. As colônias que apresentaram inibição do indicador foram selecionadas, purificadas em ágar MRS a 30°C por 48, reativadas em meio líquido MRS (30°C por 24 h) e submetidas à coloração de Gram e ao teste de produção de catalase. Os micro-organismos que se apresentaram como Gram positivos e com resultado negativo para a produção de catalase foram submetidos aos testes subsequentes. Até o momento da utilização os micro-organismos foram mantidos a -70°C em meio líquido MRS adicionado de 20% de glicerol.

3.3 Seleção dos isolados com atividade bacteriocinogênica

Após confirmação da atividade antibacteriana *in vitro*, realizada através técnica *spot on the lawn* descrita por Lewus e Montville (1991), os isolados foram submetidos a testes de caracterização da atividade antimicrobiana, avaliação do espectro de atividade, multiplicação, sobrevivência e produção de bacteriocinas em altas concentrações de NaCl.

3.3.1 Confirmação da atividade antimicrobiana

Os micro-organismos, isolados conforme 3.2.3, foram cultivados em meio líquido MRS a 30°C por 24 h e separados por centrifugação (8.000 x g, 4°C, 10 min). O pH do sobrenadante livre de células (SLC) foi ajustado para 6,0 com NaOH (1M) (Synth, Diadema, Brasil) e adicionado (10µL) a placas contendo ágar MRS, previamente inoculado com 10⁶ UFC/ mL do micro-organismo indicador *L. sakei* ATCC 15521. Após incubação a 30°C por 24 h observou-se o aparecimento de zonas de inibição ao redor do local onde foi colocado o SLC dos isolados supostamente produtores de bacteriocinas. Os isolados que confirmaram o efeito antimicrobiano contra o indicador foram selecionados e as substâncias inibidoras produzidas por estes isolados foram submetidas aos testes de sensibilidade a enzimas proteolíticas, pH, calor e agentes químicos.

3.3.2 Sensibilidade das substâncias inibidoras produzidas a tratamento com enzimas proteolíticas, pH, agentes químicos e calor

O teste de sensibilidade ao tratamento térmico foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ivanova *et al.* (1998). Alíquotas de um mililitro do SLC, preparado conforme descrito em 3.3.1, foram submetidas a aquecimento a 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100 e por 30, 60 e 120 minutos e testadas quanto à atividade antimicrobiana através da técnica *spot on the lawn* (Lewus e Montville, 1991).

Para os testes de sensibilidade a enzimas proteolíticas e pH, foi utilizada a metodologia adaptada de van Reenen *et al.* (1998). Alíquotas de um mililitro do SLC, preparado conforme descrito em 3.3.1, tiveram o pH ajustado para valores de 2,0 até 12,0, com HCl (1M) (Synth, Diadema, Brasil) ou NaOH (1M). Após incubação a 37°C por 30 minutos, o pH foi ajustado para 6,0, novamente utilizando-se HCl (1M) ou NaOH (1M), e a atividade antimicrobiana observada através da técnica *spot on the lawn* (Lewus e Montville, 1991). Alíquotas de um mililitro do SLC foram também adicionadas de pepsina (1mg/mL) e protease (1mg/mL) e incubadas a 37°C por 30 min (todas as enzimas utilizadas: Sigma, Nova Iorque, Estados Unidos). As enzimas foram inativadas por calor (100°C/ 3 min) seguindo-se a observação da atividade antimicrobiana através da técnica *spot on the lawn* (Lewus e Montville, 1991).

Para os testes de sensibilidade a agentes químicos, alíquotas de um mililitro do SLC, obtido conforme descrito em 3.3.1, foram adicionadas de 1% (p/v) dos seguintes agentes: Tween 80, uréia, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e SDS (dodecil sulfato de sódio) e, após 1 h de contato, a atividade antimicrobiana foi observada através da técnica *spot on the lawn* (Lewus e Montville, 1991).

Os isolados cuja atividade antimicrobiana foi perdida após tratamento com enzimas proteolíticas, porém não afetada pela presença dos agentes químicos ou tratamento com calor, foram considerados bacteriocinogênicos e avaliados quanto ao espectro de atividade.

Em todos os testes, utilizou-se *L. sakei* ATCC 15521 como indicador da atividade antimicrobiana e *L. sakei* 2a produtor de bacteriocina como controle positivo da atividade inibitória (De Martinis e Franco, 1998).

3.3.3 Espectro de atividade

A atividade inibitória dos isolados bacteriocinogênicos foi avaliada utilizando-se o SLC através da técnica de *spot-on-the-lawn* (Lewus e Montville, 1991) e expressa em milímetros de halo de inibição. Os testes foram realizados contra 20 cepas de *Listeria monocytogenes*, três cepas de *Staphylococcus aureus*, três cepas de *Lactobacillus acidophilus*, sete cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, cinco cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, uma cepa de *Lactobacillus sakei* 2a, uma cepa de *Lactobacillus paracasei*, uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, uma cepa de *Bacillus cereus*, uma cepa de *Enterobacter aerogenes*, uma cepa de *Enterococcus hirae* e duas cepas de *Enterococcus faecium*. A atividade antimicrobiana também foi testada contra 18 cepas de micro-organismos halotolerantes isolados de charque, conforme descrito no item 3.2.1.

Entre os isolados com atividade bacteriocinogênica confirmada, aquele que apresentou o melhor espectro de atividade foi selecionado para identificação completa e aplicação nos estudos no charque modelo (isolado 69). Até o momento da utilização, o isolado foi mantido a -70°C em meio líquido MRS com 20% de glicerol.

3.3.4 Multiplicação e sobrevivência do isolado 69 em diferentes concentrações de NaCl

Uma cultura do isolado 69 contendo aproximadamente 10^5 UFC/ mL do micro-organismo foi inoculada em meio líquido MRS contendo diferentes concentrações de NaCl (0%, 3%, 5%, 10%, 15% e 20% p/v), incubando-se a 30°C, enumerando-se as bactérias lácticas por um período de até 72 h. Para as análises com MRS contendo 0%, 3% e 5% de NaCl, a enumeração foi realizada imediatamente após a inoculação (0 h de incubação), em intervalos de 2 h por até 12 h de incubação e depois em intervalos de 12 h até 72 h de incubação. Já para os testes com MRS contendo 10%, 15% e 20% de NaCl as contagens foram realizadas imediatamente após a inoculação (0 h) e nos tempos de 24 h, 30 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. A enumeração de bactérias lácticas foi realizada conforme descrito em Hall *et al.* (2001). Os experimentos foram repetidos três vezes para cada concentração de NaCl testada. As contagens expressas em UFC/mL foram convertidas para log UFC/mL e os resultados corresponderam às médias aritméticas das contagens já convertidas para log UFC/mL.

3.3.5 Produção e atividade de bacteriocinas em meio líquido MRS contendo concentração de NaCl similar a do charque (20%)

O isolado 69 foi inoculado em meio líquido MRS adicionado de 20% (p/v) de NaCl e incubado a 30°C por 24 h, 48 h e 72 h. A atividade antimicrobiana foi avaliada empregando-se o SLC, através da técnica de diluição crítica (Mayr-Harting *et al.*, 1972), onde o SLC foi submetido a diluições sucessivas na razão de 1:2 (v/v) em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7). Para verificar a atividade antimicrobiana empregou-se o teste de antagonismo (*spot on the lawn*), utilizando-se *L. sakei* ATCC15521 como indicador. A atividade da bacteriocina foi expressa em unidades arbitrárias por mL (UA/mL), definida como a recíproca da maior diluição onde foi observada a formação de halo de inibição do indicador. A atividade do isolado cultivado em meio MRS adicionado de 20% de NaCl foi comparada com a atividade observada para o mesmo isolado cultivado nas mesmas condições, porém em meio MRS sem adição de sal. Todas as análises foram repetidas três vezes e os resultados corresponderam às médias aritméticas dos valores observados em cada experimento.

3.4 Identificação da cepa bacteriocinogênica isolada (isolado 69)

A cepa selecionada foi identificada através da amplificação do rDNA, sequenciamento e identificação da região intergênica 16S-23S.

A extração do DNA foi feita de acordo com Abriouel *et al.* (2006). Uma cultura de 24 h a 30°C em meio líquido MRS (Scharlab, Barcelona, Espanha) foi submetida à centrifugação (7000 x g por 10 min). O resíduo contendo as células da cultura foi adicionado de 200 µL de TELS (25 mM Tris, 10 mM EDTA, 20% sacarose, 20 mg/ mL de lisozima) e 20 µL de mutanolisina (20U) e incubado a 37°C por 60 min com leve agitação. Em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e procedeu-se nova centrifugação (7000 x g por 3 min). O sobrenadante foi adicionado de 200 µL de isopropanol para a precipitação do DNA. Após centrifugação (7000 x g por 20 min), o resíduo contendo o DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado (7000 x g por 10 min) para a remoção do álcool. Os fragmentos de DNA foram ressuspensos em solução contendo RNase (50 µg/ L) e mantidos a -20°C até o momento da utilização (todos os reagentes utilizados: Sigma, Madrid, Espanha).

A amplificação do rDNA foi realizada de acordo com Cibik *et al.* (2000), utilizando-se os *primers* descritos por Brosius *et al.* (1978) e Brosius *et al.* (1980), conforme relatado em 3.2.2. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 80 V em gel contendo 1% (p/v) de agarose em tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador molecular de 1k pb, seguida de coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultravioleta. A purificação dos fragmentos e o sequenciamento da porção 16S de rDNA também foram realizados conforme descrito em 3.2.2.

A identificação da subespécie foi feita através de PCR utilizando-se *primers* sub-espécie-específicos descritos por Petrov *et al.* (2008). Para isso, 50 ng de DNA, extraído conforme descrito anteriormente, foram adicionados da mistura de reação contendo 60 pmol de cada *primer* (gadB21: 5'CGTTATGGATTTGATGGATATAAAGC 3' *forward* / GAD7: 5'ACTCTTCTTAA GAACAAGTTTAAACAGC-3' *reverse*); 2 µL de tampão de Taq polimerase; 2,5 U de enzima Taq polimerase; 200 µM de dNTPs e água bi-destilada estéril. O volume final de reação foi 50 µL. O DNA foi amplificado em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) utilizando-se o seguinte programa: 95°C por 2 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos; 45°C

por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguindo-se extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese a 80 V em gel contendo 2% (p/v) de agarose em tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador molecular de 100 pb, seguida de coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultravioleta.

3.5 Investigação da presença de genes codificadores para bacteriocinas produzidas por *L. lactis* no isolado 69

Uma vez que a cepa produtora de bacteriocina selecionada (isolado 69) foi identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, investigou-se a presença de genes para a produção das principais bacteriocinas produzidas por esta espécie de bactéria láctica, ou seja, lacticina 3147, lacticina 481, lactococcina A, lactococcina B, lactococcina G, lactococcina M, lactococcina Q, lactococcina 972 e nisina (Li e O'Sullivan, 2002, Alegria *et al.*, 2010). A pesquisa foi realizada através da amplificação do DNA total da cepa, empregando-se os *primers* específicos descritos na Tabela 5. As condições de reação foram as mesmas para todos os genes investigados, ou seja, 50 ng de DNA, extraído conforme 3.4, foram adicionados da mistura de reação contendo 60 pmol cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 5 µL de tampão de Taq-polimerase, 3 U de enzima Taq-polimerase e água bi-destilada estéril. O volume final de reação foi 50 µL. A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) empregando-se o mesmo programa para todas as bacteriocinas, variando-se apenas a temperatura de anelamento (55°C para nisina e 50°C para as demais bacteriocinas). O programa utilizado foi: 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto; (55°C / 50°C) por 1 min e 72°C por 1 min, seguindo-se extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), em tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador de peso molecular de 100 pb, seguida de coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultravioleta.

Tabela 5. *Primers* empregados na pesquisa de genes envolvidos na produção de lactocinas e outras bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp *lactis* no isolado 69.

Bacteriocina	Primer	Sequência	Referência
Nisina	nisA F	GGATAGTATCCATGTCTG	Li e O'Sullivan (2002)
	nisA R	CAATGATTCGTTCTCGAAG	
Lacticina 3147	Lac3147 F	GTCTTTGTGTTGTTTGGAGATG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	Lac3147 R	CAACTCCCGAAATAAATCATCG	
Lacticina 481	Lact481 F	CCAATGTCATTGCATCTGCAC	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	Lact481 R	GTCCTTATGTTGCTATTTCATC	
Lactococcina A	LactABM F	GAAGAGGCAATCAGTAGAG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	LactA R	GTGTTCTATTTATAGCTAATG	
Lactococcina B	LactABM F	GAAGAGGCAATCAGTAGAG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	LactB R	CCAGGATTTCTTTGATTTACTTC	
Lactococcina M	LactABM F	GAAGAGGCAATCAGTAGAG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	LactM R	GTGTATGGTCTAGCATAAG	
Lactococcina G	LactGQ F	GAAAGAATTATCAGAAAAAG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	LactGQ R	CCACTTATCTTTATTTCCCTCT	
Lactococcina Q	LactGQ F	GAAAGAATTATCAGAAAAAG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	LactGQ R	CCACTTATCTTTATTTCCCTCT	
Lactococcina 972	Lcn972 F	TTGTAGCTCCTGCAGAAGGAACATGG	Alegria <i>et al.</i> (2010)
	Lcn972 R	GCCTTAGCTTTGAATTCCTTACCAAAAAG	

Para a confirmação da presença dos genes investigados, os fragmentos amplificados foram purificados conforme descrito em 3.2.2. e sequenciados na empresa Lorgen – Genómica y Proteómica (Granada, Espanha). As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis nas bases de dados RDP e GenBank através do programa BLAST.

