

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A

Roger Junges da Costa

Pelotas, 2019

Roger Junges da Costa

Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção de título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini
Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837i Costa, Roger Junges da

Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A / Roger Junges da Costa ; Angela Maria Fiorentini, Eduarda Hallal Duval, orientadoras. — Pelotas, 2019.

124 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. Bioconservação. 3. Derivado cárneo. 4. Enterocina. 5. Metabólito antimicrobiano. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Duval, Eduarda Hallal, orient. III. Título.

CDD : 664

Roger Junges da Costa

Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e aplicação de substâncias antimicrobianas em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A

Tese aprovada, como requisito, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2019

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (Orientadora)

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Eduarda Hallal Duval (Orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Dr^a. Juliana de Lima Marques

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Stela Maris Meister Meira

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dedico este trabalho aos meus pais Glênio Ferreira da Costa e Inez Junges da Costa, e à minha irmã Paula Junges da Costa, por todo apoio e amor. Em especial, à minha filha Manuela, meu maior tesouro.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela vida e por toda proteção e bênçãos recebidas.

Aos meus pais Glênio e Inez, e minha irmã Paula, pois sem dúvida são as pessoas mais importantes da minha vida e sem eles eu nada seria.

A todos meus familiares e amigos que independente de onde estejam, estão sempre torcendo por mim.

A minha namorada Laura, pelo apoio e incentivo na fase final do doutorado.

Às minhas orientadoras Eduarda (Duda) e Ângela por todo o conhecimento que me foi passado, pelo compromisso, dedicação, amizade e confiança.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação e por todo conhecimento transmitido.

Aos vários colegas da UFPel que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em especial a Juliana Marques.

Aos colegas do IFSul campus Bagé, pelo incentivo e companheirismo, em especial à colega e amiga Stela Meira, pelo apoio e sugestões. Também agradeço ao amigo Guilherme Dannenberg pela ajuda nessa reta final de doutorado.

À bolsista Andresa Pereira pela amizade, ajuda e dedicação que desempenhou neste trabalho.

À Embrapa Pecuária Sul, em especial à Élen Nalério, pela parceria neste projeto.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Ao Instituto Federal Sul-rio-grandense, pelo apoio e incentivo à qualificação docente.

E finalmente a todos que, de uma forma ou de outra, estiveram presentes durante esses 5 anos e colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado, de coração!!

"Na vida, não importa o quão forte você bate, mas sim o quanto aguenta apanhar e continuar. O quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que a vitória é conquistada."

Rocky Balboa

Resumo

A aplicação de bactérias ácido lácticas (BAL) e/ou seus metabólitos antimicrobianos (como as bacteriocinas) em produtos alimentícios, capazes de inibir a multiplicação de micro-organismos indesejáveis (deteriorantes e/ou patogênicos), é uma estratégia cada vez mais estudada e utilizada dentro da bioconservação de alimentos. Na elaboração de derivados cárneos, uma boa opção é o uso de carne obtida de animais com idade avançada, dentre as quais se destaca a carne ovina. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas obtidas de carne ovina e avaliar a aplicação de substâncias antimicrobianas sintetizadas por essas bactérias, em linguiça ovina frescal no controle de *Listeria monocytogenes*. Foram isoladas 84 BAL, das quais seis apresentaram atividade bacteriocinogênica do Sobrenadante Livre de Células (SLC) frente a *Listeria monocytogenes* Scott A, além de possuírem natureza proteica e serem seguras microbiologicamente, confirmado pela ausência das enzimas gelatinase, DNase, atividade hemolítica e sensibilidade à alguns antimicrobianos de uso clínico. As substâncias antimicrobianas apresentaram estabilidade em diferentes temperaturas, valores de pH e na presença de sal (NaCl) e sais de cura. Além disso, não apresentaram citotoxicidade em diluições maiores que 1:40. Os 6 isolados selecionados foram identificados como *Streptococcus gallolyticus* (3) e *Enterococcus faecium* (3), sendo que as atividades antimicrobianas variaram entre 200 a 3.200 UA.mL⁻¹. Somente o isolado *Enterococcus faecium* EO1 apresentou genes que codificam para a enterocina A, com produção máxima da substância antimicrobiana a partir de 6 horas, durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo. A aplicação de 5% e 10% do SLC de *E. faecium* EO1 em linguiça ovina frescal foi significativamente eficaz na inibição de *L. monocytogenes* Scott A inoculada no produto, com diferença de 1 ciclo logarítmico, até 21 dias de armazenamento refrigerado, mesmo que a presença de alguns ingredientes na linguiça, como a gordura e a carne ovina, possam ter influenciado na difusão do SLC no produto. Foi possível isolar BAL com potencial bacteriocinogênico proveniente de carne ovina *in natura* e a linguiça ovina frescal pode ser considerada um bom veículo para incorporação do SLC de *E. faecium* EO1 com atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, bioconservação, derivado cárneo, enterocina, metabólito antimicrobiano.

Abstract

The application of lactic acid bacteria (LAB) and/or their antimicrobial metabolites (such as bacteriocins) in food products, capable of inhibiting the multiplication of undesirable (deteriorating and/or pathogenic) microorganisms, is a strategy increasingly studied and used in food biopreservation. In the manufacture of meat products, a good option is the use of meat obtained from animals with advanced age, among which we highlight the sheep meat. Based on this, the objective of this work was to isolate and characterize lactic acid bacteria obtained from sheep meat and evaluate the application of antimicrobial substances synthesized by these bacteria in fresh sheep sausage in the control of *Listeria monocytogenes*. A total of 84 LAB were isolated, of which six presented bacteriocinogenic activity in the Cell Free Supernatant (CFS) against *Listeria monocytogenes* Scott A, besides having proteinaceous nature and microbiologically safe, confirmed by the absence of the enzymes gelatinase, DNase, hemolytic activity and sensibility to some antimicrobials for clinical use. The antimicrobial substances showed stability at different temperatures, pH values and in the presence of salt (NaCl) and curing salts. In addition, they did not show cytotoxicity at dilutions higher than 1:40. The six isolates selected were identified as *Streptococcus gallolyticus* (3) and *Enterococcus faecium* (3), with antimicrobial activities ranging from 200 to 3.200 AU.mL⁻¹. Only the *Enterococcus faecium* EO1 isolate showed genes that encode enterocin A, with maximum production of the antimicrobial substance from 6 hours, during the exponential phase of growth of the microorganism. The application of 5% and 10% of CFS obtained from *E. faecium* EO1 in fresh sheep sausage was significantly effective in inhibiting *L. monocytogenes* Scott A inoculated into the product, with difference of 1 log cycle, up to 21 days under refrigerated storage, even though the presence of some ingredients in sausage, such as fat and sheep meat, may have influenced the diffusion of CFS into the product. It was possible to isolate LAB with bacteriocinogenic potential from fresh sheep meat and fresh sheep sausage can be considered as a good vehicle for the incorporation of CFS from *E. faecium* EO1 with antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial metabolite, biopreservation, enterocin, lactic acid bacteria, meat product.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Mecanismo de ação das bacteriocinas em células bacterianas Gram-positiva.....27

Capítulo 2

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR do isolado de *E. faecium* EO1 proveniente de carne ovina, para identificação do gene estrutural da enterocina A. M: marcador de peso molecular Ladder 1kb; C: controle negativo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923); EO1 isolado positivo para o gene de Enterocina A.....80

Figura 2 - Número de células viáveis (Log UFC.mL⁻¹), produção de substância antimicrobiana (UA.mL⁻¹) e variação do pH durante a multiplicação de *E. faecium* EO1 em 48 horas.....81

Figura 3 - Contagem de *L. monocytogenes* Scott A em linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada, durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (♦) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (■) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (▲) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.....83

Figura 4 - Foto da linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A. Fonte: Autor.....85

Figura 5 - Variação do pH em linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (♦) Tratamento controle: sem adição do micro-organismo indicador e sem adição do SLC; (■) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (▲) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (X) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.....85

Figura 6 - Variação da atividade de água (Aw) em linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (♦) Tratamento controle: sem adição do micro-organismo indicador e sem adição do SLC; (■) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (▲) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (X) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.....87

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1: Oligonucleotídeos e condições de PCR utilizadas para identificação de genes que codificam para a produção das enterocinas A, B, P e L50A/B nos isolados de *E. faecium* de carne ovina.....68
- Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos Sobrenadantes Livres de Células contra *L. monocytogenes* Scott A.....71
- Tabela 3: Perfil de susceptibilidade dos isolados de bactérias ácido lácticas a antimicrobianos de uso clínico.....74
- Tabela 4: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos às diferentes concentrações de NaCl e sais de cura (% de atividade em relação ao controle).....76
- Tabela 5: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos a diferentes valores de pH (% de atividade em relação ao controle).....77
- Tabela 6: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos às diferentes temperaturas (% de atividade em relação ao controle).....78

Sumário

Introdução.....	14
Objetivos.....	18
Objetivo geral.....	18
Objetivos específicos.....	18
Capítulo 1 – Artigo de Revisão	19
Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de matriz cárnea para preservação de produtos cárneos.....	19
1 Introdução.....	21
2 Aspectos gerais das bacteriocinas.....	22
2.1 Classificação das bacteriocinas	23
2.2 Síntese e modo de ação	25
3 Produção de bacteriocinas por BAL isoladas de matriz cárnea.....	28
4 Aplicação de bacteriocinas em alimentos	34
4.1 Uso de bacteriocinas em carnes e produtos cárneos	36
5 Considerações finais.....	42
6 Referências	43
Capítulo 2 – Manuscrito 1	58
Isolamento e caracterização de <i>Enterococcus faecium</i> EO1 oriundo de carne ovina e ação de substâncias antimicrobianas produzidas por este isolado no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> em linguiça ovina frescal.....	58
1 Introdução.....	60
2 Material e Métodos	61
2.1 Amostras.....	61
2.2 Isolamento de BAL.....	62
2.3 Caracterização fenotípica dos isolados de BAL	62
2.4 Identificação de isolados de BAL produtores de substâncias antimicrobianas	62
2.5 Atividade antimicrobiana do Sobrenadante Livre de Células (SLC).....	63
2.5.1 Natureza proteica de substâncias antimicrobianas do SLC	64
2.6 Aspectos de segurança dos isolados de BAL.....	64
2.6.1 Atividade da enzima DNase	64
2.6.2 Atividade da enzima gelatinase	64
2.6.3 Atividade hemolítica	65
2.6.4 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico	65
2.7 Identificação genotípica dos isolados de BAL	65

2.8 Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de NaCl, sais de cura, diferentes valores de pH e temperatura	66
2.9 Quantificação da atividade antimicrobiana do SLC	66
2.10 Citotoxicidade das substâncias antimicrobianas no SLC	67
2.11 Detecção de genes que codificam para a produção de bacteriocinas	67
2.12 Cinética de crescimento e produção de substâncias antimicrobianas	68
2.13 Aplicação e avaliação do SLC de <i>E. faecium</i> em linguiça ovina frescal contaminada com <i>L. monocytogenes</i>	68
2.14 Análise estatística	69
3 Resultados e Discussão	69
3.1 Isolamento e caracterização de BAL.....	69
3.2 Atividade antagonista dos isolados de BAL contra <i>L. monocytogenes</i> Scott A.....	70
3.3 Atividade antimicrobiana do SLC	70
3.3.1 Natureza proteica de substâncias antimicrobianas do SLC	72
3.4 Aspectos de segurança dos isolados de BAL.....	72
3.4.1 Atividade da enzima DNase	72
3.4.2 Atividade da enzima gelatinase	73
3.4.3 Atividade hemolítica	73
3.4.4 Susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos de uso clínico	73
3.5 Identificação molecular dos isolados.....	75
3.6 Avaliação da estabilidade e quantificação da substância antimicrobiana	76
3.6.1 Estabilidade na presença de NaCl, sais de cura, diferentes valores de pH e temperatura.....	76
3.6.2 Citotoxicidade das substâncias antimicrobianas no SLC.....	78
3.6.3 Quantificação da atividade antimicrobiana do SLC.....	79
3.7 Identificação da presença de genes produtores de bacteriocinas	79
3.8 Cinética de crescimento e produção de substância antimicrobiana pelo isolado <i>E. faecium</i> EO1	81
3.9 Aplicação e avaliação da substância antimicrobiana em linguiça ovina frescal contaminada com <i>L. monocytogenes</i> Scott A	82
3.9.1 Verificação do efeito das substâncias antimicrobianas no produto	82
3.9.2 Avaliação do pH e atividade de água no produto	85
4 Conclusões.....	87
5 Agradecimentos.....	88
6 Referências Bibliográficas.....	88
Considerações Finais	99
Referências Bibliográficas	101

Introdução

A indústria de alimentos procura, cada vez mais, produzir alimentos com características sensoriais desejáveis, com uma longa vida útil e com valores nutricionais adequados. Para atingir esses objetivos, investem em novas tecnologias, pesquisa e desenvolvimento, e em programas de controle de qualidade como BPF (Boas Práticas de Fabricação) e APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle).