A transcrição da sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento, para a sequência de aminoácidos referente à nisina produzida pela cepa isolada neste estudo, foi realizada utilizando-se o programa DNASTar (Lasergene). A sequência de aminoácidos encontrada para a nisina produzida pela cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* 69 foi comparada com as sequências descritas para outras nisinas produzidas por *L. lactis* subsp. *lactis*, disponíveis nas bases de dados RDP e GenBank, empregando-se o programa *Lipman-Pearson Protein Alignment*.

3.6 Avaliação do potencial bioconservante da cepa bacteriocinogênica (isolado 69) no charque modelo

3.6.1 Preparo dos cultivos de bactérias halotolerantes para inoculação no charque modelo

Para inoculação do charque modelo, foram preparados dois *pools* de cepas halotolerantes contendo aproximadamente 10^8 UFC/ mL, sendo um constituído das nove cepas de halotolerantes a 3% de NaCl e outro das nove cepas de halotolerantes a 10% de NaCl, isoladas conforme descrito em 3.2.1. Os dois *pools* foram preparados em 40 mL de meio líquido TSB adicionado de 3% de NaCl e de 10% de NaCl, respectivamente, incubando-se as culturas a 37°C por 24 h.

A cultura da bactéria láctica bacteriocinogênica a ser avaliada quanto ao seu potencial bioconservante de charque foi obtida em 40 mL de meio líquido MRS, incubado a 30°C por 24 h de forma a atingir uma concentração de aproximadamente 10^9 UFC/ mL.

Os dois *pools* de bactérias halotolerantes e a cultura contendo a cepa bacteriocinogênica foram adicionados aos 40 litros de solução salina, de forma a atingir a concentração de 10^5 UFC de bactérias halotolerantes por mL de solução e 10^6 UFC da cepa bacteriocinogênica por mL de solução. Esta solução salina foi utilizada para a injeção das peças de carne durante a etapa de salga úmida de preparação do charque modelo teste. A solução salina utilizada na fabricação do charque modelo controle foi preparada da mesma forma, porém, adicionada apenas dos dois *pools* de micro-organismos halotolerantes.

3.6.2 Preparo do charque modelo

O charque modelo foi produzido na planta piloto de uma empresa fornecedora de produtos e soluções para a indústria de alimentos processados, localizada no estado de São Paulo, segundo o fluxograma apresentado na Figura 3.

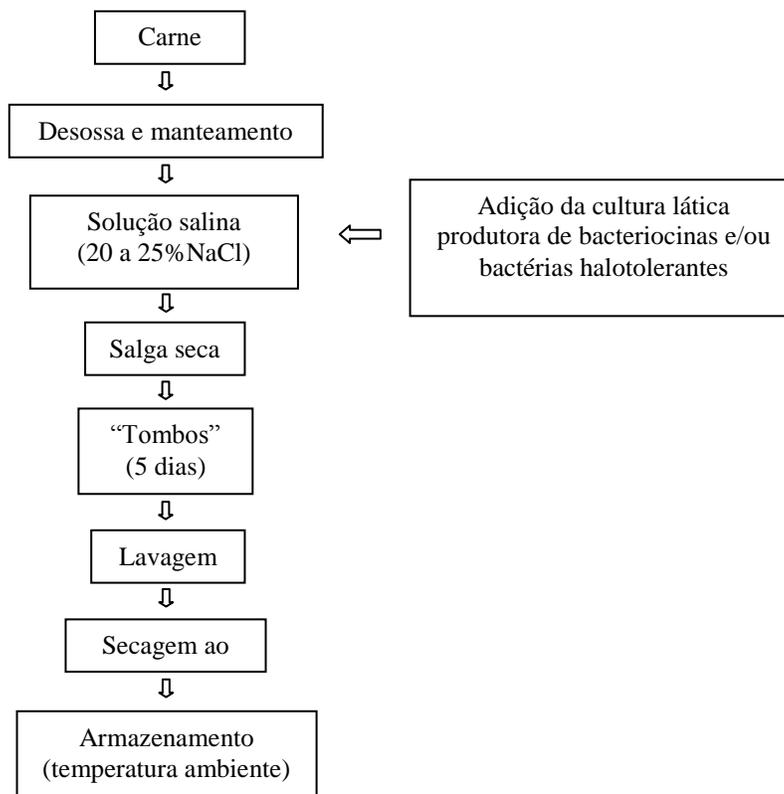


Figura 3. Fluxograma de processamento do charque modelo, adaptado de Torres *et al.* (1994).

Foram preparados dois tipos de charque modelo: “teste” (adicionado das bactérias halotolerantes isoladas de charque e da cepa bacteriocinogênica selecionada) e “controle” (adicionado apenas das bactérias halotolerantes isoladas de charque). A adição dos microorganismos nos charques modelo foi feita na etapa de salga úmida. Os cultivos preparados conforme item 3.6.1 foram adicionados à solução salina que foi injetada nas mantas de carne durante a salga úmida.

Cada charque modelo foi preparado com seis mantas de *Vastus lateralis* (patinho) de aproximadamente 5 kg e de 3 a 5 cm de espessura, segundo Shimokomaki *et al.* (1998) e Torres *et al.* (1994). Uma solução salina contendo 20 a 25% de NaCl foi injetada a 20% (v/p) nessas mantas, que foram subsequentemente submetidas à salga seca em piso de concreto. Durante este procedimento, as peças de carne foram empilhadas e separadas umas das outras por uma fina camada de sal grosso (aproximadamente 1 mm de espessura). Após 24 h, as pilhas foram

invertidas, isto é, as mantas do alto das pilhas foram colocadas na base das pilhas novas, mantendo-se a camada de sal entre as mantas. Após esta etapa, foi realizado o procedimento denominado “tombos”, ou seja, a inversão das pilhas a cada 24 h por cinco vezes, com o objetivo de garantir a secagem e distribuição de sal uniforme em todas as peças. Completados os tombos, as mantas foram lavadas com água para remoção do sal da superfície, penduradas em varais e secas diretamente ao sol, sendo recolhidas durante a noite para o piso de concreto e cobertas com lona. Este procedimento foi repetido por três a cinco dias, até que a carne atingisse umidade de aproximadamente 45% e atividade de água entre 0,70 – 0,75.

3.6.3 Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica do charque modelo foi realizada durante a fabricação do produto e também durante o armazenamento, através da enumeração de bactérias halotolerantes e bactérias lácticas. Os pontos de análise foram: matéria-prima crua; mantas após salga úmida, mantas após salga seca; mantas após o último tombo; mantas após secagem ao sol e produto pronto após 5, 10, 25 e 45 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Para a coleta das amostras, em cada um dos pontos de análise, removeu-se cerca de 200 g do produto que foram acondicionados em sacos plásticos para amostragem estéreis (NASCO), empregando-se uma faca esterilizada. As amostras foram levadas imediatamente ao laboratório e submetidas a uma nova etapa de amostragem, onde foram retirados 25 g de produto para a realização das análises microbiológicas.

Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Os resultados das contagens obtidas para o charque modelo “teste”, fermentado com a cepa produtora de bacteriocinas, foram comparados com aqueles observados no charque modelo “controle”, produzido sem adição de bactéria láctica bacteriocinogênica. As contagens expressas em UFC/g foram convertidas em log UFC/g e os resultados corresponderam às médias aritméticas das contagens já convertidas para log UFC/g.

3.6.3.1 Enumeração de bactérias halotolerantes

Para a enumeração de bactérias halotolerantes, empregou-se a metodologia descrita por Pinto, 1996. Amostras de 25 g foram acondicionadas em sacos plásticos para amostragem estéreis (NASCO) e adicionadas de 225 mL de água peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização em *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra), as amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% e semeadas por profundidade em TSA adicionado de 3% de NaCl para as medianamente halotolerantes e 10% NaCl para as altamente halotolerantes. Após incubação por 72 h a 37°C, efetuou-se a enumeração das colônias nas placas contendo entre 30-300 colônias.

3.6.3.2 Enumeração de bactérias lácticas

Para a enumeração de bactérias lácticas, empregou-se a metodologia descrita por Hall *et al.*, 2001. Amostras de 25 g foram acondicionadas em sacos plásticos para amostragem estéreis e adicionadas de 225 mL de água peptonada estéril 0,1%. Após homogeneização em *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra), as amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% e semeadas por profundidade em ágar MRS, após a solidificação das placas foi adicionada uma sobrecamada de ágar MRS para o favorecimento de ambiente microaerófilo seguindo-se incubação a 30°C por 48 h. Após essa etapa, efetuou-se a enumeração das colônias nas placas contendo entre 30-300 colônias.

3.6.4 Análise estatística

Os resultados da avaliação microbiológica observados para o charque modelo “teste” foram comparados com aqueles obtidos para o charque modelo “controle”, através da análise de variância (ANOVA) e do teste de médias de Tukey, adotando-se $p < 0,05$. Foi utilizado o programa estatístico Statistica versão 7.0, 2004.

3.7 Avaliação da ecologia microbiana do charque modelo

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, Jáen – Espanha. Sob supervisão do Prof. Dr. Antonio Gálvez e da Dr^a Hikmate Abriouel.

3.7.1 Obtenção dos micro-organismos presentes no charque modelo nas diferentes etapas de sua produção

Para avaliação da diversidade microbiana no charque modelo ao longo do processo de produção, retirou-se 200g de produto nos seguintes pontos: matéria-prima crua; mantas após salga úmida, mantas após salga seca; mantas após o último tomo tomo; mantas após secagem ao sol. Todas as amostras foram mantidas a -70°C até serem analisadas. Para a obtenção das células microbianas, 10 g de cada amostra foram homogeneizadas com 90 mL de solução salina (0,85% p/v) com auxílio de *stomacher* (Seward Medical, Inglaterra) e submetidas a centrifugação à baixa velocidade (800 x g por 1 min), para precipitação das partículas maiores. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à nova centrifugação, à alta velocidade (7000 x g por 10 min) para a precipitação das células bacterianas. O *pellet* contendo os micro-organismos presentes nas amostras de charque modelo foi utilizado para a extração do DNA a ser empregado na DGGE.

3.7.2 Extração do DNA

Para garantir a obtenção do material genético do maior número de micro-organismos presentes nas amostras analisadas, foram testados três métodos de extração de DNA: 1. extração por fenol (Abriouel *et al.*, 2006), 2. Extração empregando do kit comercial *Ilustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* e 3. extração por guanídeo (Abriouel *et al.*, (2006). Os métodos 1 e 2 já foram descritos anteriormente em 3.4 e 3.2.1, respectivamente. No terceiro método, os *pellets* contendo as células bacterianas, obtidos conforme 3.7.1, foram adicionados de 200 µL de TELS e 20 µL de mutanolisina (20U). Após incubação a 37°C por 60 min, sob leve agitação, adicionou-se 100 µL de proteinase K (1mg/mL), seguindo-se nova incubação a 55°C por 60 min. Após a adição de 500 µL de GES (100 mM tiocianato de guanídeo, 100 mM EDTA, 0,5% n-lauroylsarcosina), os tubos foram agitados por inversão (1 a 5 min, até a observação de lise

celular). Após resfriamento em gelo por 5 min, adicionou-se 250 µL de acetato amoníaco (7,5 M), seguindo-se nova agitação suave para a mistura das duas fases. As amostras mantidas no gelo por 10 min, e em seguida adicionadas de 0,5 mL de clorofórmio-isopropanol (24:1) e novamente submetidas a agitação para a mistura de fases. Após centrifugação (7000 x g por 10 min), a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 459 µL de isopropanol para a precipitação do DNA. Após nova centrifugação (7000 x g por 20 min), o resíduo contendo o DNA precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e mais uma vez centrifugado (7000 x g por 10 min) para a remoção do álcool. Os fragmentos de DNA foram ressuspensos em solução contendo RNase (50 µg/ L) e mantidos a -20°C até o momento da utilização (todos os reagentes utilizados: Sigma, Madrid, Espanha).

3.7.3 Amplificação da região hipervariável V3 da porção 16S de rDNA

Antes da aplicação dos extratos de DNA no gel de poliacrilamida para a obtenção dos perfis genéticos na DGGE, procedeu-se a amplificação da região hipervariável V3 da porção 16S de rDNA, através de duas PCRs consecutivas (*nested* PCR), de acordo com Abriouel *et al.* (2006), utilizando-se *primers* descritos em Ogier *et al.* (2002). Na primeira PCR procedeu-se a amplificação de um fragmento da porção 16S de rDNA composto por 700 pb e que contém a região V3. Para isso, 50 ng do DNA total, extraído conforme 3.7.2, foram adicionados à uma mistura de reação contendo 60 pmol de cada *primer* (WO1: 5'-AGAGTTTGATC[AC]TGGCTC-3') / WO12: 5' -TACGCATTTACACC[GT]CTACA- 3'); 5 µL de tampão de Taq polimerase; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTPs; 2,5 U de Taq polimerase nativa e água bi-destilada estéril (tampão Taq polimerase e Taq polimerase nativa, Invitrogen, EUA; demais reagentes, GE healthcare, EUA). O volume final de reação foi 50 µL. A amplificação ocorreu em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) utilizando-se o seguinte programa: 96°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 96°C por 1 min; 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 min, seguindo-se extensão final a 72°C por 2 minutos. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese (80 V) em gel de agarose (1% p/v), com tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador molecular de 1 kb, seguida de coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultravioleta, para confirmar a amplificação.