Paralelamente, a indústria de alimentos tradicionalmente faz uso de conservantes sintéticos/artificiais para garantir a segurança microbiológica dos seus produtos, como sorbato, nitrato, nitrito, benzoato e seus respectivos sais de sódio (Na) ou potássio (K), os quais têm seu uso e segurança comprovados por órgãos regulamentadores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil, o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, e a *European Food Safety Authority* na Europa (CALO et al., 2015; MACWAN et al., 2016; RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

Porém, há uma demanda dos consumidores por alimentos que tenham sofrido tratamentos tecnológicos menos drásticos, preparados com poucos ou mesmo sem aditivos sintéticos e com baixo teor de açúcares, sódio e gorduras. Em contrapartida, essa busca por mais “alimentos naturais e saudáveis” pode ter implicações importantes do ponto de vista microbiológico, devido à diminuição de conservantes presentes nesses alimentos, o que requer, portanto, ser compensado ou restabelecido (DEEGAN et al., 2006; MAURIELLO e VILLANI, 2012; CASABURI et al., 2016).

Essas mudanças do perfil do consumidor contribuíram para o desenvolvimento de novas tecnologias para a conservação de alimentos, como por exemplo, a utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) e/ou seus metabólitos antimicrobianos, como as bacteriocinas e ácidos orgânicos.

As BAL compreendem um grupo amplo de micro-organismos Gram-positivos, apresentam morfologia de cocos, bacilos ou coco-bacilos, não formadores de esporos, anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, catalase e motilidade negativos, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (FUGELSANG e EDWARDS, 2007; MAKAROVA & KOONIN, 2007). Na literatura,

tem-se observado que grande parte das BAL não representam riscos à saúde do consumidor, embasada no amplo emprego destas no processamento de alimentos e pela sua utilização como probióticos. Os isolados de BAL utilizados em alimentos devem apresentar aspectos de segurança aos consumidores dos produtos onde forem aplicados. Para tanto, existem critérios recomendados pela Food and Agriculture Organization (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliação de micro-organismos utilizados em alimentos (DEL PIANO et al., 2006).

As BAL desempenham um papel essencial na fermentação de muitos produtos alimentícios, com uma ampla variedade de cepas sendo rotineiramente utilizadas na produção de derivados lácteos, cárneos, de vegetais e produtos de panificação. Estas bactérias atuam na preservação e modificação de características sensoriais, como sabor e textura (BONOMO et al., 2011; REIS et al., 2012) e, através da produção de substâncias antimicrobianas, podem ser utilizadas na bioconservação de produtos alimentícios (GARCIA et al., 2004; KYUNGWHA e AZLIN, 2007)

A pesquisa e isolamento de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas, especialmente as bacteriocinas, é importante do ponto de vista biotecnológico e científico, devido ao potencial antimicrobiano que estas cepas podem proporcionar (VAN HEEL et al., 2011). Várias espécies e cepas de BAL produtoras de bacteriocinas já foram identificadas, sendo pertencentes aos diversos gêneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e *Enterococcus* (CHEN e HOOVER, 2003).

Diversos autores indicaram que BAL produtoras de substâncias antimicrobianas, isoladas de carne e produtos cárneos, podem contribuir para a segurança de produtos cárneos através da produção de bacteriocinas (BALCIUNAS et al., 2013). Dentre as BAL isoladas de carnes e produtos cárneos, estudos relatam vários gêneros como *Enterococcus* (GOMES et al., 2008; DAL BELLO et al., 2010; SZABÓOVA et al., 2012), *Lactococcus* (DAL BELLO et al., 2010; BISCOLA et al., 2013), *Lactobacillus* (CASTRO et al., 2011; RIVAS et al., 2014; ALI et al., 2016; CASABURI et al., 2016), *Pediococcus* (SIVAKUMAR et al., 2010), entre outros.

A carne ovina é uma boa opção nutricional dentre as carnes vermelhas, pois contém teores de gorduras similares à carne bovina e menos colesterol que a carne de aves, possui alta digestibilidade, elevados níveis de proteínas e ferro, e também por suas características sensoriais (MADRUGA et al., 2007). De acordo com

Behrendt e Weeks (2017), o consumo mundial de cordeiro e carneiro vêm aumentando, e nos próximos 10 anos estima-se que nos países desenvolvidos haverá um aumento de 2% no consumo por pessoa.

Contudo, no mercado brasileiro, o consumo de carne ovina é considerado muito baixo. O consumo anual *per capita* da carne ovina no país é ao redor de 610 gramas, contra um consumo anual per capita de 38 kg de carne bovina, 40 kg de carne de frango e 13 kg de carne suína (FAO, 2012). Além disso, a preferência do consumidor é pelo consumo de carne de ovinos com idade até os 18 meses, sendo que animais adultos, especialmente aquelas com mais de quatro anos, denominado carneiro ou ovelha de descarte, não atingem a mesma aceitação por apresentarem uma textura mais firme e um sabor e odor mais intensos, refletindo em um baixo valor agregado (OSÓRIO et al., 2009; NASSU et al., 2002).

Devido a essas características, a carne de ovinos com idade avançada apresenta-se como uma alternativa para a fabricação de derivados cárneos, pois além de agregar valor à matéria-prima, melhora os aspectos qualitativos relacionados ao sabor e a textura, o que facilita a sua comercialização (PINHEIRO et al., 2007). Então, com o objetivo de melhorar o aproveitamento da carne ovina, estudos realizados no Brasil e no exterior elaboraram alternativas para seu uso, através da produção de derivados cárneos fermentados (CRUXEN et al., 2018), mortadela (ABDULLAH, 2004), copa (DE ANDRADE et al., 2018), dentre outros produtos.

Entre os diversos produtos cárneos, a linguiça frescal se destaca como um dos derivados cárneos mais fabricados no Brasil, fato que talvez se deva a uma elaboração simples e uma tecnologia que utiliza poucos equipamentos, sendo estes relativamente baratos (TERRA, 2003).

Sua obtenção requer uma série de etapas de manipulação, o que aumenta as possibilidades de contaminação por micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, podendo comprometer a qualidade microbiológica do produto final e desta forma reduzir a vida útil do mesmo (MARQUES et al., 2006).

Por isso, torna-se interessante a aplicação de BAL e/ou seus metabólitos com atividade antimicrobiana, a fim de aumentar a segurança microbiológica e vida útil de produtos cárneos, como a linguiça frescal.

De acordo com Balciunas et al. (2013), as bacteriocinas podem ser introduzidas nos alimentos através de vários métodos, podendo ser produzidas *in*

situ pela adição de culturas láticas bacteriocinogênicas substituindo as tradicionais culturas iniciadoras, pela adição dessas como adjuntas ou ainda pela adição direta de bacteriocinas purificadas ou parcialmente purificadas. Sua aplicação geralmente é mais eficiente em produtos elaborados com a matéria-prima na qual a BAL produtora de bacteriocina foi isolada, visto que a mesma apresenta uma melhor adaptação àquele ambiente.

A partir do exposto, realizou-se o isolamento e caracterização de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), proveniente de carne ovina, e avaliou-se a bioconservação proporcionada por essas substâncias em uma linguiça ovina frescal, elaborada a partir de retalhos cárneos ovinos procedentes de categorias de animais mais velhos.

Objetivos

Objetivo geral

Isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas (BAL) provenientes de carne ovina e avaliar a ação de substâncias antimicrobianas produzidas por estes isolados em linguiça ovina frescal, no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Objetivos específicos

- Verificar a produção de substâncias antimicrobianas por BAL isoladas de carne ovina;
- Analisar a atividade antimicrobiana do Sobrenadante Livre de Células (SLC) frente a *Listeria monocytogenes* Scott A;
- Avaliar a segurança microbiológica dos isolados produtores de substâncias antimicrobianas;
- Identificar molecularmente os isolados produtores de substâncias antimicrobianas;
- Verificar a estabilidade da substância antimicrobiana em diferentes faixas de pH, temperaturas, concentração de sal e sais de cura;
- Avaliar a citotoxicidade do SLC;
- Identificar a presença de genes produtores de bacteriocinas;
- Determinar o perfil de crescimento e produção de substâncias antimicrobianas pelo isolado de BAL;
- Avaliar a ação antimicrobiana de diferentes concentrações de SLC contendo substâncias antimicrobianas na linguiça ovina frescal, elaborada com carne de animais adultos, e experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A.

Capítulo 1 – Artigo de Revisão

Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de matriz cárnea para preservação de produtos cárneos

Artigo aceito para publicação no periódico **Journal of Food Quality**

Hindawi
Journal of Food Quality
Volume 2019, Article ID 4726510, 12 pages
<https://doi.org/10.1155/2019/4726510>



Review Article

Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat

Roger J. da Costa ¹, **Flávia L. S. Voloski** ¹, **Rafael G. Mondadori** ², **Eduarda H. Duval**,¹
and **Ângela M. Fiorentini** ¹

¹Post Graduate Program of Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

²Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

Correspondence should be addressed to Ângela M. Fiorentini; angefiore@gmail.com

Received 11 October 2018; Revised 5 December 2018; Accepted 13 December 2018; Published 10 January 2019

Academic Editor: Giuseppe Zeppa

Copyright © 2019 Roger J. da Costa et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de matriz cárnea para preservação de produtos cárneos

Roger Junges da Costa¹; Flávia Liége Schutz Voloski¹; Rafael G. Mondadori²; Eduarda Hallal Duval¹; Ângela Maria Fiorentini^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 96010-900, Pelotas/RS, Brasil.

¹ Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 96010-900, Pelotas/RS, Brasil.

*Autor para correspondência: angefiore@gmail.com

Resumo

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente, capazes de inibir bactérias deteriorantes e/ou patogênicas. Os micro-organismos produtores de bacteriocinas mais estudados pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), pois possuem um grande potencial de aplicação na bioconservação de alimentos, visto que a maioria possui o *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*). O uso e estudo de BAL produtoras de bacteriocinas e/ou as bacteriocinas produzidas por essas bactérias tem sido largamente pesquisado, com ênfase naquelas procedentes de leite e produtos lácteos e, com menos destaque aos isolados de carnes e derivados. O objetivo desta revisão é abordar de maneira geral as principais características, classificação e modo de ação das bacteriocinas e seu uso em alimentos. O foco está em destacar pesquisas sobre isolamento de BAL com potencial bacteriocinogênico proveniente de carnes e produtos cárneos e que realizaram a caracterização, purificação e aplicação dessas bacteriocinas em produtos cárneos. Foi possível verificar que existem vários trabalhos com diversos produtos cárneos, sendo que a maioria dos micro-organismos estudados pertence aos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*, e que são responsáveis pela produção de bacteriocinas como nisina, enterocina, pediocina, pentocina e sakacina, das quais muitas possuem potencial para uso na bioconservação de alimentos.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, bacteriocinas, produtos cárneos, atividade bacteriocinogênica.

1 Introdução

Cada vez mais os consumidores estão preocupados com os efeitos que a ingestão de aditivos alimentares pode causar à sua saúde, como alergias, alterações comportamentais, neoplasias e efeitos carcinogênicos, optando por alimentos “naturais” e “tradicionais”, processados com pouco ou sem aditivos sintéticos (BALCIUNAS et al., 2013).