Os fragmentos de 700 pb, amplificados com os *primers* WO1 e WO12, foram utilizados como molde para a segunda PCR, na qual foi amplificada a região hipervariável V3 de 16S rDNA. Para isso, 1 µL do produto obtido na PCR anterior foi adicionado da mistura de reação contendo 60 pmol de cada *primer* (HDA1 – *GC clamp*: 5'-**CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACTCCTA** CGGGAGGCAGCAGT - 3') / HDA2: 5' – GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC - 3'); 5 µL de tampão de Taq polimerase; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTPs; 2,5 U de Taq polimerase e água bi-destilada estéril. O volume final de reação foi 50 µL. A parte destacada em negrito no *primer* HDA1 corresponde ao fragmento *GC clamp*, adicionado para impedir a desnaturação completa da dupla fita de DNA no momento da DGGE. A amplificação ocorreu em termociclador (Eppendorf, Mastercycler Personal) utilizando-se o seguinte programa: 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 min, seguindo-se extensão final a 72°C por 7 minutos. Mais uma vez, os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese (80 V) em gel de agarose (1% p/v), com tampão 1 x TBE, utilizando-se marcador molecular de 1 kb, seguida de coloração com brometo de etídeo e observação sob luz ultravioleta, para confirmar a amplificação dos fragmentos contendo 300 pb, correspondentes à região V3 a serem aplicados na DGGE.

3.7.4 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A eletroforese dos fragmentos amplificados com os *primers* HDA1-GC e HDA2 foi realizada em gel de poliacrilamida (0,8% p/v) com gradiente de desnaturação crescente, obtido através da mistura de duas soluções estoque, *low* e *high*, contendo 30% e 60% dos agentes desnaturantes, respectivamente. A composição das soluções estoque está descrita a seguir: *low* – 10 mL solução de acrilamida a 40 % (p/v); 1 mL de tampão 1 x TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA, pH 8,3); 6,3 g de uréia (7M); 6 mL de formamida e água bi-destilada estéril até completar 50 mL / *High* - 10 mL solução de acrilamida a 40 % (p/v); 1 mL de tampão 1 x TAE; 12,6 g de uréia (7M); 12 mL de formamida e água bi-destilada estéril até completar 50 mL. Para o preparo do gel, 20 mL de cada solução estoque foram adicionados de 62,5 µL de persulfato amônico (APS) e 62,5 µL de temed (N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamino), para a polimerização da acrilamida, e vertidos nos moldes com auxílio de bomba

injetora (Pump P-1, Pharmacia Biotech) de forma a obter um gradiente crescente de desnaturação (todos os reagentes utilizados: Sigma, Madrid, Espanha; com exceção da acrilamida: BioRad, Richmond, Canadá).

Para a separação dos perfis genéticos, 40 μL do produto de amplificação contendo os fragmentos da região V3 de 16S rDNA foram aplicados ao gel de poliacrilamida e submetidos à eletroforese (85 V e 65°C por 17 horas) em tampão 1 x TAE, utilizando-se o sistema universal de detecção de mutação Dcode (Bio-Rad, Richmond, CA). Os fragmentos separados durante a eletroforese foram recortados do gel e eluídos em 20 μL de água bi-destilada estéril. Após a eluição, os fragmentos foram novamente amplificados com os *primers* HDA1 (sem *GC clamp*) e HDA2, nas mesmas condições descritas em 3.7.3, purificados e submetidos ao sequenciamento, conforme descrito em 3.2.1. Os micro-organismos, presentes nas amostras de charque, foram identificados por comparação das sequências obtidas com as disponíveis nas bases de dados RDP e GenBank, utilizando-se o programa BLAST.

Para a avaliação da diversidade microbiana e da dinâmica das populações presentes no charque modelo, foram considerados apenas os resultados da DGGE obtidos para as amostras fermentadas de maneira natural. A avaliação da influência da adição da cepa bacteriocinogênica na dinâmica populacional do charque modelo foi realizada através da comparação entre os resultados de DGGE obtidos para os dois tipos de charque modelo preparados (com e sem a adição da cepa produtora de bacteriocina).

4. Resultados e Discussão

4.1 Identificação das bactérias halotolerantes isoladas a partir de charque

Nove entre os 18 isolados de bactérias halotolerantes foram obtidos em meio contendo 10% de NaCl e por isso considerados como altamente halotolerantes. Os outros nove isolados foram obtidos em meio contendo 3% de NaCl e por isso considerados como medianamente halotolerantes. Através do sequenciamento da porção 16S de rDNA, verificou-se que todos os isolados pertenceram ao gênero *Staphylococcus*, apresentando variações em relação às espécies (Tabela 6).

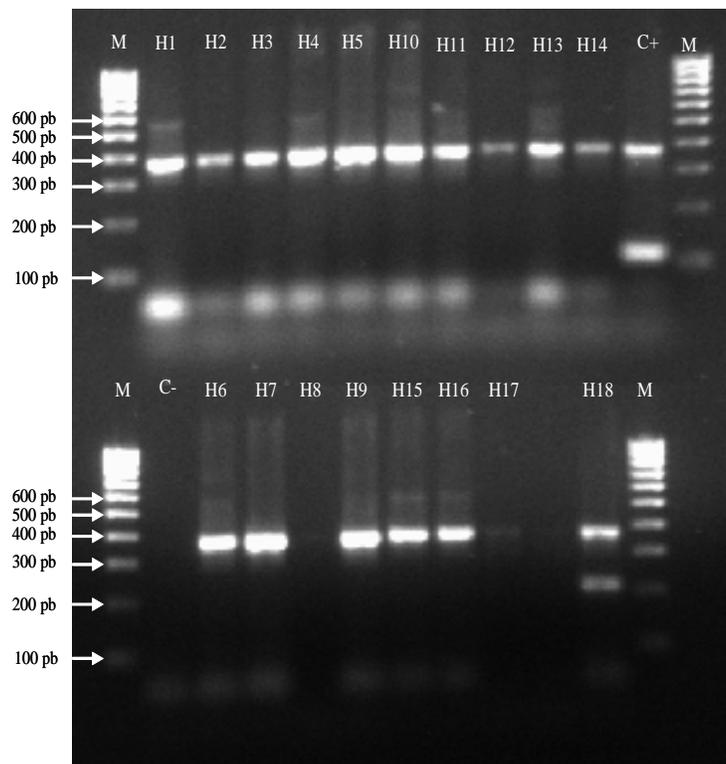
Tabela 6. Identificação, através de sequenciamento da porção 16S de rDNA, dos micro-organismos medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes isolados de charque.

Isolado	Condição de isolamento	Identificação
H1		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H2		<i>Staphylococcus warneri</i> / <i>S. pasteurii</i>
H3		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H4	TSA contendo 3% (p/v) de NaCl	<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H5	(Medianamente halotolerantes)	<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H6		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H7		<i>Staphylococcus warneri</i> / <i>S. pasteurii</i>
H8		<i>Staphylococcus</i> sp.
H9		<i>Staphylococcus warneri</i> / <i>S. pasteurii</i>
H10		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H11		<i>Staphylococcus</i> sp.
H12		<i>Staphylococcus</i> sp.
H13	TSA contendo 10% (p/v) de NaCl	<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H14	(Altamente halotolerantes)	<i>Staphylococcus</i> sp.
H15		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H16		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>
H17		<i>Staphylococcus</i> sp.
H18		<i>Staphylococcus xylosus</i> / <i>S. saprophyticus</i>

Todas as cepas foram amplificadas com os *primers* tag765 e Tstag 422, gerando fragmentos de 370 pb, correspondentes a esse gênero (Morot-Bizot *et al.*, 2004). Estes resultados confirmaram aqueles obtidos pelo sequenciamento da porção 16S de rDNA, ou seja, as 18 cepas pertenceram ao gênero *Staphylococcus*.

Em relação às espécies, cinco micro-organismos medianamente halotolerantes (H1, H3, H4, H5 e H6) e quatro altamente halotolerantes (H10, H13, H15 e H16) tiveram seu DNA amplificado com os *primers* Xyl F e Xyl R, gerando bandas de 539 pb, referentes aos fragmentos esperados para a espécie *S. xylosus* (Morot-Bizot *et al.*, 2004). Uma cepa altamente halotolerante (H18) apresentou uma banda de 221 pb após a amplificação de seu DNA com os *primers* Sap 1 e Sap 2, indicando tratar-se de *S. saprophyticus* (Morot-Bizot *et al.*, 2004). Em relação às demais cepas (H2, H7, H8, H9, H11, H12, H14 e H17), não foi possível a confirmação da espécie, uma vez que não foi possível obter amplificação dos fragmentos de DNA com nenhum dos *primers* espécie-específicos utilizados neste estudo. Nenhuma cepa apresentou gene para a espécie *S. aureus*. Estes resultados concordam com outros trabalhos encontrados na literatura que relatam a presença de *S. xylosus* e *S. saprophyticus* na microbiota de produtos cárneos fermentados (Cocolin *et al.*, 2001; Fontana *et al.*, 2005; Villani *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Tu *et al.*, 2010).

A Figura 4 apresenta o gel com os fragmentos amplificados na PCR-multiplex, utilizada para a confirmação da identificação dos micro-organismos medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes isolados de charque.



M, marcador de peso molecular; C+, controle positivo (*S. aureus* ATCC 95923); C-, controle negativo da reação; H1-H9, cepas de micro-organismos medianamente halotolerantes; H10-H18, cepas de micro-organismos altamente halotolerantes.

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) dos fragmentos de DNA das cepas medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes, isoladas de charque, amplificadas na PCR-multiplex com os *primers* tag765/Tstag422, Sap1/Sap2, XylF/XylR e Sa422-1/Sa422-2.

Estes resultados indicam que bactérias halotolerantes do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota naturalmente presente no charque. Diversos autores já relataram a presença de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* em charque e outros produtos cárneos fermentados, atribuindo a estes micro-organismos a definição de importantes características do produto final como cor, textura e sabor (Shimikomaki *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 2002; Aymerich *et al.*, 2003; Comi *et al.*, 2005; Rantsiou *et al.*, 2005; Fontán *et al.*, 2007, Talon *et al.*, 2007; Casquete *et al.*, 2011).

4.2 Obtenção e caracterização da cepa bacteriocinogênica a ser aplicada ao charque modelo

Das 100 colônias obtidas a partir de charque, capazes de produzir zonas de inibição ao redor do indicador *L. sakei* ATCC 15521 no teste de tripla camada em ágar MRS, e confirmadas como bactérias lácticas, seis confirmaram atividade inibitória contra *L. sakei* ATCC 15521 pelo teste *spot on the lawn*.

Diversos trabalhos encontrados na literatura relatam o isolamento de cepas bacteriocinogênicas a partir de produtos cárneos, demonstrando que este tipo de alimento é uma fonte em potencial para a descoberta de novas proteínas microbianas com atividade inibitória contra micro-organismos importantes para os alimentos. Todorov *et al.* (2010) reportaram o isolamento de duas cepas de *Lactobacillus plantarum* (bacST202Ch e bacST216Ch) em produtos cárneos portugueses (Beloura e Chouriço), ambas com capacidade de inibir a multiplicação de bactérias Gram positivas com importância para a deterioração destes produtos. Já Belgacem *et al.* (2010) isolaram 24 cepas de *Enterococcus faecium* de um produto cárneo fermentado artesanalmente da Tunísia, todas com genes para a produção de enterocinas A, B e P e com atividade inibitória contra bactérias Gram positivas deteriorantes e patogênicas de importância em alimentos, entre elas, *Listeria* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* CECT 877. Liu *et al.* (2008) também isolaram uma cepa bacteriocinogênica, *Lactobacillus pentosus* 31-1, produtora de pentocina 31-1 com atividade contra *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp. e *Escherichia* spp. a partir de produto cárneo fermentado tipicamente chinês, conhecido como Xuan-Wei.

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam os resultados obtidos nos testes de sensibilidade a enzimas proteolíticas, pH e agentes químicos, respectivamente, para os seis isolados que confirmaram efeito inibitório contra o indicador *L. sakei* ATCC 15521.

Tabela 7. Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC* das bactérias lácticas isoladas de charque à pepsina e à protease.

Isolado nº	Enzimas	
	Pepsina	Protease
10	+	+
66	-	-
69	-	-
71	-	+
93	-	+
94	-	-
<i>L. sakei 2a</i>	-	-

*sobrenadante livre de células; (+), apresentou atividade antimicrobiana (resistente); (-), não apresentou atividade antimicrobiana (sensível).

Tabela 8. Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC* das bactérias lácticas isoladas de charque a diferentes valores de pH.

Isolado nº	pH				
	2	4	8	10	12
10	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-
69	+	+	+	+	-
71	-	-	-	-	-
93	-	+	-	-	-
94	+	+	+	+	-
<i>L. sakei 2a</i>	+	+	+	+	+

*sobrenadante livre de células; (+), apresentou atividade antimicrobiana (resistente); (-), não apresentou atividade antimicrobiana (sensível).

Tabela 9. Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC* das bactérias lácticas isoladas de charque a agentes químicos.

Amostra	Químicos			
	Uréia (1%)	SDS (1%)	EDTA (1%)	Tween 80 (1%)
10	-	-	-	-
66	-	-	-	-
69	+	+	+	+
71	+	-	-	-
93	-	-	-	-
94	+	+	-	+
<i>L. sakei 2a</i>	+	+	+	+

*sobrenadante livre de células; (+), apresentou atividade antimicrobiana (resistente); (-), não apresentou atividade antimicrobiana (sensível); SDS, dodecil sulfato de sódio; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético.

Quanto à sensibilidade a enzimas proteolíticas, os isolados 10, 71 e 93 mantiveram atividade após tratamento com pepsina e protease, indicando que as substâncias responsáveis pela atividade inibitória não possuem origem protéica. Já as cepas 66, 69 e 94 perderam o efeito contra *L. sakei* ATCC 15521 após o tratamento com as duas enzimas testadas, indicando a origem protéica das substâncias responsáveis pela atividade contra o indicador e sugerindo a produção de bacteriocinas.

Para os testes realizados com diferentes valores de pH e agentes químicos, observou-se que o isolado 66 perdeu totalmente seu potencial inibitório após tratamento em todas as condições avaliadas, inviabilizando sua utilização como agente de bioconservação. Já os isolados 69 e 94 apresentaram resultados bastante semelhantes aos observados para a cepa controle (*L. sakei* 2a bacteriocinogênica), corroborando com a hipótese de produção de bacteriocinas por esses dois isolados. Esses resultados apresentam-se bastante interessantes no que diz respeito ao emprego dos isolados 69 e 94 como agentes de bioconservação, devido à atividade inibitória mesmo em valores extremos de pH ou na presença de todos os agentes químicos testados (ureia, SDS, Tween 80 e EDTA), com exceção do EDTA para o isolado 94.

Na Tabela 10 podem ser observados os resultados referentes à sensibilidade do sobredante livre de células dos seis isolados ao tratamento térmico a 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100°C.

Tabela 10. Sensibilidade das substâncias antimicrobianas presentes no SLC* das bactérias lácticas isoladas de charque ao tratamento térmico a 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100°C.

Isolado n ^o	Temperatura														
	37°C			45°C			60°C			80°C			100°C		
	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>L. sakei</i> 2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*sobrenadante livre de células; (+), apresentou atividade antimicrobiana (resistente); (-), não apresentou atividade antimicrobiana (sensível).

Observando-se os resultados do teste de sensibilidade ao tratamento térmico, verifica-se que os isolados 69 e 94 apresentaram resultados semelhantes ao controle, indicando que as bacteriocinas produzidas por esses micro-organismos são termorresistentes. Observou-se ainda que o isolado 69 apresentou os melhores resultados, sendo suas bacteriocinas resistentes ao tratamento com temperaturas de até 100°C por 120 min, enquanto que as bacteriocinas produzidas pelo isolado 94 resistiram a temperaturas de até 80°C por 120 min. Estes resultados também são importantes no que se refere à aplicação desses isolados como conservantes naturais em alimentos, que poderão ser utilizados mesmo em matérias primas que sofrerão tratamento térmico, pois não haverá perda da atividade antimicrobiana.

Através dos resultados obtidos para os testes descritos até o momento, os isolados 69 e 94 apresentaram-se como produtores de bacteriocinas interessantes para a aplicação como agente bioconservante, apresentando resultados semelhantes aos encontrados na literatura para bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas isoladas de alimentos. As bacteriocinas produzidas pelas cepas *Lactobacillus plantarum* bacST202Ch, bacST216Ch (Todorov *et al.*, 2010) e *Lactobacillus pentosus* 31-1 (Liu *et al.*, 2008) isoladas nos trabalhos descritos anteriormente, também apresentaram resistência ao calor, a valores extremos de pH e a alguns dos agentes químicos testados como SDS e Tween 80. A enterocina LR/6, isolada por Kumar *et al.* (2010), também manteve o efeito antimicrobiano mesmo após tratamento com altas temperaturas (fervura e autoclavagem), valores extremos de pH (2,0 – 8,0), ácidos orgânicos e substâncias surfactantes. O mesmo foi observado por Gao *et al.* (2010) que isolaram a cepa *Lactobacillus sakei* C2 de repolho fermentado na China, produtora de uma bacteriocina designada por sakacina C2 que, além de apresentar um amplo espectro de atividade, também apresentou características de termorresistência (121°C por 15 minutos) e manutenção da atividade após tratamento com valores de pH variando entre 3,0 e 8,0. Esses dados encontrados na literatura demonstram que as características apresentadas pelos isolados 69 e 94 são bastante relevantes para a escolha das cepas bacteriocinogênicas e/ou suas bacteriocinas a serem empregadas na bioconservação de alimentos. Assim, esses dois isolados foram selecionados e submetidos aos testes subsequentes.

A atividade antimicrobiana dos isolados 69 e 94 contra micro-organismos halotolerantes isolados de charque está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11. Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC* dos isolados 69 e 94 contra bactérias halotolerantes isoladas de charque.

Micro-organismo indicador	Meio de cultivo	Condições de incubação (tempo / temperatura)	Atividade inibitória (mm de halo)	
			Isolado 69	Isolado 94
<i>Staphylococcus xylosus</i> H1	TSA 3%	37°C / 72 h	19	15
<i>Staphylococcus warneri / pasteurii</i> H2	TSA 3%	37°C / 72 h	15	12
<i>Staphylococcus xylosus</i> H3	TSA 3%	37°C / 72 h	9	9
<i>Staphylococcus xylosus</i> H4	TSA 3%	37°C / 72 h	10	9
<i>Staphylococcus xylosus</i> H5	TSA 3%	37°C / 72 h	12	12
<i>Staphylococcus xylosus</i> H6	TSA 3%	37°C / 72 h	17	16
<i>Staphylococcus warneri / pasteurii</i> H7	TSA 3%	37°C / 72 h	-	12
<i>Staphylococcus</i> sp. H8	TSA 3%	37°C / 72 h	9	15
<i>Staphylococcus warneri / pasteurii</i> H9	TSA 3%	37°C / 72 h	12	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> H10	TSA 10%	37°C / 72 h	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp. H11	TSA 10%	37°C / 72 h	12	-
<i>Staphylococcus</i> sp. H12	TSA 10%	37°C / 72 h	-	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> H13	TSA 10%	37°C / 72 h	11	-
<i>Staphylococcus</i> sp. H14	TSA 10%	37°C / 72 h	-	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> H15	TSA 10%	37°C / 72 h	10	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> H16	TSA 10%	37°C / 72 h	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp. H17	TSA 10%	37°C / 72 h	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> H18	TSA 10%	37°C / 72 h	9	-

*sobrenadante livre de células; (-) não apresentou atividade antimicrobiana; TSA 3%, TSA adicionado de 3% (p/v) de NaCl; TSA 10%, TSA adicionado de 10% (p/v) de NaCl, (Todos os meios de cultivo utilizados: OXOID, Basingstoke, Inglaterra).

Em relação aos micro-organismos medianamente halotolerantes, pode-se observar que os dois isolados foram capazes de inibir oito das nove cepas de *Staphylococcus* spp. testadas, produzindo halos de inibição variando entre 9 mm (para as cepas *S. xylosus* H3 e *S. saprophyticus* H8) e 19 mm (para a cepa *S. xylosus* H1). Para aos micro-organismos altamente halotolerantes, obtidos a 10% de NaCl, observou-se que o isolado 69 apresentou um espectro de atividade mais amplo, quando comparado ao isolado 94, sendo ativo contra duas cepas de *Staphylococcus* spp. (H11 e H13), uma cepa de *S. xylosus* (H15) e uma cepa de *S. saprophyticus* (H18), com halos de inibição variando de 9 a 12 mm, enquanto que o isolado 94 não foi capaz de inibir nenhuma das nove cepas utilizadas neste estudo, o que inviabiliza sua utilização como agente de bioconservação do charque.

A Tabela 12 apresenta os resultados de atividade dos isolados 69 e 94 contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de importância em alimentos. Já na Tabela 13 podem ser observados os resultados de atividade contra bactérias lácticas isoladas de alimentos.

Tabela 12. Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC* dos isolados 69 e 94 contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de importância em alimentos.

Micro-organismo indicador	Origem	Meio de cultivo	Condições de incubação (tempo / temperatura)	Atividade inibitória (mm de	
				Isolado 69	Isolado 94
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	Ágar BHI	37°C / 48 h	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	Ágar BHI	37°C / 48 h	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	Ágar BHI	37°C / 48 h	-	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	Ágar BHI	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	TSAye	37°C / 48 h	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	ScottA	TSAye	37°C / 48 h	-	-
<i>E. aerogenes</i>	ATCC 13048	Ágar BHI	37°C / 48 h	-	-
<i>L. sakei</i> 2a	Leite	Ágar MRS	30°C / 48 h	12	-
<i>L. acidophilus</i>	Rhodia LA5	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
<i>L. acidophilus</i>	Rhodia LAC4	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
<i>L. acidophilus</i>	Rhodia LA14	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
<i>L. paracasei</i>	Rhodia LBC82	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
<i>L. cremoris</i>	Hansen R704	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	-
<i>E. hirae</i>	Leite de cabra	Ágar BHI	37°C / 48 h	-	-
<i>L. monocytogenes</i> 103	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	9	-
<i>L. monocytogenes</i> 106	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	11	-
<i>L. monocytogenes</i> 603	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	10	-
<i>L. monocytogenes</i> 302	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	11	-
<i>L. monocytogenes</i> 620	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	9	-
<i>L. monocytogenes</i> 506	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	15	-
<i>L. monocytogenes</i> 211	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	10	-
<i>L. monocytogenes</i> 426	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i> 711	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i> 709	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	11	-
<i>L. monocytogenes</i> 724	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i> 703	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	11	-
<i>L. monocytogenes</i> 712	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	9	-
<i>L. monocytogenes</i> 637	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	10
<i>L. monocytogenes</i> 408	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i> 607	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	12	-
<i>L. monocytogenes</i> 104	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	13	-
<i>L. monocytogenes</i> 422	Frigorífico**	TSAye	37°C / 48 h	10	-

*sobrenadante livre de células; (**), Cepas isoladas de frigorífico abatedouro de aves em trabalho desenvolvido no laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP (Chiarini *et al.*, 2009); (-) não apresentou atividade antimicrobiana; BHI, infusão de cérebro e coração; MRS, de *Man Rogosa and Sharpe*; TSAye, Triptona de soja acrescido de 0,6% de extrato de levedura; (Todos os meios de cultivo utilizados: OXOID, Basingstoke, Inglaterra).

Tabela 13. Atividade inibitória das bacteriocinas presentes no SLC* dos isolados 69 e 94 contra bactérias lácticas isoladas de alimentos.

Micro-organismo indicador	Origem	Meio de cultivo	Condições de incubação (tempo / temperatura)	Atividade inibitória (mm de halo)	
				Isolado 69	Isolado 94
<i>L. bulgaricus</i> B 5**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	-
<i>L. bulgaricus</i> B 15**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	12	-
<i>L. bulgaricus</i> B 16**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	-
<i>L. lactis</i> B 17**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	9
<i>L. bulgaricus</i> B 2**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	9	-
<i>L. lactis</i> D 6**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	-
<i>L. lactis</i> D 2**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	16
<i>L. lactis</i> D 3**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	17
<i>L. bulgaricus</i> B 1**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
<i>L. lactis</i> D 4**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	10	-
<i>L. lactis</i> D 5**	Leite de cabra	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	10
<i>E. faecium</i> S 5**	Leite de cabra	Ágar BHI	37°C / 48 h	9	8
<i>E. faecium</i> S 8**	Leite de cabra	Ágar BHI	37°C / 48 h	15	-
Isolado 69	Charque	Ágar MRS	30°C / 48 h	-	-
Isolado 94	Charque	Ágar MRS	30°C / 48 h	17	-

*sobrenadante livre de células; (**), Cepas de bactérias lácticas isoladas em trabalho desenvolvido no laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP; (-), não apresentou atividade antimicrobiana; BHI, infusão de cérebro e coração; MRS, *de Man Rogosa and Sharpe*; (Todos os meios de cultivo utilizados: OXOID, Basingstoke, Inglaterra).

Os resultados apresentados nas Tabelas 12 e 13 indicam que o isolado 69 foi capaz de inibir uma das três cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* ScottA, diversas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carne de frango e ambiente de frigorífico, outras bactérias lácticas como *L. sakei* 2a, além de várias bactérias lácticas isoladas de alimentos, incluindo o isolado 94 obtido neste trabalho. Porém, não apresentou atividade inibitória contra ele mesmo, o que é uma característica das bactérias produtoras de bacteriocinas. Já o isolado 94 apresentou um espectro de atividade bem mais limitado, sendo capaz de inibir apenas uma cepa de *L. monocytogenes* isolada de frigorífico e cinco cepas de bactérias lácticas isoladas de alimentos. Assim como o isolado 69, o isolado 94 também se apresentou imune às bacteriocinas por ele produzidas. Com base nestes dados, o isolado 69 foi selecionado para a aplicação no charque modelo e avaliação nos testes referentes à bioconservação do produto.

As Figuras 5 e 6 ilustram as curvas de multiplicação a 30°C do isolado 69 em caldo MRS contendo 0%, 3% e 5% de NaCl e 10%, 15% e 20% de NaCl, respectivamente.

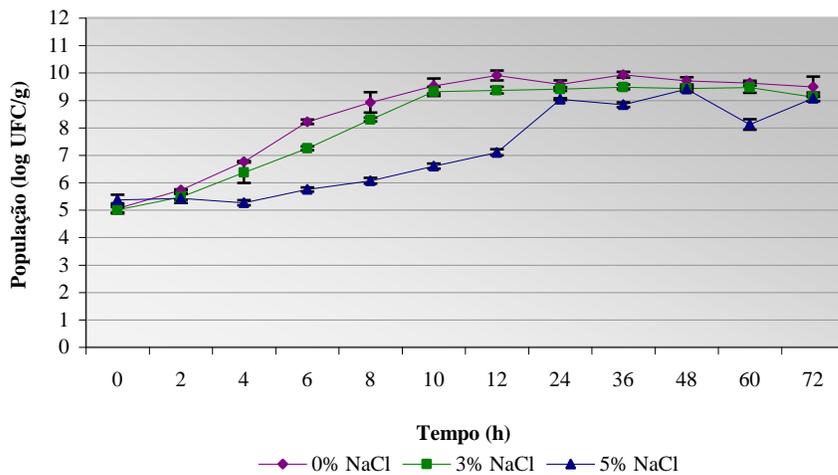


Figura 5. Representação gráfica da curva de multiplicação do isolado 69 a 30°C em caldo MRS contendo 0%, 3% e 5% de NaCl.