Além disso, a possível contaminação da carne *in natura* e de produtos cárneos, aliado a capacidade de alguns micro-organismos de se adaptarem facilmente às condições ambientais desfavoráveis, pode representar um risco microbiológico (CASABURI et al., 2016). Por exemplo, *Listeria monocytogenes* pode sobreviver ao processamento de linguiça seca apesar de vários obstáculos, como baixo pH, sal e nitritos, e pode ocasionar doenças transmitidas por alimentos (DTA) (FONTANA et al., 2015; MARTIN et al., 2011).

Para manter a qualidade e segurança microbiológica desses produtos, tem-se como alternativa a bioconservação de alimentos, que é uma técnica utilizada para estender a vida útil dos alimentos e aumentar a segurança por meio da aplicação de uma microbiota protetora, como por exemplo as bactérias ácido lácticas, e utilizar suas propriedades antibacterianas, como a produção das bacteriocinas (OLIVEIRA et al., 2012).

A aplicação de bacteriocinas na bioconservação dos alimentos oferece muitos benefícios, como o aumento da vida útil dos produtos, a redução do risco de veiculação de micro-organismos patogênicos e a possibilidade de diminuir ou evitar a utilização de conservantes sintéticos (CASTELLANO et al., 2008; GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas consistem em um grupo de pequenos peptídeos ou proteínas bioativas, sintetizadas ribossomicamente por bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, que são liberadas extracelularmente, e apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas e deteriorantes, o que justifica o seu potencial biotecnológico (MARTINEZ et al., 2013; BESHKOVA e FRENGOVA, 2012).

A identificação de bactérias ácido lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas tem ganhado grande impulso biotecnológico e científico devido ao potencial antimicrobiano que essas substâncias podem proporcionar aos alimentos (VAN HEEL et al., 2011). Até 2015, em torno de 185 BAL produtoras de bacteriocinas

foram isoladas e apenas 53% foram bem caracterizadas e sequenciadas em nível molecular (WORAPRAYOTE et al., 2016). Este grupo de micro-organismos é considerado seguro para o consumo, possui longa tradição como bactérias de grau-alimentício, pode exercer efeito bioprotetor ou inibitório contra outros micro-organismos como resultado da competição por nutrientes e/ou pela produção de bacteriocinas ou outros compostos antagonistas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e enzimas (CASTELLANO et al., 2008). Dentre as BAL encontradas em carnes e produtos cárneos, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* têm sido descritas como as principais produtoras desses compostos antimicrobianos, sendo responsáveis pela produção de sakacinas e curvacinas, respectivamente (BARBOSA et al., 2015; CASABURI et al., 2016; FONTANA et al., 2015; TODOROV et al., 2013).

A partir do exposto, objetivou-se nesta revisão abordar de maneira geral as principais características, classificação e modo de ação das bacteriocinas, seu uso em alimentos, e detalhar trabalhos que caracterizaram, purificaram e/ou aplicaram bacteriocinas, produzidas por BAL isoladas a partir de uma matriz cárnea, em produtos cárneos.

2 Aspectos gerais das bacteriocinas

As bacteriocinas consistem em peptídeos antimicrobianos, que atuam contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, no entanto a bactéria produtora é portadora de mecanismos de imunidade específicos que a protegem de sua própria bacteriocina (CHEN e HOOVER, 2003; COTTER et al., 2013).

São amplamente reconhecidas como substâncias seguras, não ativas ou citotóxicas em células eucarióticas, inativadas por enzimas digestivas (proteases), com pouca influência sobre a microbiota intestinal. Apresentam atividade bactericida e/ou bacteriostática, sendo normalmente, a membrana citoplasmática das bactérias o seu alvo. Além disso, não apresentam resistência a antibióticos e seus determinantes genéticos são codificados em plasmídeos, facilitando a manipulação genética (GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas produzidas por BAL diferenciam-se por suas particularidades bioquímicas, genéticas, estruturais e atividade metabólica. A maioria apresenta massa molecular reduzida (3 a 10 kDa), são eletricamente neutras e incluem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (EIJINK et al., 2002).

Atualmente, existem controvérsias com relação à classificação das bacteriocinas, mas apesar disso, uma das classificações mais recentes utilizada é a de Cotter et al. (2013) que separou as bacteriocinas produzidas por Gram-positiva daquelas que são produzidas por Gram-negativa.

2.1 Classificação das bacteriocinas

As bacteriocinas de bactérias Gram-positiva foram divididas em apenas duas Classes, I e II, onde a Classe I seria formada por peptídeos de baixo peso molecular (< 10 kDa), termoestáveis, hidrofóbicos, catiônicos, que possuem resíduos modificados pós-traducionais como lantionina e metilantionina, onde a principal representante desta classe é a nisina. A nisina, por exemplo, age através da formação de poros, levando à dissipação do potencial de membrana e ao efluxo de pequenos metabólitos em células sensíveis (HAMMOU et al., 2010; ALVAREZ-SIERO et al., 2016).

A classe II compreende bacteriocinas constituídas por peptídeos também termoestáveis e de baixo peso molecular (<10 kDa), hidrofóbicos, catiônicos, porém apresentam, de forma geral, uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual possibilita a sua inserção na membrana citoplasmática da célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e a morte celular (DRIDER et al., 2006).

As Classes III e IV propostas até então foram excluídas, sendo que a Classe III, na classificação anterior, era relacionada a peptídeos com elevado peso molecular (>30 kDa), termolábeis, subdivididas em duas subclasses: IIIa ou bacteriolisinas e IIIb. Os peptídeos da subclasse IIIa promoviam a lise celular através da hidrólise da parede celular do micro-organismo alvo, tendo como exemplo a lisostafina e enterolisina A. A subclasse IIIb, em contraste, compreendia os peptídeos que não causavam lise, mas sim dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. A helveticina J é exemplo desta subclasse. Já a Classe IV (complexos de bacteriocinas, geralmente globulares com

atividade dependente da associação de um ou mais grupos funcionais como carboidratos ou fosfolipídeos; ex: lactocina 27 e leuconocina S) não entrou na classificação, pois a designação de bacteriocinas corresponderia apenas aos peptídeos pequenos sintetizados nos ribossomos, não incluindo outras proteínas antimicrobianas de elevado peso molecular (OGAKI et al., 2015; HENG et al., 2007; COTTER et al., 2005).

A classe II ficou dividida da seguinte maneira: subclasse IIa - representada por pediocina PA-1, sakacina A e P, enterocina A e P, leucocina A, curvacina A e carnobacteriocina B2, sendo considerada a maior subclasse, com mais de 50 membros caracterizados (CASTELLANO et al., 2017). Esses peptídeos possuem um restrito espectro de inibição, mas são conhecidos por sua forte atividade anti-listerial, e têm sido extensivamente estudados em relação à genética, estrutura e modo de ação (ALVAREZ-SIERO et al., 2016). Além disso, podem possuir espectro de atividade frente a outros micro-organismos deteriorantes e patogênicos como *Brochothrix* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. (ENNAHAR et al., 2000); subclasse IIb - composta por bacteriocinas heterodiméricas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos. Seu mecanismo de ação envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. A primeira bacteriocina relatada, contendo dois peptídeos e obtida de uma BAL isolada de carne, foi a lactocina 705 produzida por *Lactobacillus curvatus* CRL705, a qual demonstrou atividade inibitória frente a algumas BAL e também contra *Brochothrix thermosphacta* (CASTELLANO et al., 2002; CASTELLANO e VIGNOLO, 2006). Além disso, outros exemplos dessa classe são a plantaricina EF, JK e S (*Lactobacillus plantarum*), enterocina 1071 (*Enterococcus faecalis*), lactococina G e MN (*Lactococcus lactis*) (COTTER et al., 2005), e mais recentemente a lactococina Q (*Lactococcus lactis* QU 4 do milho) e enterocina X (*Enterococcus faecium* KU-B5 de maçã doce tailandesa) (WORAPRAYOTE et al., 2016; PEREZ et al., 2014); subclasse IIc (antiga Classe V) - As bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações carbono (C) e nitrogênio (N), resultando em uma estrutura cíclica. Exemplos: circularina A (*Clostridium beijerinckii*) e reutericina 6 (*Lactobacillus reuteri*) (COTTER et al., 2005); e aquelas produzidas por BAL isoladas de carne como enterocina AS-48 (*Enterococcus* de diversos produtos cárneos), carnociclina A (*Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 de

carne suína) e garvicina ML (*Lactococcus garvieae* DCC43 de carne de ave) (ACEDO et al., 2015).

Segundo essa classificação, a Classe I corresponde às bacteriocinas que sofrem extensas modificações pós-traducionais. Já a Classe II engloba as bacteriocinas que não sofrem tais modificações e também aquelas que sofrem modificações modestas, como a formação de pontes dissulfeto, a circularização ou a adição de N-formilmetionina. Já as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativa pertenceriam a dois grupos distintos, um de peptídeos pequenos, como as microcinas (*Escherichia coli*), e um segundo de peptídeos grandes, as colicinas (*Escherichia coli*) (OGAKI, et al., 2015).

2.2 Síntese e modo de ação

O mecanismo de síntese das bacteriocinas pode ser induzido, muitas vezes, pelas condições de estresse, como o aumento populacional e a escassez de nutrientes, bem como afetada pelo tipo de fonte de carbono, nitrogênio e fosfato presentes no meio, ou até mesmo por cátions surfactantes e outros inibidores (RILEY, 2011; SAVADOGO et al., 2006). Além disso, também pode ser regulado por *quorum sensing*: uma forma de comunicação célula-célula, onde as células presentes no ambiente produzem moléculas sinalizadoras (auto-indutoras) em função da densidade populacional (EIJSINK et al., 2002; TUROVSKIY et al., 2007). O limiar que ativa a produção de bacteriocinas varia entre os micro-organismos, e baseia-se na síntese de peptídeos denominados feromônios, os quais após atingirem esse limiar, ativam a produção das bacteriocinas (EIJSINK et al., 2002; TUROVSKIY et al., 2007; CLEVELAND et al., 2001; NES et al., 2007).

A produção de bacteriocinas ocorre durante a fase de crescimento exponencial ou no final dessa fase, mantendo uma relação direta com a produção de biomassa e pela regulação de um peptídeo indutor (feromônio). Este feromônio é sintetizado nos ribossomos e secretado no ambiente externo pelo sistema transportador. Quando esse composto atinge uma concentração limiar, inicia-se a transcrição da bacteriocina através da expressão de quatro genes: o primeiro é responsável pela produção do pré-peptídeo biologicamente inativo; o segundo confere a produção de uma proteína de imunidade específica à célula produtora; o

terceiro é o gene que codifica proteínas do transportador ABC, responsável por exteriorizar a bacteriocina, e o quarto gene codifica uma proteína acessória essencial para a exteriorização da bacteriocina (EIJSINK et al., 2002; CLEVELAND et al., 2001; NES et al., 2007; NES e EIJSINK, 1999).

Após sofrerem modificações, os pré-peptídeos prematuros são enzimaticamente clivados para remoção da sequência sinal e são transportados para o meio extracelular, já como uma bacteriocina madura (EIJSINK et al., 2002; TUROVSKIY et al., 2007; LEE e KIM, 2011).

Existe um consenso, quanto à hipótese que explica que a maioria das bacteriocinas interage com lipídeos aniônicos presentes na membrana celular das bactérias-alvo, provocando sua permeabilização através da formação de poros na mesma. Eventualmente, essa interação pode causar a morte da célula-alvo, promovendo a dissipação da força próton motora (PMF) e a inibição do transporte de aminoácidos. A PMF está envolvida em diversos processos na membrana celular, como o acúmulo de íons e metabólitos, e a síntese de ATP (ZACHAROF e LOVITT, 2012; GUILHELMELLI et al., 2013).

De acordo com Cotter et al. (2013), o mecanismo de ação das bacteriocinas em bactérias Gram-positiva pode ocorrer de acordo com 2 modelos, demonstrados na Figura 1. No modelo denominado Classe I, ocorre a passagem pela parede celular e assim, as bacteriocinas inibem o lipídeo II presente na membrana celular, inibindo conseqüentemente a síntese de peptidoglicano (componente da parede celular). No modelo Classe II, também ocorre a passagem pela parede celular e a formação de poros na membrana celular, através da ligação a um receptor formador de poros, presente no sistema manose-fosfotransferase. Além disso, sabe-se que, algumas bacteriocinas da Classe I, como a nisina, são capazes de realizar os dois mecanismos de ação.