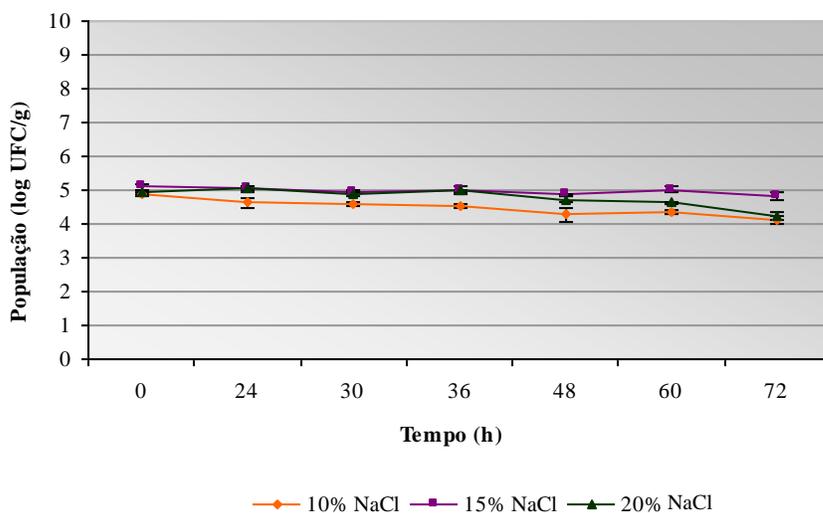


Figura 6. Representação gráfica da curva de multiplicação do isolado 69 a 30°C em caldo MRS contendo 10%, 15% e 20% de NaCl.

O isolado 69 foi capaz de se multiplicar em caldo MRS adicionado de até 5% de NaCl de forma semelhante à observada em caldo MRS sem adição de sal, apresentando um aumento na população de 4 ciclos logarítmicos e alcançando as mesmas populações para todas as concentrações analisadas após 72 h de incubação. Pode-se observar ainda que a duração da fase lag durante a multiplicação em 5% de NaCl foi maior comparada à fase lag observada durante a multiplicação em MRS sem adição de sal ou adicionado de 3% de NaCl, indicando que a velocidade de multiplicação do micro-organismo diminui conforme aumenta a concentração de sal no meio de cultura.

Diferentemente do que ocorreu para a multiplicação em MRS adicionado de até 5% de sal, observou-se que o isolado 69 não foi capaz de se multiplicar em meio MRS com concentração de NaCl a partir de 10%. No entanto, a população manteve-se estável por até 72h, mesmo no meio MRS adicionado de 20% de sal, o que permite concluir que este micro-organismo é capaz de sobreviver satisfatoriamente no charque por este período.

Em relação à produção de bacteriocinas em meio de cultura contendo concentração de sal similar à encontrada no charque (20%), verificou-se que o isolado 69 foi capaz de inibir o indicador *L. sakei* ATCC 15521 em todos os tempos analisados. Porém, em relação à atividade de bacteriocinas na presença de 20% de sal, verificou-se uma flutuação ao longo das 72h de análise: após 24 h, a atividade das bacteriocinas produzidas em meio adicionado de 20% de NaCl foi menor do que aquela apresentada pelas bacteriocinas produzidas em meio sem adição de sal (6.400 UA/mL e 12.800 UA/mL, respectivamente). Já após 48 h de incubação observou-se uma redução na atividade das bacteriocinas apenas para o isolado cultivado em meio sem adição de NaCl, e esta atividade foi idêntica àquela produzida em meio adicionado de 20% de NaCl (6.400 UA/mL). Após 72 h, ocorreu uma nova redução na atividade das bacteriocinas, desta vez para as duas condições analisadas que apresentaram, mais uma vez, atividade idêntica (400 UA/mL).

4.3 Identificação da cepa bacteriocinogênica isolada

A sequência obtida para a porção 16S de rDNA da cepa 69 apresentou 99% de homologia com as sequências descritas para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CAG18a (nº acesso GenBank: AB572041.1; Pang *et al.*, 2011) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Vm118 (nº acesso GenBank: HM638419.1; Francesca *et al.*, 2011). Em relação à identificação da subespécie, a amplificação

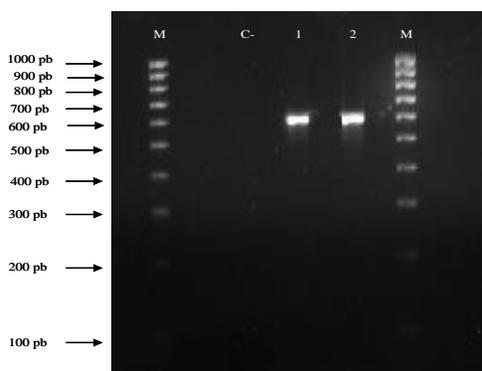
do DNA da cepa 69 com os *primers* sub-espécie-específicos (*gadB21* e *GAD7*) gerou bandas de 580 pb, correspondentes à subespécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Petrov *et al.*, 2008). A sequência completa de nucleotídeos obtida para a cepa 69 e a foto do gel com os fragmentos amplificados na PCR para confirmação da subespécie podem ser observadas nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

```

GTCTNCNTT NAGAANCGCCCTCCTT GCGGTTANGCAACCTACTTCGGNCACTCCCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGGCGAGTTGCAGCCTACAAT
CCGAAGTGAAGATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATCACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCC
AGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGAGTGCCCAACTTAAT
GATGGCAACTAACAAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCAC
CTGTATCCCGTGTCCCGAAGGAACCTCCATCTCTAGGAATAAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCG
AATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTG
CTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGAGA AACTTATAGTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGC TCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTGAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTCGCCACCGGTGTTCTCCATATATCT
ACGCAATTCACCGCTACACATGGAATTCCACTCTCCTCCTGC ACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGNGCCAC
TGCCTTTTACACCAGACTTAATAAACACCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAAATCCGGACAACGCTCGGGACCTACGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAGTTACCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTACCAACGTTCTTCTCTAC
CAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTACGCGGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTG
CTGCC TCCCAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCACCCCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGA
GCCTTACCTACCAACTAGCTAATAACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCC

```

Figura 7. Sequência completa de nucleotídeos da porção 16S de rDNA da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69.



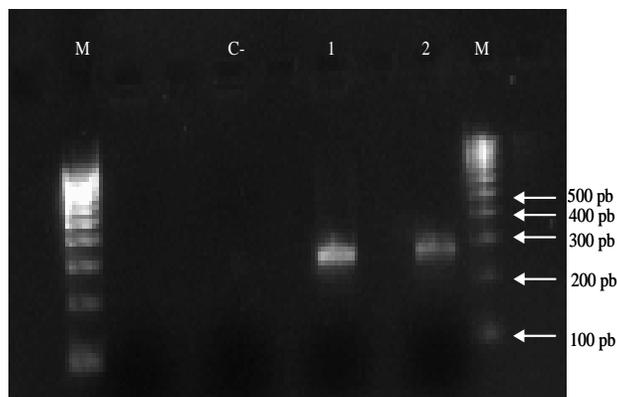
M, marcador de peso molecular; C-, controle negativo da reação; 1 e 2, repetições das amostras de DNA da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* 69.

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) dos fragmentos de DNA da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* 69 amplificados com os *primers* sub-espécie-específicos *gadB21* e *GAD7*.

4.4 Investigação da presença de genes codificadores para bacteriocinas produzidas por *L. lactis* no isolado 69

A amplificação do DNA total da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 com os *primers* específicos para os genes codificadores das principais bacteriocinas produzidas por *L. lactis* revelou a presença apenas de gene codificador para nisina. As PCRs com os *primers* para

lacticina 3147, lacticina 481, lactococcina A, lactococcina B, lactococcina G, lactococcina M, lactococcina Q, lactococcina 972 não geraram fragmentos amplificados. A reação de amplificação com os *primers* para o gene estrutural de nisina gerou fragmentos contendo 300 pb, correspondentes a esta bacteriocina (Aso *et al.*, 2008), que podem ser visualizados na Figura 9.



M, marcador de peso molecular; C-, controle negativo da reação; 1 e 2, repetições das amostras de DNA da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* 69.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos de DNA da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* 69 amplificados com *primers* para o gene codificador de nisina.

A presença do gene estrutural de nisina na cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 foi confirmada através do sequenciamento dos fragmentos amplificados. A comparação da sequência obtida para a cepa 69 com as sequências disponíveis nas bases de dados pesquisadas indicou que o gene presente na cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 apresenta 98% de homologia com os genes descritos para a produção de nisina Z. A sequência de nucleotídeos obtida para este gene, bem como a comparação com as sequências descritas para os genes codificadores de nisina presentes nas cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27 (nº de acesso GenBank: AB375441.1 ; Aso *et al.*, 2008), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213 (nº de acesso GenBank: AB083093; Park *et al.*, 2003) e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M78 (nº de acesso GenBank: HM219853; Trmcic, *et al.*, 2011), podem ser observadas na Tabela 14.

Tabela 14. Comparação das sequências de nucleotídeos obtidas para o gene codificador de nisina presente nas cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M78.

Nisina	Cepas	Sequências
Nisina Z	69	1-ATGAGTACAAA-GATTTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCG T AAGAAAGATTCAGGTGC-59
Nisina Z	MS27	1-ATGAGTACAAA A GATTTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCG-AAGAAAGATTCAGGTGC-59
Nisina Z	K213	1-ATGAGTACAAA A GATTTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCG-AAGAAAGATTCAGGTGC-59
Nisina A	M78	1-ATGAGTACAAA A GATTTTAACTTGGATTGGTATCTGTTTCG-AAGAAAGATTCAGGTGC-59
Nisina Z	69	60-ATCACCACGCATTACAAGTATTTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAACAGGAGCTCTGA-118
Nisina Z	MS27	60-ATCACCACGCATTACAAGTATTTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAACAGGAGCTCTGA-118
Nisina Z	K213	60-ATCACCACGCATTACAAGTATTTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAACAGGAGCTCTGA-118
Nisina A	M78	60-ATCACCACGCATTACAAGTATTTTCGCTATGTACACCCGGTTGTAACAGGAGCTCTGA-118
Nisina Z	69	119-TGGGTTGTAACATGAAAACAGC C ACTTGT A ATTGTAGTATTCACGTAAGCAAATAA-174
Nisina Z	MS27	119-TGGGTTGTAACATGAAAACAGC A ACTTGT A ATTGTAGTATTCACGTAAGCAAATAA-174
Nisina Z	K213	119-TGGGTTGTAACATGAAAACAGC C ACTTGT A ATTGTAGTATTCACGTAAGCAAATAA-174
Nisina A	M78	119-TGGGTTGTAACATGAAAACAGC A ACTTGT C ATTGTAGTATTCACGTAAGCAAATAA-174

• Os elementos destacados em vermelho representam as diferenças entre os nucleotídeos presentes no gene codificador de nisina da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 e os genes de nisina das cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213; • Os elementos destacados em azul representam as diferenças entre os nucleotídeos presentes nos genes codificadores de nisina Z e nisina A.

O alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene de nisina presente na cepa isolada neste trabalho apontou uma homologia de 98% com as sequências presentes nas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213 produtoras de nisina Z. Observou-se ainda que, para a nisina codificada pelo gene presente na cepa 69, o aminoácido da posição 27 é uma asparagina, confirmando não se tratar de uma variante de nisina A.

A Tabela 15 apresenta a comparação entre a cadeia de aminoácidos obtida após a transcrição da sequência de nucleotídeos do gene codificador de nisina presente na cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 e as cadeias de aminoácidos descritas para as nisinas produzidas pelas cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M78.

Tabela 15. Comparação da cadeia de aminoácidos obtida após a transcrição da sequência de nucleotídeos do gene codificador de nisina presente na cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 com as cadeias de aminoácidos descritas para as nisinas produzidas pelas cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M78.

Cepa	Sequência	Referência
69	<p style="text-align: center;">-20 -10 1 10 20 30</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓</p> <p>MSTKI LTWIW YLFRK KDSGA SPRIT SISLC TPGCK TGALM GCNMK TATCN CSIHV SK</p> <p style="text-align: center;">└──────────────────┬──────────────────┘</p> <p style="text-align: center;">pré-peptídeo</p>	Cepa isolada neste estudo
MS27	<p style="text-align: center;">-20 -10 1 10 20 30</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓</p> <p>MSTKD FNLDL VSVSK KDSGA SPRIT SISLC TPGCK TGALM GCNMK TATCN CSIHV SK</p> <p style="text-align: center;">└──────────────────┬──────────────────┘</p> <p style="text-align: center;">pré-peptídeo</p>	Aso <i>et al.</i> , 2008 (n° de acesso GenBank: AB375441.1)
K213	<p style="text-align: center;">-20 -10 1 10 20 30</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓</p> <p>MSTKD FNLDL VSVSK KDSGA SPRIT SISLC TPGCK TGALM GCNMK TATCN CSIHV SK</p> <p style="text-align: center;">└──────────────────┬──────────────────┘</p> <p style="text-align: center;">pré-peptídeo</p>	Park <i>et al.</i> , 2003 (n° de acesso GenBank: AB083093)
M78	<p style="text-align: center;">-20 -10 1 10 20 30</p> <p style="text-align: center;">↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓</p> <p>MSTKD FNLDL VSVSK KDSGA SPRIT SISLC TPGCK TGALM GCNMK TATCH CSIHV SK</p> <p style="text-align: center;">└──────────────────┬──────────────────┘</p> <p style="text-align: center;">pré-peptídeo</p>	Trmcic, <i>et al.</i> , 2011 (n° de acesso GenBank: HM219853)

• As letras destacadas em vermelho representam as diferenças na cadeia de aminoácidos da nisina produzida pela cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 e as cadeias de aminoácidos das nisinas produzidas pelas cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MS27 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K213; • As letras destacadas em azul representam as diferenças entre os aminoácidos presentes nas cadeias de nisina Z e nisina A.

As diferenças observadas após a transcrição para a cadeia de aminoácidos estão nas posições -10 a -19, correspondentes ao pré-peptídeo (*leader peptide*). Sabe-se que os pré-peptídeos que compõem a cadeia de aminoácidos das bacteriocinas podem diferir quanto ao tamanho, sequência de aminoácidos, relevância funcional e composição de resíduos conservados (Moll *et al.*, 2010). Segundo Kuipers *et al.* (1993), as sequências *leader* de pré-peptídeos de diferentes lantibióticos possuem regiões conservadas, exercendo um papel importante na

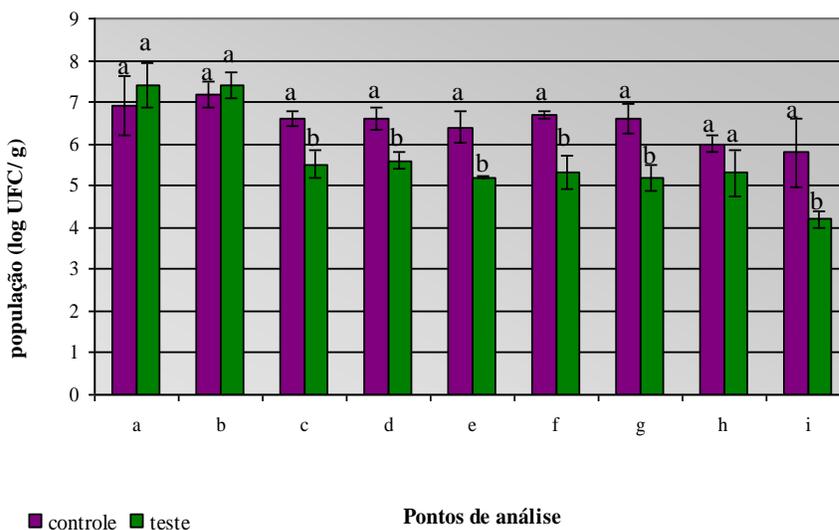
biosíntese das bacteriocinas. Além disso, o pré-peptídeo pode impedir que a molécula do pré-lantibiótico tenha atividade antimicrobiana antes da bacteriocina ser secretada pela célula produtora. Ainda segundo Moll *et al.* (2010), o pré-peptídeo não sofre modificações durante a síntese da bacteriocina, porém direciona as reações enzimáticas de desidratação, ciclização e transporte, sendo clivado por peptidases (*lantibiotic leader* peptidases) no momento da secreção. Embora o mecanismo de indução enzimática desempenhado pelo pré-peptídeo não esteja completamente elucidado, sabe-se que tem papel importante na síntese e secreção de bacteriocinas.

Desta forma, as diferenças encontradas nas posições -10 a -19 na cadeia de aminoácidos do pré-peptídeo da nisina produzida pela cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 podem ser relevantes para a formação e secreção desta bacteriocina. Porém, a compreensão do nível desta influência no potencial de aplicação da bacteriocina como agente de bioconservação depende de estudos que elucidem os mecanismos de indução enzimática desempenhado pelo pré-peptídeo.

4.5 Avaliação do potencial bioconservante da cepa bacteriocinogênica no charque modelo

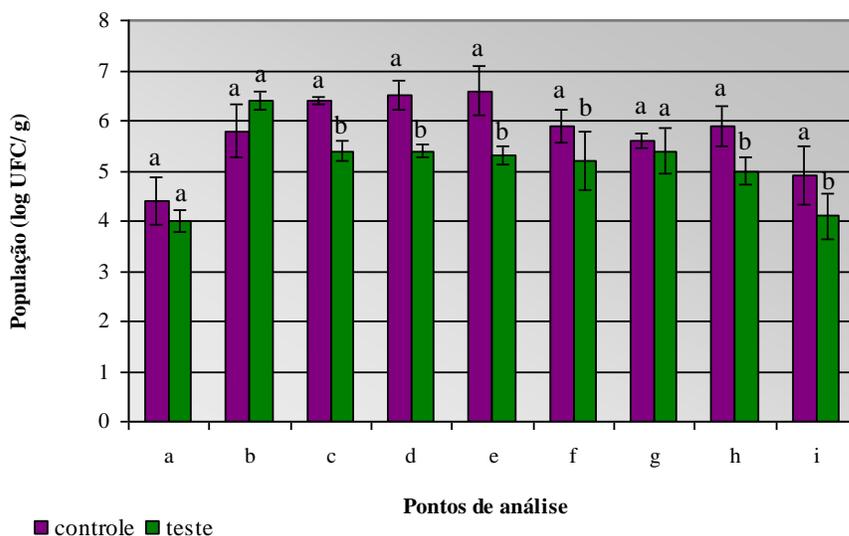
Para todos os charques modelo produzidos, independente da presença da cepa bacteriocinogênica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69, os parâmetros físico-químicos de umidade (variando entre 43% e 44,8%), atividade de água (variando entre 0,74 e 0,75) e resíduo mineral fixo (variando entre 13,9 e 15,3%) se apresentaram dentro dos valores estipulados pela legislação e descritos por Simikimaki *et al.* (1998).

Em relação aos parâmetros microbiológicos, as médias das contagens de bactérias medianamente halotolerantes e das bactérias altamente halotolerantes nas amostras de charque modelo controle e de charque modelo teste, durante o processamento e armazenamento por até 45 dias, estão apresentadas nas Figuras 10 e 11, respectivamente.



a – Matéria-prima crua; **b** – Salga úmida; **c** – Salga seca; **d** – Tombos; **e** – Produto pronto; **f** – Após 5 dias de armazenamento; **g** – Após 10 dias de armazenamento; **h** – Após 25 dias de armazenamento; **i** – Após 45 dias de armazenamento. Letras minúsculas distintas, para um mesmo ponto de análise, indicam diferença estatística entre as contagens observadas ($p \leq 0,05$).

Figura 10. Média das populações de bactérias medianamente halotolerantes encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias.



a – Matéria-prima crua; **b** – Salga úmida; **c** – Salga seca; **d** – Tombos; **e** – Produto pronto; **f** – Após 5 dias de armazenamento; **g** – Após 10 dias de armazenamento; **h** – Após 25 dias de armazenamento; **i** – Após 45 dias de armazenamento. Letras minúsculas distintas, para um mesmo ponto de análise, indicam diferença estatística entre as contagens observadas ($p \leq 0,05$).

Figura 11. Média das populações de bactérias altamente halotolerantes encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias.

Os resultados revelam a presença de altas contagens de bactérias medianamente halotolerantes na matéria-prima utilizada para a produção do charque modelo (aproximadamente 10^7 UFC/ g). Essas contagens se mantiveram constantes até a etapa de salga úmida e não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) entre os resultados obtidos para os charques modelo controle e teste. A partir da etapa de salga seca (início da fermentação), observou-se uma redução nas populações de micro-organismos medianamente halotolerantes para os dois charques modelo analisados, porém a redução observada para as amostras teste (2 ciclos log) foi significativamente superior ($p\leq 0,05$) àquela apresentada pelas amostras controle (0,5 ciclos log). Essa diferença se manteve até a obtenção do produto final e estendeu-se por todo o período de armazenamento. Esses resultados indicam que a presença da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 no charque modelo causou uma redução na população de bactérias medianamente halotolerantes durante o processamento do charque e impediu seu aumento durante o armazenamento por até 45 dias.

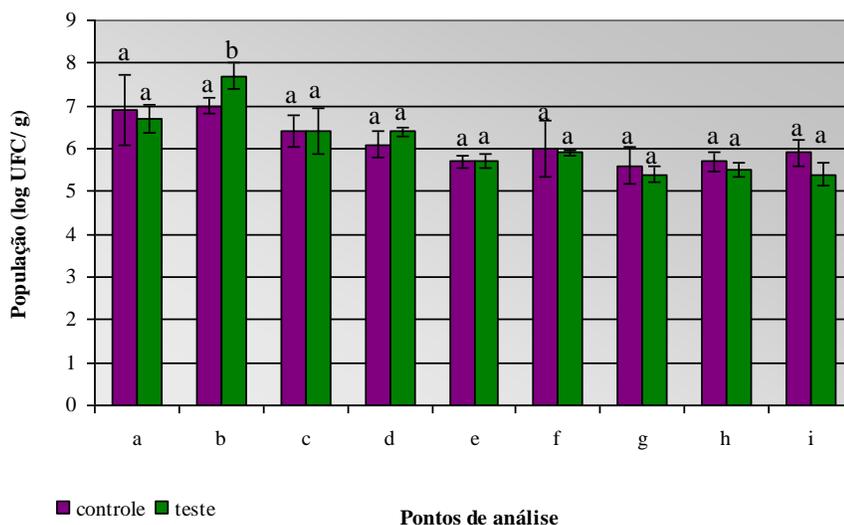
Com relação às bactérias altamente halotolerantes, verificou-se que estavam presentes na matéria-prima, embora em quantidades inferiores (aproximadamente 10^4 UFC/ g) às bactérias medianamente halotolerantes, e que as contagens observadas para os charques modelo controle e teste não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$). Na etapa de salga úmida foi observado um aumento destas populações, que alcançaram aproximadamente 10^6 UFC/ g para dois charques modelo analisados, não apresentando diferença estatística entre as amostras controle e teste ($p>0,05$). Este aumento já era esperado, uma vez que os micro-organismos halotolerantes foram introduzidos nesta etapa de fabricação. Já nas etapas de salga seca e tombos, onde ocorre a fermentação do produto, observou-se uma redução de 1 ciclo log para o charque modelo teste, enquanto não houve nenhuma redução nas amostras referentes ao charque modelo controle e a diferença entre as populações de micro-organismos altamente halotolerantes, nos dois tipos de charque analisados, tornou-se estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$). Mais uma vez, as diferenças entre as contagens de bactérias altamente halotolerantes das amostras teste e controle foram as mesmas durante toda a fabricação do charque modelo e até o final do armazenamento, indicando que a presença da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 inibiu a multiplicação de bactérias altamente halotolerantes.

Outros autores também pesquisaram as populações de micro-organismos halotolerantes em amostras de alimentos cárneos fermentados, encontrando populações elevadas no produto pronto e sugerindo que estes micro-organismos têm origem na matéria-prima (Chevallier *et al.*,

2006; Fontán *et al.*, 2007; Talon *et al.*, 2007). Além disso, a identificação das bactérias encontradas por esses autores apontou o gênero *Staphylococcus* como o principal representante deste grupo de micro-organismos (Chevallier *et al.*, 2006; Cagno *et al.*, 2008), concordando com os resultados apresentados neste trabalho. Fontán *et al.* (2007), avaliando as características de salsicha fermentada, produzida na Espanha, encontraram populações de aproximadamente 10^7 UFC/g de micro-organismos halotolerantes. Resultados semelhantes foram observados por Chavellier *et al.* (2006) e Cagno *et al.* (2008), que encontraram contagens variando entre $10^6 - 10^7$ UFC/g e $10^5 - 10^7$ UFC/g de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* em amostras de linguiça fermentada sem adição de cultura iniciadora e linguiças fermentadas produzidas na Itália, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura dados referentes a influência de bactérias lácticas bacteriocinogênicas nas populações de micro-organismos halofílicos e halotolerantes em produtos cárneos, impedindo a comparação dos resultados obtidos neste trabalho. Contudo, a falta destes dados demonstra a relevância desta pesquisa. Além disso, a capacidade de inibir as cepas medianamente halotolerantes e altamente halotolerantes apresentada pela cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69, indicam o potencial de utilização da cepa isolada neste trabalho como agente de bioconservação de um alimento que possui papel relevante na alimentação do brasileiro.

As médias das contagens de bactérias lácticas, encontradas nos charques modelo controle e teste, durante o processamento e armazenamento por até 45 dias, podem ser observadas na Figura 12.



a – Matéria-prima crua; **b** – Salga úmida; **c** – Salga seca; **d** – Tombos; **e** – Produto pronto; **f** – Após 5 dias de armazenamento; **g** – Após 10 dias de armazenamento; **h** – Após 25 dias de armazenamento; **i** – Após 45 dias de armazenamento.

Figura 12. Média das populações de bactérias lácticas encontradas nos charques modelo controle e teste nas diferentes etapas do processamento e armazenamento por até 45 dias. Letras minúsculas distintas, para um mesmo ponto de análise, indicam diferença estatística entre as contagens observadas ($p \leq 0,05$).