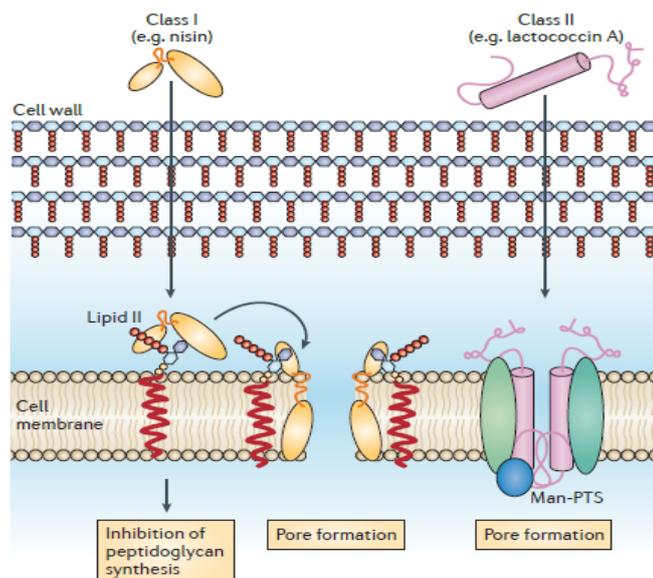


Figura 1: Mecanismo de ação das bacteriocinas em células bacterianas Gram-positiva.

Fonte: Cotter et al. (2013)

A maioria das bacteriocinas apresenta efeito bactericida. Para que esse efeito ocorra, o micro-organismo indicador deverá apresentar sensibilidade ao antimicrobiano que, mesmo em baixas concentrações, deverá ser capaz de provocar a morte celular, rapidamente. A sensibilidade de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa às bacteriocinas tem como base a composição química da parede celular.

Embora muitas bacteriocinas produzidas por BAL, como nisina e pediocina, tenham sido aprovadas e amplamente utilizadas em produtos alimentícios (ZACHAROF e LOVITT, 2012), a incapacidade de inibir patógenos Gram-negativo limita suas aplicações (CLEVELAND et al., 2001; DEEGAN et al., 2006; GILLOR et al., 2008).

Baseado nisso, como a maioria dos patógenos causadores de DTA são bactérias Gram-negativa, estratégias para o uso de bacteriocinas contra estes micro-organismos têm sido avaliadas. Estudos comprovam que bactérias Gram-negativa tornam-se mais sensíveis às bacteriocinas quando a membrana externa da parede celular é desestabilizada por algum fator como estresse químico (ácidos orgânicos, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), óleos essenciais ou agentes quelantes) ou estresse físico (pH, aquecimento, congelamento, alta pressão hidrostática ou campo elétrico pulsado). Com isso, são capazes de transpor a membrana externa da

parede e alcançar a membrana celular da célula-alvo, para atuarem (ENNAHAR et al., 2000; WILLEY e VAN DER DONK, 2007; SANG e BLECHA, 2008; GAUTAM e SHARMA, 2009; COTTER et al., 2013; PRUDÊNCIO et al., 2015).

Alguns peptídeos demonstraram efeito adicional ou sinérgico quando utilizados combinados com outros compostos ou tratamentos, considerando-os como parte da teoria dos obstáculos (ou mecanismo de barreira) (GÁLVEZ et al., 2008) e não o único agente conservante, isto porque ainda não são conhecidas todas as características das bacteriocinas (BHARTI et al., 2015). Neste contexto, o uso de intervenções sequenciais em diferentes pontos do processamento de carne e produtos cárneos (teoria dos obstáculos múltiplos), deve ser considerado, a fim de melhorar a segurança microbiológica de carnes, aves e seus derivados (CASTELLANO et al., 2017).

Além disso, as bacteriocinas também podem ter ação bacteriostática, dependendo da sua dose e grau de purificação, do estado fisiológico das células indicadoras (por exemplo, fase de crescimento) e das condições experimentais (temperatura, pH, presença de agentes que alteram a integridade da parede celular e outros compostos antimicrobianos) (CINTAS et al., 2001; JUODEIKIENE et al., 2012).

3 Produção de bacteriocinas por BAL isoladas de matriz cárnea

Nos últimos 10 anos, inúmeros estudos têm sido realizados para isolar BAL de carnes e produtos cárneos, e estudar seu potencial bacteriocinogênico para uma futura aplicação em produtos alimentícios.

Trinta amostras de diferentes produtos cárneos, como carne moída, carne processada, miúdos, carne de frango, bacon, carne suína e pescado fresco, foram avaliadas, tendo sido obtidos 60 isolados de BAL. *Enterococcus* sp. apresentou uma prevalência de 60% nos produtos, onde *E. faecium* e *E. faecalis* foram as espécies mais encontradas, respectivamente. Dentre os 60 isolados, somente 9 apresentaram atividade bacteriocinogênica (GOMES et al., 2008).

Dal Bello et al. (2010) isolaram BAL de 51 produtos cárneos (8 frescos e 43 fermentados), havendo predominância dos gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus*.

Foram obtidos 23 isolados produtores de bacteriocinas, com potencial bacteriocinogênico frente a *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta* e *S. aureus*, através da codificação pelos genes *nisA*, *nisZ*, *entA* e *entP*.

Na pesquisa realizada por Castro et al. (2011), ao analisarem diferentes embutidos fermentados, 141 cepas características de BAL foram isoladas, das quais apenas uma apresentou sensibilidade às enzimas tripsina e proteinase K, sendo identificado como *Lactobacillus curvatus/sakei* ACU-1. Essa bacteriocina apresentou estabilidade térmica em uma ampla faixa de tempo e temperatura e também durante o armazenamento sob refrigeração e congelamento. Sua produção foi diretamente influenciada pela presença de surfactantes e pela concentração de NaCl (cloreto de sódio), não sendo afetada pela presença de KCl (cloreto de potássio), EDTA, sorbato de potássio e citrato de sódio.

No trabalho de Rivas et al. (2014), foi analisada a cepa de *L. curvatus* ACU-1 isolada de embutido cárneo fermentado. Ao verificar a presença de genes produtores de bacteriocinas, detectaram o gene estrutural *sppQ*, produtor da sakacina Q, pertencente a subclasse IIc. O SLC (sobrenadante livre de células) foi aplicado na superfície de carnes previamente inoculadas com *L. innocua*, e a bacteriocina foi capaz de inibir o crescimento do micro-organismo indicador após 4 semanas de armazenamento.

Fontana et al. (2015) isolaram 115 BAL de carne crua e produtos cárneos fermentados provenientes da Argentina com atividade anti-*Listeria*. As espécies obtidas foram *Lactobacillus sakei* (71 isolados), *Lactobacillus curvatus* (14 isolados), *Lactobacillus plantarum* (7 isolados), *Enterococcus faecium* (16 isolados) e *Pediococcus acidilactici* (7 isolados). Ao analisar a presença de genes codificadores de bacteriocinas, foram identificados os seguintes genes: *sapA* (curvacina A), *sppQ* (sakacina Q), *sppA* (sakacina P), *plnEF* (plantaricina EF), *plnA* (plantaricina A), *entA* (enterocina A), *entP* (enterocina P) e *entB* (enterocina B). Com este estudo, os autores verificaram o potencial de *L. sakei* e *E. faecium* para serem usados como culturas bioprotetoras e um obstáculo adicional no controle de *L. monocytogenes* na carne crua e produtos cárneos.

Ali et al. (2016) isolaram 30 BAL provenientes de 7 amostras de carne bovina, sendo que somente 2 isolados (*Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus graminis*) produziram bacteriocinas estáveis à temperaturas variando de 40 a 60°C e a pH de 5 a 7.

Ao descreverem o isolamento e identificação de *L. curvatus* 54M16 a partir de embutidos fermentados tradicionais da Itália, Casaburi et al. (2016) verificaram que esse isolado foi capaz de produzir mais de uma bacteriocina, visto que possuía os genes codificadores para sakacina X, T e P. Apresentou atividade antimicrobiana especialmente frente as bactérias Gram-positiva, como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, e também frente a um importante deteriorante cárneo, *Brochothrix thermosphacta*. Além disso, o próprio micro-organismo demonstrou bom potencial para ser utilizado como cultura iniciadora na produção de embutidos fermentados, afetando positivamente o sabor e aceitabilidade geral dos produtos.

Além desses, outros estudos avaliando BAL provenientes de carnes e produtos cárneos e suas bacteriocinas têm gerado resultados promissores para a sua aplicação como possíveis bioconservadores nesses tipos de produtos, conforme sintetizados no Quadro 1:

Quadro 1: Caracterização de BAL isoladas de carnes e produtos cárneos e suas bacteriocinas, com relação a estabilidade a temperatura, pH, surfactantes e aditivos, e espectro de ação.

Micro-organismo produtor / Bacteriocina	Fonte	Estabilidade	Espectro de ação	Referência
<i>Pediococcus acidilactici</i> / Pediocina SA-1	Linguiça seca	100 °C/121 °C/60 min. -80, -20, 4 e 30 °C pH 3 – 12	Patogênicos Deteriorantes	Anastasiadou et al. (2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 31 / Plantaricina	Embutido seco- fermentado	Altas temperaturas pH ácido	<i>S. aureus</i> / <i>L. monocytogenes</i> <i>B. cereus</i> / <i>Pseudomonas</i> sp.	Müller et al. (2009)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Carne <i>in natura</i>	Altas e baixas temperaturas pH 3 – 9	<i>E. coli</i> / <i>B. cereus</i> / <i>S. aureus</i> <i>Salmonella typhi</i> / <i>Vibrio cholerae</i> <i>Shigella</i> sp. / <i>E. faecalis</i>	Sivakumar et al. (2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i> / BacST202Ch BacST216Ch	Embutidos defumados suínos	Altas e baixas temperaturas pH Triton X-100 / Tween 80 / Tween 20 SDS (dodecil sulfato de sódio) NaCl / Ureia / EDTA	Gram-positiva Gram-negativa	Todorov et al. (2010)
<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3 / Enterocinas NKR-5-3A, B, C, D, Z	Pescado fermentado	Temperatura Sal	<i>Enterococcus</i> / <i>Lactobacillus</i> <i>Bacillus</i> / <i>Listeria</i>	Ishibashi et al. (2012)

<i>Enterococcus faecium</i> M3a / Enterocinas A, P, B	Carne de coelho	5% de sais biliares Baixo pH	<i>L. monocytogenes</i> CCM 4699 <i>S. aureus</i> 3A3 <i>S. enterica</i> sorovar Enteritidis PT4	Szaboova et al. (2012)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 69 / Nisina Z	Charque	Elevadas temperaturas pH 2 – 10 SDS / EDTA / Tween 80 / Ureia 20% NaCl	Deteriorantes Halotolerantes	Biscola et al. (2013)
<i>Lactobacillus sakei</i> ST22Ch ST153Ch ST154Ch	Embutido fermentado e curado suíno	Até 100 °C pH 4 – 10 Triton X-100 / Tween 20 / Tween 80 SDS / NaCl / Ureia / EDTA	<i>E. faecium</i> ATCC 19443 <i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> ATCC 19119 <i>L. monocytogenes</i> NCTC 11944, NCTC 7973 e Scott A	Todorov et al. (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i> BM-1 / Plantaricina BM-1	Produto cárneo fermentado	Altas temperaturas pH 2-10	Gram-positiva Gram-negativa	Zhang et al. (2013)
<i>Lactobacillus curvatus</i> MBSa2 e MBSa3 / Sakacina P e X	Salame tipo italiano	Temperaturas: 4 – 121 °C pH 2 - 8 NaCl 2-10%	<i>L. monocytogenes</i>	Barbosa et al. (2015)
<i>Weissella hellenica</i> BCC 7239 / 7293A e 7293B	Linguiça fermentada suína	Altas e baixas temperaturas pH Etanol / Isopropanol / Acetona Acetonitrila / Tween 20 / Tween 80 Triton X-100	Gram-positiva Gram-negativa: <i>P. aeruginosa</i> / <i>S. typhimurium</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> / <i>E. coli</i>	Woraprayote et al. (2015)

<i>Lactobacillus plantarum</i> M1-UVs300/ M1-UVs300	Linguiça fermentada	Altas e baixas temperaturas pH ácido Citrato de sódio / Eritorbato de sódio Tripolifosfato de sódio	Gram-positiva Gram-negativa	An et al. (2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i> -GS16 <i>Lactobacillus paraplantarum</i> -GS54 / <i>L.p.</i> -GS16 <i>L.p.p.</i> -GS54	Fatias de presunto	100°C/60 min. Refrigeração (2 meses) pH 2 – 10	Gram-positiva Gram-negativa	Anacarso et al. (2017)
<i>Lactobacillus alimentarius</i> FM-MM ₄ / Lactocina MM ₄	Produto cárneo fermentado	Altas e baixas temperaturas pH 2 – 5	Gram-positiva Gram-negativa Leveduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia sp.</i> / <i>Candida albicans</i>	Hu et al. (2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i> DY4-2 / DY4-2	Pescado	50°C, 100°C e 121°C/30 min. pH 2,5 – 5,5	<i>P. fluorescens</i> / <i>P. aeruginosa</i> <i>Vibrio harveyi</i> / <i>B.cereus</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Psychrobacter sp.</i> / <i>B. licheniformis</i> <i>L. monocytogenes</i>	Lv et al. (2018)

A partir dos trabalhos relatados, percebe-se que apesar de ser comum a presença de BAL em carnes e produtos cárneos, há poucos estudos sobre micro-organismos isolados desses produtos e que possuam atividade bacteriocinogênica, quando comparado com aqueles de procedentes de produtos lácteos.