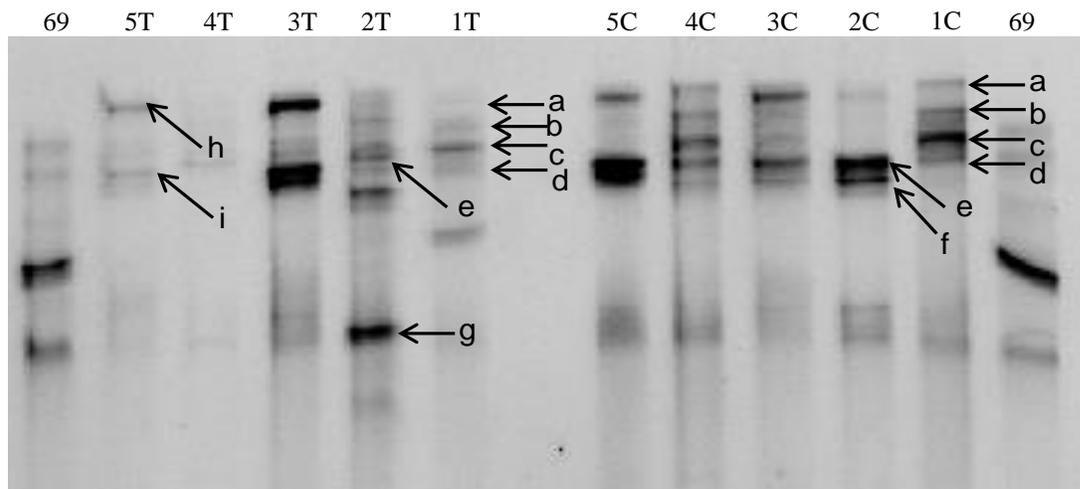
As populações de bactérias lácticas encontradas na matéria-prima crua foram bastante semelhantes para os charques modelo teste e controle (aproximadamente 10^7 UFC/ g), não apresentando diferença estatística ($p > 0,05$). Já na etapa de salga úmida observou-se um aumento de 1 ciclo log dessa população no charque modelo teste, provavelmente devido à adição da cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 que foi realizada nesta etapa, e as contagens observadas para as duas amostras analisadas tornaram-se estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$). Após a salga seca, ocorreu uma redução nas contagens observadas para o charque modelo teste (1 ciclo log), porém esta redução não foi acompanhada pelo charque modelo controle e as populações de bactérias lácticas tornaram-se, mais uma vez, bastante semelhantes, não apresentando diferença estatística entre si ($p > 0,05$). Essa redução, observada apenas no charque modelo teste, ocorreu possivelmente devido à inibição das bactérias lácticas naturalmente presentes na matéria-prima crua, uma vez que a cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 apresentou, em testes *in vitro*, potencial inibitório contra diversas bactérias lácticas testadas. A partir da etapa de salga seca até a obtenção do produto pronto e também até 45 dias de armazenamento, as populações de bactérias lácticas nas amostras controle e teste permaneceram inalteradas, não apresentando diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Assim, é possível concluir que a presença de *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* 69 no charque modelo influenciou esta população, principalmente nas etapas de salga seca e tombos, onde ocorre a fermentação do charque. Outros trabalhos encontrados na literatura também comentam que a aplicação de cepas bacteriogênicas na fermentação de produtos cárneos pode influenciar na composição da microbiota destes produtos, afetando não só a qualidade microbiológica como também algumas propriedades sensoriais, uma vez que é na etapa de fermentação onde ocorre a maioria das modificações bioquímicas, físico-químicas e microbiológicas que vão influenciar as características do produto final (Pinto *et al.*, 2002; Ammor e Mayo, 2007; Fontán *et al.*, 2007).

Outro fator importante a ser observado é que as populações de bactérias lácticas encontradas na matéria-prima foram bastante elevadas (aproximadamente 10^7 UFC/ g) mantendo-se assim até o final da produção do charque modelo (aproximadamente 10^6 UFC/ g), corroborando com a idéia da ocorrência de fermentação neste produto por bactérias lácticas naturalmente presentes que são capazes de se multiplicar mesmo nas altas concentrações de sal (Pinto *et al.*, 2002; Shimokomaki, 2006). Porém, as contagens de bactérias lácticas encontradas para o produto pronto (10^5 - 10^6 UFC/g) foram inferiores às contagens reportadas por outros autores que pesquisaram estes micro-organismos em produtos cárneos fermentados. Chavellier *et al.* (2006) encontraram populações de 10^6 – 10^7 UFC/g em amostras de linguiça fermentada sem adição de cultura iniciadora, enquanto Cagno *et al.* (2008) encontraram populações mais elevadas (10^8 UFC/g) em amostras de linguiças fermentadas produzidas na Itália. Talon *et al.* (2007) comentam que as bactérias lácticas representam a microbiota predominante nos produtos cárneos fermentados e, mesmo quando estão presentes em baixo número ao início do processo, são capazes de se multiplicar tornando-se o principal micro-organismo presente no produto final. Porém, para as amostras de charque modelo analisadas neste estudo observou-se uma diminuição nas contagens de bactérias lácticas, quando se comparam as contagens encontradas para a matéria-prima e o produto final. Uma possível causa seria o aumento da concentração de NaCl durante o processamento, que favorece a multiplicação de micro-organismos halotolerantes em detrimento das bactérias lácticas. Lozenzo *at al.* (2010) também observaram a variação na população de bactérias lácticas durante a fabricação de lacón (produto cárneo fermentado, tradicional da Espanha), observando contagens de 10^4 UFC/g na matéria-prima e aumento da população durante as etapas de fermentação e cura, chegando a 10^7 UFC/g, e reduzindo-se a 10^5 UFC/g ao final do processo.

Nos estudos de ecologia microbiana do charque modelo verificou-se que o método de extração de DNA empregando-se guanídeo apresentou os piores resultados quando comparado aos outros dois métodos testados, pois não foram obtidos fragmentos de DNA referentes aos micro-organismos presentes nas amostras de charque. Quando a extração de DNA foi feita com kit comercial ou com fenol, os resultados foram idênticos. Os dois métodos apresentaram a mesma variabilidade nos micro-organismos detectados nas amostras de charque modelo, gerando bandas idênticas após a amplificação da região V3 de 16S rDNA e a DGGE. Desta forma, apenas os fragmentos de DNA extraídos com fenol ou kit comercial foram utilizados neste estudo. Esses resultados diferem dos resultados observados por Abriouel *et al.* (2006), que verificaram que a extração com guanídeo foi o melhor método para a extração de DNA diretamente de amostras de alimentos a base de milho fermentado, o que permite concluir que a composição da matriz alimentar pode influenciar na eficiência do método. O teor de proteínas no charque é maior que aquele encontrado em cereais, o que pode ter influenciado a eficiência dos métodos de extração de DNA.

Na Figura 13 pode-se observar a comparação entre aos perfis genéticos obtidos para as amostras de charque modelo, fermentadas de maneira natural ou adicionadas da cepa *L. lactis* subsp. *lactis* 69, após a aplicação da técnica de DGGE.



69, *L. lactis* subsp. *lactis* 69; 1, carne crua; 2, amostra após salga úmida; 3, amostras após salga seca; 4, amostras após tombos; 5, charque pronto; C, amostras de charque fermentadas sem adição da cultura bacteriocinogênica; T, amostras de charque fermentadas com a cultura bacteriocinogênica; letras minúsculas indicam as bandas sequenciadas: a, *Lactococcus* sp. / *Streptococcus* sp.; b, *Lactobacillus* sp.; c, *L. sakei*; d, *Lactobacillus* sp.; e, *S. saprophyticus*; f, *Staphylococcus* sp.; g, *L. lactis* subsp. *lactis* 69; h, *Staphylococcus* sp.; i, *Staphylococcus* sp.

Figura 13. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (poliacrilamida 0,8% p/v) dos amplicons da região V3 de 16S rDNA da microbiota presente em amostras de charque modelo fermentado de maneira natural ou com adição de cultura bacteriocinogênica.

Em relação à diversidade microbiana do charque modelo, observou-se a predominância de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* e micro-organismos halotolerantes do gênero *Staphylococcus*. Observou-se também que as bactérias lácticas tiveram origem na matéria prima, uma vez que foram identificadas na carne crua utilizada para o preparo do charque modelo, permanecendo no produto até o final de sua fabricação. Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* mantiveram-se na carne em todas as etapas de fabricação do charque, tornando-se a principal microbiota presente no produto pronto. Esses resultados concordam com aqueles apresentados por diversos autores que, caracterizando a microbiota de produtos cárneos fermentados, encontraram predominância de bactérias lácticas (principalmente espécies de *Lactobacillus* spp.) e cocos Gram-positivos coagulase negativa (principalmente espécies de *Staphylococcus* spp.), destacando a importância destes micro-organismos na fermentação dos produtos e no desenvolvimento das características sensoriais (Cocolin *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2002; Aymerich *et al.*, 2003 ; Rantsiou *et al.*, 2005 ; Fontán *et al.*, 2007 ; Albano *et al.*, 2008).

Analisando-se a dinâmica populacional microbiana durante a produção de charque modelo, pode-se observar que as populações de bactérias lácticas se mantiveram presentes durante toda a fabricação do produto, representando a microbiota predominante na matéria-prima e também nas etapas de salga seca e tombos, sugerindo que a fermentação natural do charque modelo ocorreu com a participação de bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Porém, não foram encontradas populações de *Lactobacillus* nas amostras correspondentes às etapas de salga úmida e produto pronto, indicando ou que estes micro-organismos não estão presentes ou que sua população encontra-se em número muito reduzido, não detectável pelos métodos de análise empregados. Esses resultados diferem de outros trabalhos encontrados na literatura, onde as populações de *Lactobacillus* são apresentadas como predominantes em produtos cárneos fermentados (Cocolin *et al.*, 2001; Rantsiou *et al.*, 2005; Fontán *et al.*, 2007; Albano *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010).

Em relação aos micro-organismos halotolerantes do gênero *Staphylococcus*, pode-se observar também foram encontrados durante todo o processamento, tornando-se as populações predominantes no produto final. Esses micro-organismos também estiveram presentes nas etapas de fermentação, sugerindo sua participação na formação das características sensoriais do produto. Esses resultados concordam com aqueles descritos na literatura, que relatam a participação de cocos Gram-positivos coagulase negativa, principalmente do gênero *Staphylococcus*, na fermentação de produtos cárneos, sugerindo que estes micro-organismos, em conjunto com as bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, constituem a microbiota dominante durante a fermentação e ao final do processamento destes produtos (Cocolin *et al.*, 2001; Rantsiou *et al.*, 2005; Fontán *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2010).

Assim, através destes resultados pode-se afirmar que nas etapas onde ocorre a fermentação do charque foram encontradas tanto bactérias lácticas quanto halotolerantes, com ligeiro predomínio das primeiras, principalmente na etapa de tombos, enquanto que nas etapas de salga úmida e no produto pronto foi observada a predominância de bactérias halotolerantes do gênero *Staphylococcus* spp.

Comparando-se os perfis genéticos obtidos para os charques modelo controle e teste, observou-se que a presença da cultura bacteriocinogênica *L. lactis* subsp. *lactis* 69 não influenciou nas populações microbianas presentes no charque. Tanto nas amostras controle

quanto nas amostras teste, observou-se uma evolução muito semelhante na dinâmica das populações que, numa visão geral, apresentou predomínio de bactérias lácticas no início da produção e durante a fermentação, principalmente na etapa dos tombos. No entanto, após a secagem ao sol (produto final) o predomínio passou a ser de bactérias halotolerantes do gênero *Staphylococcus* spp.

Entretanto, ao se avaliar cada etapa de produção individualmente, algumas diferenças interessantes foram observadas. Na etapa de salga úmida, para o charque modelo controle, foi verificada a predominância de micro-organismos halotolerantes, acompanhada pela redução na diversidade das populações de bactérias lácticas, enquanto no charque modelo teste, a diversidade das populações de bactérias lácticas não foi reduzida e estes micro-organismos representaram as populações predominantes. Embora as bactérias do gênero *Staphylococcus* também tenham sido identificadas na etapa de salga úmida do charque modelo teste, a predominância destes micro-organismos só ocorreu no produto final. Estes resultados corroboram aqueles reportados em outros trabalhos, que também mostraram que a adição de culturas iniciadoras, capazes de controlar os processos fermentativos, influencia positivamente a microbiota presente nos produtos cárneos, inibindo a multiplicação de micro-organismos indesejáveis e contribuindo para a qualidade sensorial do produto final (Villani *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010).

5. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que o charque é um produto que apresenta potencial como fonte para o isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas. A cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69, isolada a partir de uma amostra de charque, apresenta gene codificador para nisina Z e capacidade de inibir, *in vitro*, bactérias halotolerantes isoladas de charque, bem como outras bactérias deteriorantes e patogênicas, como *Lactobacillus* spp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, evidenciando seu potencial de aplicação na bioconservação de alimentos. Além disso, as bacteriocinas produzidas por esta cepa possuem características interessantes para sua utilização pelas indústrias de alimentos. Nos testes realizados com charque modelo, observou-se que a cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 69 teve efeito inibitório sobre a multiplicação de micro-organismos halotolerantes durante todo o processo de fabricação do produto, reforçando seu potencial de aplicação como agente de bioconservação de charque e outros produtos cárneos salgados. Nos estudos de dinâmica populacional durante o processo de fabricação de charque, observou-se que a presença da cultura bacteriocinogênica não afetou as bactérias lácticas responsáveis pela fermentação do produto.

6. Referências Bibliográficas

- AASEN, I.M.; MARKUSSEN, S.; MØRETRØ, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interaction of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.35-43, 2003.
- ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; LÓPEZ, R.L.; MARTÍNES-CAÑAMERO, M.; KELEKE, S.; GÁLVEZ, A. Culture-independent análisis of the microbiol composition of the African traditional fermented foods poto poto and *dégué* by using three different DNA extraction methods. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.228-233, 2006.
- ALBANO, H.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A.; HOGG, T.; TEIXEIRA, T. Characterization of microbial population of “Alheira” (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.2187-2194, 2008.
- ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p.61-66, 2010.
- AMMOR, M.S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starte cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science**, v.76, p.138-146, 2007.
- AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; SILVESTRI, G.; OSIMANI, A.; PETRUZZELLI, A.; CLEMENTI, F. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.163-145, 2007
- ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, T.C.; PENNA, V. Nisin biotechnological production and application:a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, p.146-154, 2009
- ARGIRY, A.A.; PANAGOUE, E.Z.; TARANTILIS, P.A.; POLYSIOU, M.; NYCHAS, G-J.E. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.145, n°.1, p.146-154, 2010.
- ASADUZZAMAN, S.M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: deverse activities and unique mode of action.**Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.10, n°.5, p.475-487, 2009.
- ASO, Y.; TAKEDA, A.; SATO, M.; TAKAHASHI, T.; YAMAMOTO, T.; YOSHIKIYO, K. Characterization of lactic acid bacteria coexisting with nisin Z producer in *Tsuda*-Turnip Pickles. **Current Microbiology**, v.57, p. 89-94, 2008.
- AYMERICH, T.; HUGAS, M.; MONFORT, J. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. **Food Science and Thechnology International**, v.4, n°.3, p.141-158, 1998.

AYMERICH, T.; MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic *Staphylococci* from artisanal low-acid sausages. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n°.8, p.4583-4594, 2003.

BELLO, B.D.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R. CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy. **LWT – Food Science and Technology**, v.43, n°.7, p.1151-1159, 2010.

BELGACEM, Z.B.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CANAMERO, M.; GÁLVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, v.21, p.462-470, 2010.

BEN OMAR, N.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GUYOT, J.P.; GÁLVEZ, A. Isolation of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.44-50, 2006.

BRASIL. Decreto lei nº 2244 de 05 de junho de 1997. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Ministério da Agricultura**. Brasília, 1997.

BRASIL. Circular nº 16/DICAR de 24 de janeiro de 2000. Divisão de Produtos de Origem Animal. **Ministério da Agricultura e Abastecimento**. Brasília, 2000.

BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of 16S ribosomal gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.75, p.4801-4805, 1978.

BROSIUS, J.; DULL, T.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.77, p.201-204, 1980.

CAGNO, R.; LOPEZ, C.C.; TOFALO, R.; GALLO, G.; ANGELIS, M.; PAPARELLA, A.; HAMMES, W.P.; GOBBETTI, M. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. **Meat Science**, v.79, p.224-235, 2008.

CASQUETE, R.; BENITO, M.J.; MARTÍN, A.; RUIZ-MOYANO, S.; HERNÁNDEZ, A.; CÓRDOBA, M.G. Effect of autochthonous starter cultures in the production of “salchichón”, a traditional iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, n°.7, p.1562-1571, 2011.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.483-499, 2008.

CHATTERJEE, C.; PAUL, M.; XIE, L.; van der DONK, W.A. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chemical Reviews**, v.105, n°.2, p.633-683, 2005.

CHEVALLIER, S.; AMMOR, S.; LAGUET, A.; LABAYLE, S. ; CASTANET, V. ; DUFOUR, E. ; RATON, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. **Food Control**, n°.17, p.446-453, 2006.

CHEIGH, C.; PYUN, Y. Nisin biosynthesis and its properties. **Biotechnology Letters**, v.27, p.1641-1648, 2005.

CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J.M.; PAGOTTO, F.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v.88, n°.4, p.791-797, 2009.

CIBIK, R.; LEPAGE, E.; TAILLIEZ, P. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprint, 16S sequencing and 16S rDNA fragment amplification. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.267-278, 2000.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n°.11, 2001.

COCOLIN, L.; DOLCI, P.; RANTSIOU, K.; URSO, R.; CANTONI, C.; COMI, G. Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the north of Italy as determined by molecular methods. **Meat Science**, v.82, p.125-132, 2009.

COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L.; RANTSIOU, K.; CATTANEO, P.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**. v.69, p.381-392, 2005.

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews. Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.

De MARTINIS, C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sakei* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, n° 1-2, p.119-126, 1998.

De VUYST, L.; VANCANNEYT. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.24, p.120-127, 2007.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension - A Review. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058-1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J.; GASSON, M.J. Nisin. In: DILLON, V.M.; BOARD, R.G., eds. **Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1994. cap.4; p.99-131.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v.14, p.273-285, 2004.

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v.3, p.107-122, 2002.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.297-314, 2004.

FONTÁN, M.C.G.; LORENZO, J.M.; PRADA, A.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. **Food Microbiology**. V.24, n.º.1, p.52-58, 2007.

FONTANA,C.; COCCONCELLI, P.S.; VIGNOLO, G. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. **Food Microbiology**, v.103, p.131-142, 2005.

FRANCESCA, N.; SETTANNI, L.; SANNINO, C.; APONTE, M.; MOSCHETTI, G. Ecology and technological capability of lactic acid bacteria isolated during Grillo grape vinification in the Marsala production area. **Annals of Microbiology**, v.61, p.79-84, 2011.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPES, R.L.; BEN OMAR, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.51-70, 2007.

GÁLVEZ, A.; LOPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.28, p.125-152, 2008.

GAO, Y.; JIA, S.; GAO, Q.; ZHILEI, T. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sakei* C2, isolated from traditional chinese fermented cabbage. **Food Control**, v.21, p.76-81, 2010.

GARCIA, F.A.; MIZUBUTIB, I.Y.; KANASHIROA, M.Y.; SHIMOKOKAKI, M. Intermediate moisture meat product: biological: evaluation of charqui meat protein quality. **Food Chemistry**, v.75, p.405-409, 2001.

GREER, G.G.; DILTIS, B.D. Control of meatborne *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta* by a bacteriocinogenic *Brochothrix campestris* ATCC 43754. **Food Microbiology**, v.23, p.785-790, 2006.

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food – A Review **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1316-1325, 2005.

HALL, P.A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R.S. Acid-producing micorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap.19, p.201-207.

HENG, N.C.K.; WESCOMBRE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. In: RILEY, M.A. e CHAVAN, M.A., eds. **The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria: Ecology and Evolution**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007.

HU, Y.; XIA, W.; GE, C. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.23, n°7, p.1021-1031, 2007.

IVANOVA, I.; MITEVA, V.; STEFANOVA, Ts.; PANTEV, A.; BUDAKOV, S.; DANOVA, S.; MONCHEVA, P.; NIKOLOVA, I.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.147-158, 1998.

JOFRÉ, A.; AYMERICH, T.; MONFORT, J.M.; GARRIGA, M. Application of enterocins A and B, sakacin K and nisin to extend the safe shelf-life of pressurized ready-to-eat meat products. **European Food Research and Technology**, v.228, n°1, p.159-162, 2008.

KWAADSTENIET, M.; ten DOESCHATE, K.; DICKS, L.M.T. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n°2, p.547-549, 2008.

KOUAKOU, P.; GHALFI, H.; DORTU, C.; EVERARD, 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

KRUGER, M.F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. São Paulo, 2006. 70p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KUIPERS, O.P.; ROLLEMA, H.S.; de VOZ, W.M.; SIEZEN, R. Biosynthesis and secretion of a precursor of nisin Z by *Lactococcus lactis* directed by the leader peptide of the homologous lantibiotic subtilin from *Bacillus subtilis*. **Federation of European Biochemical Societies**, v.330, n°1, p.23-27, 1993.

KUMAR, M.; TIWARI, S.K.; SRIVASTAVA, S. Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.40-49, 2010.

LARA, J.A.F.; SENIGALIA, S.W.B.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; DUTRA, I.S.; PINTO, M.F.; SHIMOKOMAKI, M. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. **Meat Science**, v.65, p.609-613, 2003.

- LEISTNER, L. Shelf stable product and intermediate moisture foods based on meat. In: ROCKLAND, L.; BEUCHAT, L.B. (EDS.). **Water Activity Theory and Applications to Food**. New York: Dekker Inc., 2000. p.295-328.
- LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, **Journal of Microbiological Methods**, v.13, p.145-150, 1991.
- LI, H.; O'SULLIVAN, D.J. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin nisin, in a dairy *Esterococcus* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n°.7, p.3392-3400, 2002.
- LISERRE, A.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged brazilian sausage. **Meat Science**, v.61, n°.4, p.449-455, 2002.
- LIU, G.; LV, Y.; LI, P.; ZHOU, K.; ZHANG, J. Pentocin 31-1, an anti-listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. **Food Control**, v.19, p.353-359, 2008.
- LIZASO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M.J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**. v.16, p.219-228, 1999.
- LORENZO, J.M.; FONTAN, M.C.G.; CACHALDORA, A.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacon (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. **Food Microbiology**, n°. 27, p.229-235, 2010.
- LU, A.; XU, X.; ZHOU, G.; ZHU, Z.; MENG, Y.; SUN, Y. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. **Food Control**, v.21, p.444-449, 2010.
- LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, p.105-115, 2000.
- MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W.; Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS, D.W., eds. **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1972. v.7a, p.313-342.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.285-308, 2001.
- MOLL, G.N.; KUIPERS, A.; RINK, R. Microbial engineering of dehydro-amino acids and lanthionines in non-lantibiotic peptides. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.97, n°.4, p.319-333, 2010.
- MOROT-BIZOT, S.C.; TALON, R.; LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1087-1094, 2004.

NAJJARI, A.; OUZARI, H.; BOUDABOUS, A.; ZAGOREC, M. Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n°.3, p.342-351, 2008.

NES, I.F., HOLO, H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. **Biopolymers (Peptide Science)**, v.55, p.50-61, 2000.

NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P.; SONOMOTO, K.; PANYIM, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.137-145, 2003

OGIER, J.C.; SON, O.; GRUSS, A.; TAILLIEZ, P.; DELACROIX-BUCHET, A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3691-3701, 2002.

OUWENHAND, A.C.; VESTERLUND, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. **In: Lactic Acid Bacteria** (Salminen S, Wright A & Ouwenhand A, eds) 3rd ed. Marcel Dekker, Inc p.375-396, 2007.

PANG, H.; QIN, G.; TAN, Z.; LI, Z.; WANG, Y.; CAI, Y. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. **Systematic and applied Microbiology**, v.34, n°.3, p.235-241, 2011.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v.21, p.465-499, 2003.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKIS, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v.65, p.859-867, 2003.

PARK, S.H.; ITOH, K.; KIKUCHI, E.; NIWA, H.; FUJISAWA, T. Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. **Current Microbiology**, v.46, p.385-388, 2003.

PETROV, K.; URSHEV, Z.; PETROVA, P. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amyolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. **Food Microbiology**, v.25, p.550-557, 2008.

PINTO, M.F. **Culturas iniciadoras – STARTERS – no processamento de JERKED BEEF, um derivado do charque**. São Paulo, 1996. 93p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

PINTO, M.F.; PONSANO, E.H.G.; FRANCO, B.D.G.M; SHIMOKOMAKI, M. Charqui meats as fermented meat products: role of bacteria for some sensorial properties development. **Meat Science**, v.61, p.187-191, 2002.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S.K.; SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.38, p.859-865, 2005.

RANTSIOU, K.; URSO, R.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; CATTANEO, P.; COMI, G.; COCOLIN, L. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n°.4, p.1977-1986, 2005.

RUIZ, P.; SESEÑA, S.; IZQUIERDO, P.M.; PALOP, M.L. Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1555-1562, 2010.

RODRIGUEZ, J.M.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; HORN, N.; DODDI, H.M.; HERNANDEZ, P.E.; GASSON, M.J. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain from dry fermented sausages. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.109-115, 1995.

SAMELIS, J.; BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.38, p.21-28, 2005.

SHIMOKOMAKI, M.; FRANCO, B.D.G.M.; BISCONTINI, T.M.; PINTO, M.F.; TERRA, N.N.; ZORN, T.M.T. Charqui meats are hurdle technology meat products. **Food Reviews International**, v.14, n°.4, p.339-349, 1998.

SHIMOKOMAKI, M. Charque, jerked beef e carne de sol. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, 2006. cap.4, p.47-62.

SIGNORINI, M.L.; PONCE-ALQUICIRA, E.; GUERRERO-LEGARRETA, I. Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. **Journal of Muscle Foods**, v.17, p.277-290, 2006.

TALON, R.; LEROY, S.; LEBERT, I. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. **Meat Science**, v.77, p.55-62, 2007.

TRMCIC, A.; SAMELIS, J.; MONNET, C.; ROGELJ, I.; BOGOVIC MATIJASIC, B. Expression of nisin genes in cheese-A quantitative real-time polymerase chain reaction approach. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n°1, p.77-85, 2011.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. **Folia Microbiologica**, v.49, p.406-410, 2004.

TODOROV, S.D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action. A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n°.2, p.209-221, 2009.

TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; VAZ-VELHO, M. Bacteriocin producing lactic acid bacteria from and for production of salami-like products. **International Review of Food Science and Technology**, v.25, p.57-61, 2009

TODOROV, S.D.; HO, P.; VAZ-VELHO, M.; DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat Science**, v.84, p.334-343, 2010.

TODOROV, S.D. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.971-986, 2011.

TORRES, E.A.F.S.; SHIMOKOMAKI, M.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; CARVALHO, B.C.; SANTOS, J.C. Quality parameters determination of charqui, an intermediate moisture meat product. **Meat Science**, v.38, n°.2, p.229-234, 1994.

TU, R.J.; WU, H.Y.; LOCK, Y.S.; CHEN, M.J. Evaluation of microbial dynamics during the ripening of a traditional Taiwanese naturally fermented ham. **Food Microbiology**, v.27, n°.4, p.460-467, 2010.

TWOMEY, D.; ROSS, R.P.; RAYAN, M.; MEANEY, B.; HILL, C. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.165-185, 2002.

URSO, R.; RANTSIOU, K.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.232-239, 2006.

van REENEN, C.A.; DICKS, L.M.T.; CHIKINDAS, M.L. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**. v.84, p.1131-1137, 1998.

VILLANI, F.; CASABURI, A.; PENNACCHIA, C.; FILOSA, L. ; RUSSO, F. ; ERCOLINI, D. Microbial ecology of the Soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, and *in vitro* and *in situ* selection of autochthonous starter cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.173, n°.17, 2007

YOUSSEF, E.Y.; GARCIA, C.E.R.; SHIMOKOMAKI, M. Effect of salt on color and warmed over flavor in charqui. **Meat Processing**, v.46. n°.4, p.595-600, 2003.

YOUSSEF, E.Y.; GARCIA, C.E.R.; YAMASHITA, F.; SHIMOKOMAKI, M. Chemical Basis for beef charqui meat texture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n°.4, p.719-724, 2007.