4 Aplicação de bacteriocinas em alimentos

A indústria cárnea utiliza conservantes como os sais de cura (nitrito e nitrato de sódio ou potássio) com o objetivo de inibir o crescimento microbiano, fixar cor, conferir sabor e aroma característicos, além de retardar a oxidação lipídica. Em embutidos fermentados (consumidos crus), a adição destes aditivos químicos visa inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*, cuja toxina causa o botulismo (JUDGE et al., 1989; ESKANDARI et al., 2013).

Em contrapartida aos efeitos benéficos resultantes da utilização dessas substâncias na conservação de alguns gêneros alimentícios, o excesso de consumo tem causado preocupação em virtude dos efeitos nocivos à saúde humana, relacionados à formação de compostos químicos cancerígenos, como nitrosaminas nos alimentos (ESKANDARI et al., 2013; DUARTE e CARRIJO, 2014).

Devido à demanda dos consumidores por alimentos naturais e de boa qualidade microbiológica, bem como os requisitos governamentais rigorosos que estabelecem limites na quantidade de nitritos utilizados em produtos à base de carne, para garantir a segurança dos alimentos, os fabricantes de alimentos enfrentam desafios conflitantes (FRANZ et al., 2010). Por isso, com o aumento da percepção negativa frente aos aditivos químicos sintéticos, agentes antimicrobianos naturais, como as bacteriocinas, têm sido amplamente estudados e testados quanto à sua eficácia em alimentos (WORAPRAYOTE et al., 2016).

O uso de bacteriocinas em sistemas de bioconservação pode suprir a demanda dos consumidores por conservantes naturais, sendo também considerado uma medida de segurança adicional aos produtos minimamente processados, que dependem apenas de refrigeração como meio de conservação (DE MARTINIS et al., 2002). Além disso, como as bacteriocinas são capazes de matar o micro-organismo alvo através da ruptura da integridade da membrana, elas são menos propensas a

induzir resistência, visto que seus fragmentos não interagem com as células-alvo, e podem ser consideradas uma solução potencial para o crescente problema de resistência microbiana aos antibióticos (YANG et al., 2014; AHMAD et al., 2017; COTTER et al., 2013).

Segundo Ross et al. (1999), o potencial de aplicação de uma determinada bacteriocina pode ser predito por suas propriedades, como estabilidade à temperatura, pH e amplo espectro de ação.

Além disso, o uso de bacteriocinas não pode oferecer riscos à saúde do consumidor, nem afetar a qualidade nutricional e sensorial do alimento, devendo a linhagem produtora ter *status* GRAS (GAUTAM e SHARMA, 2009).

De maneira geral, existem três formas através das quais as bacteriocinas podem ser incorporadas a um alimento para melhorar a sua segurança: (1) utilizando uma preparação purificada ou semipurificada da bacteriocina como ingrediente alimentar; (2) pela incorporação de um ingrediente que foi anteriormente produzido por uma BAL produtora de bacteriocina ou (3) pela utilização de BAL produtora de bacteriocina, como cultura iniciadora ou adjunta, diretamente no produto fermentado para produção da bacteriocina *in situ* (ARTHUR et al., 2014; CHEN e HOOVER, 2003; GÁLVEZ et al., 2008).

Para a aplicação de bacteriocinas nos alimentos, diferentes técnicas podem ser utilizadas, como: adição direta na formulação do alimento ou imersão do mesmo em solução contendo o peptídeo; adsorção da bacteriocina em filmes plásticos tipo polietileno ou filmes comestíveis a base de celulose, em superfícies como acetato de vinil etileno, polipropileno, poliéster, entre outros; e invólucros antimicrobianos contendo preparados de bacteriocinas e culturas de BAL. Todas essas técnicas podem ser utilizadas como estratégias tecnológicas baseadas na teoria dos obstáculos múltiplos, com o objetivo de reduzir DTA (APPENDINI E HOTCHKISS, 2002; DRIDER et al., 2006; DEEGAN et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2008; GAUTAM e SHARMA, 2009).

De acordo com Castellano et al. (2017), para assegurar a eficácia de sua atividade, testes contra bactérias-alvo específicas devem ser realizados no próprio alimento no qual a bacteriocina será aplicada. Dessa maneira, devem ser considerados alguns fatores que podem influenciar na propagação das bacteriocinas no alimento, como: concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, enzimas presentes no alimento, solubilidade no produto, conteúdo e superfície lipídica disponível para

solubilização, distribuição uniforme no alimento e possível inativação por outros aditivos (TIWARI et al., 2009).

O uso comercial de bacteriocinas ocorre em muitos países como a nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. De acordo com Harris et al. (1992), esta bacteriocina foi descrita pela primeira vez por Rogers (1928) como uma substância inibidora do crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*. Posteriormente, foi concluído de que também inibia o crescimento de outras bactérias Gram-positiva e de esporos de *Clostridium* e *Bacillus* (DELVES-BROUGHTON, 1990). A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela FAO/OMS em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg (UI/Kg) de peso corpóreo. Mais de 50 países permitem o seu uso em produtos como leite, queijo processado, queijo ralado, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, carne enlatada, produtos de cervejaria e maionese (DE MARTINIS et al., 2002; ROSS et al., 1999; SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO et al., 2008). Já no Brasil é restrita a preparados à base de queijos fundidos, em queijos fundidos, requeijão, em queijo pasteurizado e às superfícies de salsichas, pois não é resistente ao tratamento térmico, o que limita a sua aplicação em demais produtos cárneos (DEEGAN et al., 2006).

Além da nisina, a pediocina PA-1/AcH (ALTA™ 2341), produzida por *Pediococcus acidilactici*, é outra bacteriocina que pode ser usada como ingrediente comercial na bioconservação de alimentos, como linguiças secas e produtos cárneos fermentados (COTTER et al., 2005; GÁLVEZ et al., 2007; GÁLVEZ et al., 2008).

4.1 Uso de bacteriocinas em carnes e produtos cárneos

As bacteriocinas produzidas por BAL têm sido utilizadas com ação antimicrobiana em carcaças bovinas e de aves e também na carne *in natura* com grande eficiência. O uso de *spray* contendo a combinação de nisina e ácido láctico (1,5%, 25 °C) foi mais eficiente na redução da contagem de bactérias aeróbias, coliformes e *Escherichia coli* do que o uso somente da bacteriocina (BARBOZA et al., 2002). Por sua vez, as culturas bioprotetoras de *E. faecium* PCD71, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC179 e a aplicação combinada de diferentes bacteriocinas da

subclasse IIa foram capazes de reduzir o crescimento de *L. monocytogenes* em diferentes produtos cárneos (MARAGKOUDAKIS et al., 2009; DORTU et al., 2008; HARTMANN et al., 2011). Contudo, em carne de peru armazenada sob aerobiose a 10 °C, o uso de *L. plantarum* BFE5092, produtor das plantaricinas EF, JK e N, falhou na inibição efetiva de *L. monocytogenes* (CHO et al., 2010).

Em produtos cárneos, a aplicação de nisina pode ter limitações devido à baixa solubilidade dessa bacteriocina nesses produtos, à possibilidade de destruição por enzimas da carne *in natura* e à ineficiência de inibição de vários organismos patogênicos ou deteriorantes de importância em carnes (DE MARTINIS et al., 2002).

Depois da nisina, a pediocina (*Pediococcus acidilactici*), é a bacteriocina mais estudada devido à sua atividade antimicrobiana frente a *Listeria* spp., sendo sua ação empiricamente relacionada com o uso, por muitos anos, dessa cepa como cultura iniciadora em vários alimentos fermentados (DÍEZ et al., 2012), como vegetais (chucrute), carnes (embutidos) (PAPAGIANNI e ANASTASIADOU, 2009) e produtos lácteos (queijos) (DRIDER et al., 2006).

Na indústria cárnea, o uso da pediocina PA-1 ou de culturas produtoras dessa bacteriocina auxilia no controle microbiano durante a fermentação ou na inibição do crescimento de micro-organismos deteriorantes durante o armazenamento. Além disso, seu uso pode ser combinado com outras tecnologias de conservação, pois possui a vantagem de ser ativa em pH ácido e atua sinergicamente com outros compostos como lactato ou ácidos orgânicos (DRIDER et al., 2006).

Em estudo de Kalschne et al. (2014), tanto o uso de pediocina quanto o de nisina, mostraram efeito significativo na redução das contagens de *Lactobacillus sakei* isoladas de amostras de presunto cozido fatiado embalado a vácuo. Em outro trabalho, *P. acidilactici* MCH14, produtor de pediocina PA-1, exibiu grande efetividade na inibição de *L. monocytogenes* e *Clostridium perfringens* em embutido fermentado seco, produzido na Espanha (NIETO-LOZANO et al., 2010). Já a cepa de *P. pentosaceus* BCC3772 (produtor da pediocina PA-1/Ach) foi capaz de exercer atividade anti-listerial durante a fermentação de um embutido produzido com carne suína tradicional da Tailândia, sem alterar significativamente suas características sensoriais (KINGCHA et al., 2012).

Ao avaliar o efeito da bacteriocina denominada pentocina 31-1, produzida por *Lactobacillus pentosus* 31-1 (isolado de um presunto fermentado tradicional chinês), sobre a qualidade microbiológica, físico-química e sensorial da carne suína resfriada

embalada, Zhang et al. (2010) demonstraram que o uso da bacteriocina foi capaz de aumentar a vida útil do produto em 15 dias, mantendo suas características sensoriais e físico-químicas. Além disso, inibiu o crescimento de patógenos, como *L. monocytogenes*, e micro-organismos deteriorantes, como *Pseudomonas fluorescens*.

A bacteriocina semi-purificada BacTN635, produzida por *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, isolado de matéria-prima cárnea, foi aplicada em carne moída bovina e peito de frango. Os resultados deste trabalho foram bastante promissores, visto que a bacteriocina inibiu a proliferação de micro-organismos deteriorantes e também de *L. monocytogenes*; melhorou a qualidade sensorial (odor, textura, cor e aceitação global) e os atributos de textura (dureza, elasticidade e rigidez); e aumentou a vida de prateleira dos produtos citados durante armazenamento refrigerado (SMAOUI et al., 2014).

Carne de peru moída *in natura* foi adicionada da bacteriocina semi-purificada BacFL31, produzida pelo isolado *Enterococcus faecium* sp. FL 31 obtido de produto cárneo, e também foi verificado o seu efeito nos parâmetros sensoriais, além de sua ação na conservação deste produto. A bacteriocina inibiu a proliferação de vários micro-organismos deteriorantes e dos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Também foi capaz de manter o pH em valores baixos, uma coloração satisfatória e evitou a rancidez oxidativa (resultado do não desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes). Manteve os parâmetros sensoriais (odor, cor, textura e aceitação global) em níveis aceitáveis por maior tempo quando comparado ao controle, e aumentou a vida útil da carne de peru durante refrigeração (CHAKCHOUK-MTIBAA et al., 2017).

No estudo de Moracanin et al. (2013), foi adicionado na formulação de uma linguiça fermentada, a bacteriocina semi-purificada produzida pelo micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* IMAU:10231, o qual foi previamente isolado deste mesmo produto. Após 21 dias de armazenamento, a contagem total de micro-organismos e de *Listeria monocytogenes* diminuiu significativamente, demonstrando um interessante potencial de aplicação, a fim de aumentar a segurança microbiológica neste tipo de produto. Este resultado também é interessante do ponto de vista tecnológico, visto que a cepa produtora desta bacteriocina é heterofermentativa (produz gás carbônico, CO₂ durante a fermentação), o que torna seu uso inviável, pois pode causar o estufamento do

embutido, sendo assim necessário o uso somente da bacteriocina. Em contrapartida, no caso de BAL homofermentativa (produz majoritariamente ácido lático e não produz CO_2), torna-se interessante o uso do micro-organismo produtor de bacteriocina como cultura iniciadora com fim tecnológico e conservante. É o caso da BAL *Weissella paramesenteroides* DX, isolada de embutido cárneo fermentado, produtora da bacteriocina weissellina A. Este peptídeo só foi produzido na ausência ou em baixas concentrações de nitrito de sódio (NaNO_2) (conservante) sob condições aeróbias. Porém, em condições anaeróbias (microambiente encontrado em embutidos cárneos fermentados), nenhum efeito inibidor do NaNO_2 foi observado, possibilitando o uso deste micro-organismo na bioconservação deste tipo de produto (PAPAGIANNI e SERGELIDIS, 2013).

Como pode ser observado, a presença de alguns ingredientes no produto cárneo podem influenciar na efetiva ação das bacteriocinas no alimento. Não foi o que aconteceu no estudo realizado por Barbosa et al. (2015), onde a aplicação da bacteriocina semi-purificada de *L. curvatus* MBSa2 na produção de salame previamente contaminado com *L. monocytogenes* não sofreu interferência pelos ingredientes e aditivos, sendo capaz de reduzir a contaminação de 1,5 a 2 ciclos logarítmicos após 20 dias de produção, demonstrando ser interessante a aplicação destas bacteriocinas para aumentar a segurança microbiológica desse produto. Já no estudo de Rivas et al. (2014), os autores verificaram que quando o SLC foi aplicado em matriz cárnea contendo carne e gordura suína, a atividade antimicrobiana diminuiu 50% durante o armazenamento devido à absorção da bacteriocina por estes componentes. Para evitar esta perda, uma alternativa seria aplicar a bacteriocina como componente de embalagem ativa, reduzindo assim seu contato direto na matriz alimentícia.

Nesse sentido, vários estudos têm utilizado a incorporação de bacteriocinas em embalagens para controlar bactérias patogênicas através da liberação gradual do peptídeo no alimento, a fim de evitar a possível inativação da bacteriocina pela interação com os componentes alimentares (GUERRA et al., 2005). A utilização de filmes incorporados com substâncias antimicrobianas apresenta algumas vantagens sobre os métodos convencionais de adição direta de conservantes em alimentos como, a utilização de uma menor quantidade dessas substâncias e a liberação de maneira controlada, por atuarem, principalmente, na superfície do produto (KRISTO et al., 2008).

No caso da nisina, várias pesquisas desenvolveram soluções antimicrobianas para embalagens em carnes contendo essa bacteriocina a fim de retardar ou suprimir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes encontrados em alimentos (REALINI e MARCOS, 2014). Estudos sobre a utilização de nisina em filmes comestíveis e não comestíveis para a preservação da carne e produtos cárneos mostraram reduções na faixa de 3 ou mais ciclos logarítmicos (KERRY et al., 2006), enquanto estudos realizados em meios líquidos têm encontrado reduções entre 6 e 9 ciclos utilizando nisina e quitosana como revestimento (LEE et al., 2003). A aplicação de nisina no controle de *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, e BAL deteriorantes têm sido realizadas através da combinação com polietileno (PE), polietileno de baixa densidade (LDPE), celofane, quitosana e proteína isolada de soja/óleos essenciais em produtos como carne crua, fatias de presunto e carne moída (YE et al., 2008; EMIROGLU et al., 2010; KUORWEL et al., 2011; LA STORIA et al., 2013).

Além da nisina, pediocina incorporada em embalagens a base de celulose foram avaliadas na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em fatias de presunto, peru e carne bovina (MING et al., 1997; SANTIAGO-SILVA et al., 2009). Enquanto que Marcos et al. (2007), produziram filmes biodegradáveis utilizando alginato, zeína e polivinil álcool adicionados de enterocinas. Os autores testaram a ação antimicrobiana destes filmes durante a estocagem de presunto cozido fatiado e concluíram que as embalagens antimicrobianas podem melhorar a segurança deste alimento, retardando ou reduzindo a multiplicação de *L. monocytogenes*.

Outra alternativa para o uso de bacteriocinas em produtos cárneos é através da aplicação de cepas de BAL bacteriocinogênicas com atividade probiótica. O uso de micro-organismos com essa característica pode reduzir o número de patógenos ou alterar a composição da microbiota intestinal em modelos animais como ratos, frangos e suínos (YANG et al., 2014). Para o micro-organismo ser considerado probiótico, em geral, deve ter *status GRAS*, precisa sobreviver ao trânsito gastrointestinal (GI) em número suficiente para exercer seus efeitos benéficos ao colonizar o muco intestinal, tolerar a presença de pepsina e ao pH do estômago, resistir à protease do duodeno e aos sais biliares na parte superior do intestino. Além disso, deve ser capaz de aderir à mucosa intestinal, que é um pré-requisito para exercer seus efeitos benéficos, como a exclusão de bactérias

enteropatogênicas e a imunomodulação do hospedeiro (OSMANAGAOGLU et al., 2010).

Para melhorar a segurança microbiológica em um embutido cárneo fermentado, a cepa de *P. pentosaceus* (probiótico produtor de pediocina) foi utilizada como cultura iniciadora a fim de inibir o crescimento de *Salmonella Anatum*. Após 4-5 dias de fermentação, o patógeno foi totalmente inibido nas amostras contendo o micro-organismo selecionado, enquanto que levou mais de 6 dias para ocorrer o mesmo na amostra controle (cultura iniciadora não produtora de bacteriocina) (SWETWIWATHANA et al., 2007).

Com o interesse atual, pelos possíveis efeitos promotores de saúde causados por micro-organismos probióticos, a incorporação de BAL produtoras de bacteriocinas com potencial probiótico é uma excelente alternativa, pois além de garantir a segurança dos alimentos, também podem auxiliar no desenvolvimento de produtos cárneos funcionais com benefícios à saúde. Porém, são necessários dados precisos sobre as atividades de promoção da saúde de bactérias probióticas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além da comprovação da produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas) e sua segurança para o consumo humano (SWETWIWATHANA e VISESSANGUAN, 2015).

De maneira geral, considera-se que uma mistura contendo mais de uma bacteriocina causaria um efeito bactericida em um maior número de micro-organismos sensíveis, visto que as células resistentes a uma bacteriocina seriam inativadas pela outra. Com isso, o uso dessas misturas possibilitaria uma melhor padronização da atividade bacteriocinogênica, enquanto que a aplicação somente da cultura produtora do peptídeo, o efeito inibidor tende a ser menor. Extratos de bacteriocinas produzidas por BAL podem ser aplicadas como ingrediente alimentar para agirem como bioconservadores em produtos cárneos prontos para o consumo e outros produtos, podendo atuar contra micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (VIJAYAKUMAR e MURIANA, 2017).

Baseados nesse princípio, Dortu et al. (2008) avaliaram o efeito individual ou combinado das bacteriocinas sakacina G e sakacina P produzidas por *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 e *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28, respectivamente, no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em carne bovina e carne de frango *in natura*. Os respectivos micro-organismos foram isolados dessas mesmas matérias-primas, e foram aplicados nas superfícies das carnes previamente

contaminadas. Ficou constatado o efeito sinérgico dessas duas bactérias na inibição de *Listeria monocytogenes*, principalmente na carne bovina, demonstrando o potencial de aplicação combinado das referidas BAL ou suas bacteriocinas na bioconservação de certos produtos cárneos.

A partir do exposto, fica evidente a ampla possibilidade de aplicação das bacteriocinas, devendo ser vista não como uma única solução, mas sim como uma boa alternativa em termos de segurança de alimentos, especialmente quando combinadas com outras técnicas.

5 Considerações finais

Através dessa revisão percebe-se a diversidade de BAL com atividade bacteriocinogênica isoladas de carne e produtos cárneos, pertencentes principalmente aos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. As mesmas têm demonstrado capacidade de produção de bacteriocinas como nisinas, pediocinas, sakacinas, pentocinas e enterocinas, com ação contra micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes. A maioria das bacteriocinas obtidas foram estáveis a diferentes temperaturas, pH, sais, surfactantes e aditivos químicos.

Dessa forma, tornam-se uma alternativa futura na bioconservação de alimentos, visto que a aplicação de bacteriocinas em carnes e produtos cárneos pode ajudar a reduzir o uso de conservantes sintéticos e/ou a intensidade de tratamentos físicos, satisfazendo as demandas dos consumidores por alimentos frescos, saudáveis e também seguros.

Esta revisão forneceu importantes resultados sobre caracterização de bacteriocinas produzidas por BAL isoladas de carnes e produtos cárneos e sua aplicação em produtos cárneos, nos últimos 10 anos, e ressalta que são necessários testes relacionados à toxicidade desses compostos e seu efeito *in loco*, na matriz alimentar, além de que, é necessário analisar outros micro-organismos patogênicos e deteriorantes, para garantir a segurança e qualidade de produtos cárneos.

6 Referências

ACEDO, J. Z.; VAN BELKUM, M. J.; LOHANS, C. T.; McKAY, R. T.; MISKOLZIE, M.; VEDERAS, J. C. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 2910-2918, 2015.

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIRY, M. A.; AL KARAAWI, M. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017.

ALI, N. M.; ANDLEEB, S.; MAZHAR, B.; KHADIJA, I.; KALIM, B. Antibacterial Activity and Optimisation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef (Red Meat) Samples. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, Series B: biological sciences*, v. 59, n. 2, p. 85-98, 2016.

ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 100, p. 2939-2951, 2016.

AN, Y.; WANG, Y.; LIANG, X.; YI, H.; ZUO, Z.; XU, X.; ZHANG, D.; YU, C.; HAN, X. Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control*, v. 81, p. 211-217, 2017.

ANACARSO, I.; GIGLI, L.; BONDI, M.; NIEDERHAUSERN, S. de; STEFANI, S.; CONDO, C.; MESSI, P. Isolation of two lactobacilli, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for potential food-preservative use. *European Food Research and Technology*. 2017.

ANASTASIADOU, S., PAPAGIANNI, M., FILIOUSIS, G., AMBROSIADIS, I., KOIDIS, P., Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL

B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5384-5390, 2008.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, Wageningen, v. 3, p. 113-126, 2002.

ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 235–248, 2014.

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

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J.; HAERTLE, T.; FRANCO, B. D. G. M. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, v. 46, p. 254-262, 2015.

BARBOZA, Y. M.; FERRER, K.; SALAS, E. M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 65, p. 1780-1783, 2002.

BASTOS, M. C. F.; COUTINHO, B. G.; COELHO, M. L. V. Lysostaphin: A Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, v. 3 (4), p. 1139-1161, 2010.

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

BHARTI, V.; MEHTA, A.; SINGH, S.; JAIN, N.; AHIRWAL, L.; MEHTA, S. Bacteriocin: a novel approach for preservation of food. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 9, p. 20-29, 2015.

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

CASABURI, A.; MARTINO, V. D.I.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, L.; VILLANI, F. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*. 2016.

CASTELLANO, P.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. M. Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, p. 35-43, 2002.

CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. M. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters of Applied Microbiology*, v. 43, p. 194-199, 2006.

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

CASTELLANO, P.; IBARRECHE, M. P.; MASSANI, M. B.; FONTANA, C.; VIGNOLO, G. M. Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, v. 5, n. 3, p. 38-63, 2017.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, v. 87, p. 321–329, 2011.

CHAKCHOUK-MTIBAA, A.; SMAOUI, S.; KTARI, N.; SELLEM, I.; NAJAH, S.; KARRAY-REBAI, I.; MELLOULI, L. Biopreservative Efficacy of Bacteriocin BacFL31 in Raw Ground Turkey Meat in terms of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Qualities. *Biocontrol Science*, v. 22, n. 2, p. 67-77, 2017.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 2, p. 82, 2003.

CHO, G.-S.; HANAK, A.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Investigation into the potential of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 for biopreservation of raw turkey meat. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 2, p. 241-249, 2010.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNANDEZ, P. E. Review: Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, v. 7, p. 281-305, 2001.

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.

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

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, London, n. 11, p. 95-105, 2013.

DAL BELLO, B., RANTSIOU, K., BELLIO, A., ZEPPA, G., AMBROSOLI, R, CIVERA, T., COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1151-1159, 2010.

DE MARTINIS, E. C. P., ALVES, V. F., FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf life extension. *International Dairy Journal*, Barking, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.*, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990.

DÍEZ, L.; ROJO-BEZARES, B.; ZARAZAGA, M.; RODRÍGUEZ, J. M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiology*, 31, 167-172, 2012.

DORTU, C.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P.; THONART, P. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-b28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-b1365 on raw beef and poultry meat. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, p. 581-586, 2008.

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

DUARTE, M. T.; CARRIJO, K. F. Quantificação do teor de nitrito de sódio residual em linguiças cozidas tipo calabresa comercializadas no sul do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10(19), p. 1606-1615, 2014.

EIJSSINK, V. G. H.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins of lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, 2002.

EMIROGLU, Z. K.; YEMIS, G. P.; COSKUN, B. K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, v. 86, p. 283-288, 2010.

ENNAHAR S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 24, 2000.

ESKANDARI, M. H.; HOSSEINPOUR, S.; MESBAHI, G.; SHEKARFOROUSH, S. New composite nitrite-free and low-nitrite meat-curing systems using natural colorants. *Food Science and Nutrition*, v. 1, n. 5, p. 392-405, 2013.

FONTANA, C.; COCCONCELLI, P. S.; VIGNOLO, G.; SAAVEDRA, L. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control*, v. 47, p. 53-59, 2015.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H.; GÁLVEZ, A. Safety of lactic acid bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. p. 341-359. 2010.

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

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN OMAR, N. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 125-152, 2008.

GAUTAM, S.; SHARMA, N. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology*, India. v. 49. 2009.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 668-675, 2008.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using nisaplin as biopreservative agent. *Letters of Applied Microbiology*, v. 40, p. 106-110, 2005.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 4, p. 1-12, 2013.

HAMMOU, F. B.; SKALI, S. N.; IDAOMAR, M.; ABRINI, J. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (8), p. 1190-1195, 2010.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Developments in nisin research. *Food Res. Int.*, v. 25, n. 1, p. 57-66, 1992.

HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 192-199, 2011.

HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan M (eds), New York: Springer Inc. *Evolution and ecology of bacteriocins*, p. 45-92, 2007.

HU, Y.; LIU, X.; SHAN, C.; XIA, X.; WANG, Y.; DONG, M.; ZHOU, J. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM₄ from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, v. 77, p. 290-297, 2017.

ISHIBASHI, N.; HIMENO, K.; FUJITA, K.; MASUDA, Y.; PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; WILAI PUN, P.; LEELAWATCHARAMAS, V.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Purification and Characterization of Multiple Bacteriocins and an Inducing Peptide Produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai Fermented Fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 76, n. 5, p. 947-953, 2012.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C. *Principles of Meat Science*. 3 ed. Published by Kendall/Hunt Publishing Co., 1989, 351 p.

JUODEIKIENE, G.; BARTKIENE, E.; VISKELIS, P.; URBONAVICIENE, D.; EIDUKONYTE, D.; BOBINAS, C. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In: Petre M, editor. *Advances in applied biotechnology*. Intech, Croatia. pp. 63-100, 2012.

KALSCHNE, D. L.; GEITENES, S.; VEIT, M. R.; SARMENTO, C. M. P.; COLLA, E. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. *Meat Science*, v. 98, p. 744-752, 2014.

KERRY, J.; O'GRADY, M.; HOGAN, S. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, v. 74, p. 113-130, 2006.

KINGCHA, Y.; TOSUKHOWONG, A.; ZENDO, T.; ROYTRAKUL, S.; LUXANANIL, P.; CHAREONPORNSOOK, K.; VALYASEVI, R.; SONOMOTO, K.; VISESSANGUAN, W. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*, v. 25, p. 190-196, 2012.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the higienic quality of products. *FEMS Microbiological Review*, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, 1993.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 373-386, 2008.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S. W. Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 3, R90–R102, 2011.

LA STORIA, A.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Coating-activation and antimicrobial efficacy of different polyethylene films with a nisin-based solution. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 2770-2779, 2013.

LEE, C. H.; AN, D. S.; PARK, H. J.; LEE, D. S. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Package Technology Science*, v. 16, p. 99-106, 2003.

LEE, H.; KIM, H. Y. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21 (3), p. 229-235, 2011.

LV, X.; MA, H.; SUN, M.; LIN, Y.; BAI, F.; LI, J.; ZHANG, B. A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, v. 89, p. 22-31, 2018.

MARAGKOUidakis, P. A.; MOUNTZOURIS, K. C.; PSYRRAS, D.; CREMONESE, S.; FISCHER, J.; CANTOR, M. D.; TSAKALIDOU, E. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 130, p. 219-226, 2009.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, p. 152-158, 2007.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at smallscale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, v. 74, n. 5, p. 812-815, 2011.

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

MING, X.; WEBER, G. H.; AYRES, J. W.; SANDINE, W. E. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 413-415, 1997.

MORACANIN, S. V.; TURUBATOVIC, L.; SKRINJAR, M.; OBRADOVIC, D. Antilisterial Activity of Bacteriocin Isolated from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* IMAU:10231 in the Production of Sremska Sausages: Lactic Acid Bacteria Isolation, Bacteriocin Identification and Meat Application Experiments. *Food Technology and Biotechnology*. v. 51, n. 2, p. 247-256, 2013.

MÜLLER, D. M.; CARRASCO, M. S.; TONARELLI, G. G.; SIMONETTA, A. C. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2031-2040, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocins in food: a review. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*, v. 11, p. 120-127, 2008.

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

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In G. M. Dunny, & S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signalling in bacteria* (p. 175-192). American Society for Microbiology. 1999.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. D. C.; SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, Á. J.; DE LA TORRE, A. H. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, v. 21, p. 679-685, 2010.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

OLIVEIRA, C. P.; JÚNIOR, J. P. S.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

OSMANAGAOGLU, O.; KIRAN, F.; ATAOGU, H. Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 2, p. 162-174, 2010.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*. 8 (3). 2009.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Effects of the presence of the curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, on bacteriocin production by *Weissella paramesenteroides* DX grown in meat simulation medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 53, p. 1-5, 2013.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (lab): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13 (Suppl 1):S3, 2014.

PRUDÊNCIO, C. V.; DOS SANTOS, M. T.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in gram-negative bacteria: Relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, p. 5408-5417, 2015.

REALINI, C.E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, v. 98, p. 404-419, 2014.

RILEY, M. A. Bacteriocin mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. (Eds.). *Prokaryotic antimicrobial peptides*. London: Springer, p. 13-26, 2011.

RIVAS, F. P.; CASTRO, M. P.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.; CAMPOS, C. A. Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: Functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. *Meat Science*, v. 97, p. 475-479, 2014.

ROGERS, L. A. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, v. 16, n. 2, p. 321-325, 1928.

ROSS, R. P.; GALVIN M.; MCAULIFFE, O.; MORGAN, S. M.; RYAN, M. P.; TWOMEY D. P.; MEANEY, W. J.; HILL, C. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Leeuwenhoek*, Dordrecht. v. 76. 1999.

SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 227-235, 2008.

SANT'ANNA, V.; QUADROS, D. A.; MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1163-1167, 2013.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A.; BARBOSA, K. B.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial

efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, v. 20, p. 85-89, 2009.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 678-683, 2006.

SIVAKUMAR, N.; RAJAMANI; SAIF, A-B. Partial Characterization of Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 5, p. 1177-1184, 2010.

SMAOUI, S.; ELLEUCH, L.; BEN SALAH, R.; NAJAH, S.; CHAKCHOUK-MTIBAA, A.; SELLEM, I.; BESBES, S.; MELLOULI, L. Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast. *Food Additives & Contaminants*, v. 31, n. 2, p. 218-225, 2014.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 329-343, 2008.

SWETWIWATHANA, A.; LOTONG, N.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Maturation of Nham — A Thai fermented meat product: Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation. *Fleischwirtschaft International*, v. 22, n. 3, p. 46-49, 2007.

SWETWIWATHANA, A.; VISESSANGUAN, W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, v. 109, p. 101-105, 2015.

SZABÓOVÁ, R.; LAUKOVÁ, A.; SIMONOVÁ, M. P.; STROMPFOVÁ, V.; CHRASTINOVÁ, L. Bacteriocin-Producing Enterococci from Rabbit Meat. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 211-218, 2012.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O'DONNELL C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, 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.; VAZ-VELHO, M.; FRANCO, B. D. G. M.; HOLZAPFEL, W. H. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from *salpicão*, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 111-121, 2013.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M. L. Quorum sensing: Fact, fiction and everything in between. *Advances in Applied Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 191 –234, 2007.

VAN HEEL, A. J., MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. v. 7, p. 675–680, 2011.

VIJAYAKUMAR, P. P.; MURIANA, P. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats using bacteriocin mixtures based on mode-of-action. *Foods*, v. 6:22, 2017.

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

WORAPRAYOTE, W.; PUMPUANG, L.; TOSUKHOWONG, A.; ROYTRAKUL, S.; PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne

pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control*, v. 55, p. 176-184, 2015.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. v. 120, p. 118-132, 2016.

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

YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, v. 25, p. 260-268, 2008.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *Asia-Pacific Chemical Biological and Environmental Engineering Society, Hong Kong*, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZHANG, J.; LIU, G.; LI, P.; QU, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control*, v. 21, p. 198-202, 2010.

ZHANG, H.; LIU, L.; HAO, Y.; ZHONG, S.; LIU, H.; HAN, T.; XIE, Y. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiology and Immunology*, v. 57, p. 746-755, 2013.

Capítulo 2 – Manuscrito 1

**Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecium* EO1
procedente de carne ovina e ação de substâncias antimicrobianas
produzidas pelo isolado no controle de *Listeria monocytogenes* em
linguiça ovina frescal**

Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecium* EO1 procedente de carne ovina e ação de substâncias antimicrobianas produzidas pelo isolado no controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça ovina frescal

Roger Junges da Costa^{1,2}; Andresa Pereira da Silva²; Juliana de Lima Marques¹; Renata Nobre da Fonseca³; Elen Silveira Nalério⁴; Silvia de Oliveira Hübner³; Wladimir Padilha da Silva^{1,5}; Eduarda Hallal Duval¹; Ângela Maria Fiorentini^{1*}

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, PO Box 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

² Instituto Federal Sul-rio-grandense campus Bagé, 96418-400, Bagé, RS, Brasil

³ Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

⁴ Embrapa Pecuária Sul, 96401-970, Bagé, RS, Brasil

⁵ Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

*Corresponding author: Universidade Federal de Pelotas – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Pelotas/RS, Brasil. Tel.: +55 53 3275 7284. E-mail address: angefiore@gmail.com

Resumo

A bioconservação de alimentos é utilizada visando estender a vida útil dos alimentos e aumentar sua segurança, por meio da aplicação de uma microbiota protetora, que na maioria das vezes pertence ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), bem como utilizar as propriedades antibacterianas de seus metabólitos, como as bacteriocinas. Na elaboração de derivados cárneos, uma boa opção é o uso de carne obtida de animais mais velhos, dentre as quais se destaca a carne ovina. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar BAL oriundas de carne ovina e avaliar a ação de substâncias antimicrobianas produzidas por estes isolados, no controle de *Listeria monocytogenes*, em linguiça ovina frescal. Foram isoladas 84 BAL, das quais 6 isolados apresentaram características fenotípicas quanto aos aspectos de segurança, como ausência das enzimas gelatinase, DNase, atividade hemolítica e sensibilidade à alguns antibióticos. A atividade bacteriocinogênica do sobrenadante livre de células (SLC) dos isolados apresentou estabilidade em diferentes temperaturas, valores de pH, NaCl e sais de cura, bem como potencial

antimicrobiano *in vitro* contra *L. monocytogenes* Scott A. Os isolados foram identificados como *Streptococcus gallolyticus* (3) e *Enterococcus faecium* (3), sendo que os SLC obtidos de *E. faecium* não apresentaram citotoxicidade em diluições superiores a 1:40 e a quantificação da atividade antimicrobiana foi de 400 UA.mL⁻¹. Foi verificado que *E. faecium* EO1 apresentou o gene que codifica para a produção de enterocina A, bem como produz substância antimicrobiana a partir de 6 h de cultivo. Com base nisso, foi selecionado para aplicação na matriz alimentar. A aplicação do SLC de *E. faecium* EO1 em linguiça ovina fresca, nas concentrações de 5 e 10%, foram significativamente eficazes na inibição de *L. monocytogenes* durante 21 dias de armazenamento refrigerado. Foi possível isolar BAL com potencial bacteriocinogênico proveniente de carne ovina *in natura* e a linguiça ovina fresca pode ser considerada um bom veículo para incorporação do SLC de *E. faecium* EO1 com atividade contra *L. monocytogenes* Scott A.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, bioconservação, derivado cárneo, enterocina, metabólito antimicrobiano.

1 Introdução

A bioconservação utilizando BAL bacteriocinogênicas e/ou suas bacteriocinas, têm se destacado como uma alternativa para prolongar a vida útil e melhorar a segurança de produtos cárneos (CASTELLANO et al., 2008; VIGNOLO et al., 2012). Em consonância, os consumidores têm buscado cada vez mais alimentos naturais, atraídos pelos benefícios dos alimentos processados com pouca ou nenhuma adição de conservante sintético (FRANZ et al., 2010).

Neste aspecto, aumenta o interesse por BAL produtoras de bacteriocinas, pois são importantes do ponto de vista biotecnológico e científico, devido ao potencial antimicrobiano que estas cepas podem proporcionar (VAN HEEL et al., 2011). Dentre as BAL isoladas de carnes e de produtos cárneos, *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* têm sido descritas como as principais produtoras de substâncias antimicrobianas, sendo responsáveis pela produção de sakacinas e curvacinas (BARBOSA et al., 2015; CASABURI et al., 2016; FONTANA et al., 2015; TODOROV et al., 2013). No entanto, pesquisas utilizando *E. faecium* comprovaram

a produção de enterocinas por isolados obtidos de pescados (VALENZUELA et al., 2010); carne de coelho (SZABÓOVA et al., 2012); leites, queijos, carnes e vegetais (GOMES et al., 2008); produtos lácteos (MIRHOSSEINI et al., 2010); e com potencial para aplicação em produtos como presunto cozido (ANANOU et al., 2010), queijos (ASPRI et al., 2017), entre outros.

Como o consumo mundial de cordeiro e carneiro vem aumentando nos últimos anos (BEHRENDT e WEEKS, 2017), estudos realizados no Brasil e no exterior elaboraram alternativas visando melhorar o aproveitamento de cortes de carne ovina oriundos de animais mais velhos, as quais possuem um baixo valor agregado devido a apresentarem textura mais firme e sabor e odor mais intensos (OSÓRIO et al., 2009; NASSU et al., 2002). Entre estas possibilidades, está a produção de derivados cárneos fermentados (CRUXEN et al., 2018), mortadela (ABDULLAH, 2004), copa (DE ANDRADE et al., 2018), dentre outros produtos.

Na fabricação de produtos cárneos frescos, como linguiça ovina frescal, o uso de matéria-prima contaminada, manipulação não higiênica durante o processamento e armazenamento inadequado apresentam perigos à saúde do consumidor, visto que seu processamento não inclui nenhum tipo de tratamento térmico e o produto pode conter micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (CABRAL et al., 2014). Entre os patógenos que podem ser encontrados em carnes e produtos cárneos, destaca-se a *Listeria monocytogenes*, a qual pode sobreviver em condições ambientais adversas como temperatura de refrigeração, baixo pH ou altas concentrações de sal (KUMAR e SRIVASTAVA, 2010). Nesse sentido, a aplicação de metabólitos, com potencial antimicrobiano, poderá reforçar a segurança de produtos susceptíveis a contaminação por *L. monocytogenes*.

Portanto, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar BAL obtidas de carne ovina, assim como avaliar a ação de substâncias antimicrobianas no controle de *L. monocytogenes* em linguiça ovina frescal.

2 Material e Métodos

2.1 Amostras

Carcaças ovinas foram amostradas através da técnica de esfregaço em 4 pontos da superfície, com o auxílio de swabs. As coletas ocorreram em dois

frigoríficos, localizados no estado do Rio Grande do Sul/Brasil, totalizando 48 amostras.

2.2 Isolamento de BAL

As amostras de swab foram homogeneizadas separadamente, e submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (v/v) (Himedia[®]). Para cada diluição, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas na superfície de placas de petri contendo ágar De Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Acumedia[®]), as quais foram incubadas a 37 °C por 72 h, em anaerobiose.

2.3 Caracterização fenotípica dos isolados de BAL

Os isolados foram submetidos aos testes de coloração de Gram e reação da catalase, sendo selecionados aqueles que apresentavam características de bactéria Gram-positiva e catalase negativa.

O perfil fermentativo dos isolados foi avaliado a partir do cultivo dos isolados em tubos contendo caldo MRS suplementado com 3% de glicose (Alphatec[®]), em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos e incubados a 37 °C durante 48 h (HOLT, 1994). Nos tubos em que se observou turvação do meio e produção de gás, os isolados foram classificados como heterofermentativos, enquanto aqueles que apresentaram somente turvação do meio foram classificados como homofermentativos.

2.4 Identificação de isolados de BAL produtores de substâncias antimicrobianas

Os isolados de BAL foram avaliados quanto a sua atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes* Scott A, através do teste *spot-on-the-lawn*, de acordo com Fleming et al. (1975), com adaptações. Como controle positivo, foi utilizado *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13.

Os isolados, primeiramente, foram reativados em caldo MRS seguido por incubação a 37 °C por 24 horas. Em seguida, os isolados e a cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13 foram incubados em caldo MRS (1% v/v) a 37 °C por 24 horas. Após uma alíquota de 5 µL dos isolados, na forma de gotas, foram inoculados

na superfície de placas de petri contendo ágar MRS, as quais foram incubadas a 37 °C por 24 h, sob anaerobiose. Posteriormente, adicionou-se às placas uma sobrecamada de ágar BHI semi-sólido, com aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ (padronizado pela leitura de D.O.) do micro-organismo indicador e as mesmas foram incubadas novamente a 37 °C por 24 h, sob aerobiose. A presença de zonas de inibição ao redor das “gotas” foi considerada como indicadora de atividade antagonista em relação ao micro-organismo indicador. A medida do tamanho do halo (mm) foi realizada utilizando paquímetro digital (Kingtools®), considerando-se como medida de inibição do crescimento, a distância entre o limite da zona de crescimento do isolado e o limite do halo de inibição.

2.5 Atividade antimicrobiana do Sobrenadante Livre de Células (SLC)

Os isolados que apresentaram atividade antagonista no teste anterior, foram submetidos ao método de difusão em ágar, descrito por Biscola et al. (2013), para verificar a atividade antimicrobiana dos SLC contra *L. monocytogenes* Scott A. Primeiramente, foi obtido o SLC dos isolados de BAL a partir dos cultivos em caldo MRS a 37 °C, por 24 horas. Após, os cultivos foram centrifugados a 7.000 rpm, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante de cada amostra foi neutralizado (pH 7,0), utilizando-se solução de NaOH 1 N (Alphatec®), para exclusão da possibilidade da atividade inibitória ter sido ocasionada por meio da produção de ácidos orgânicos e consequente redução do pH. Em seguida, foi aquecido a 80 °C por 10 minutos para inativar proteases, H₂O₂ e células residuais que poderiam estar presentes no meio (TODOROV e DICKS, 2004).

Alíquotas de 10 µL de cada SLC foram adicionadas na superfície de placas de Petri contendo ágar BHI com, aproximadamente, 10^5 UFC.mL⁻¹ do micro-organismo indicador (*L. monocytogenes* Scott A). Após a completa adsorção da alíquota pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A presença de halo de inibição no meio foi considerada indicadora de atividade bacteriocinogênica do isolado, e a medida do tamanho do halo (mm) foi realizada utilizando paquímetro digital (Kingtools®), considerando-se o diâmetro total do halo de inibição (BISCOLA et al., 2013).

2.5.1 Natureza proteica de substâncias antimicrobianas do SLC

O SLC foi submetido ao teste de sensibilidade enzimática para determinação da natureza proteica da substância antimicrobiana, conforme Van Reenen et al. (1998). Alíquotas de 1 mL de cada SLC foi homogeneizado com as enzimas proteinase k, pepsina, α -quimiotripsina (1 mg.mL^{-1} , Sigma[®]), as quais foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, seguido de aquecimento a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, para inativação enzimática.

Posteriormente, alíquotas de $10 \text{ }\mu\text{L}$ foram adicionadas nas placas contendo ágar BHI com, aproximadamente, 10^5 UFC.mL^{-1} de *L. monocytogenes* Scott A. As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. A ausência de zona de inibição indicará que a substância inibidora possui natureza proteica (sugerindo substância tipo bacteriocina) (BISCOLA et al., 2013).

2.6 Aspectos de segurança dos isolados de BAL

2.6.1 Atividade da enzima DNase

A capacidade de produzir a enzima DNase foi avaliada após a inoculação de uma alçada dos isolados, previamente ativados em caldo MRS por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, em ágar DNase (Acumedia[®]). As placas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas e para leitura dos resultados utilizou-se ácido clorídrico na concentração de 1 N. A formação de zonas transparentes ao redor das colônias foi considerada como resultado positivo. Como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (KATEETE et al., 2010).

2.6.2 Atividade da enzima gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi determinada em meio de cultura preparado com 1% de extrato de levedura (Himedia[®]), 1,5% de triptona (Oxoid[®]) e 12% de gelatina (Sigma[®]), como descrito por Pereira et al. (2009). Os isolados ativados em caldo MRS por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ foram inoculados através da técnica em picada, para o meio contendo gelatina. Os tubos foram incubados a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por sete dias e ao final do sétimo dia os mesmos foram mantidos sob refrigeração ($8 \text{ }^\circ\text{C}$) por 30 minutos. A transformação do meio do estado sólido para líquido significa um

resultado positivo para atividade da enzima. Como controle positivo foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923.

2.6.3 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos isolados foi avaliada de acordo com Eaton e Gasson (2001), utilizando-se o cultivo dos isolados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, com posterior inoculação em placas contendo ágar Trypticase de Soja (TSA) (Kasvi®) suplementado, previamente, com 7% de sangue equino desfibrinado. Após a incubação por 24 horas a 37 °C, a reação hemolítica foi avaliada e classificada como α -hemólise (lise parcial dos glóbulos vermelhos com zonas amarelo-esverdeadas ao redor das colônias) e β -hemólise (lise total com zonas transparentes ao redor das colônias). Como controle positivo foi utilizado *L. monocytogenes* ATCC 7644.

2.6.4 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico

O teste de sensibilidade aos antibióticos foi realizado de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) usando discos (Laborclin®) com os seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfonamidas (300 µg). A concentração dos isolados foi padronizada para aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ usando o padrão *McFarland* 0,5. Os isolados foram inoculados em placas com ágar Müller Hinton (Kasvi®) e, em seguida, discos contendo antimicrobianos foram aplicados. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos e expressos em milímetros (mm). A tabela CLSI (2015) para micro-organismos Gram-positivos foi usada para classificar os isolados de BAL como resistentes (R), intermediários (I) e suscetíveis (S).

2.7 Identificação genotípica dos isolados de BAL

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Coton & Coton (2005). A identificação genotípica foi realizada a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA. Para o preparo da amostra foram utilizados os primers F 5' GGACGGGTGAGTAACACGTGG 3' e R 5'

TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT 3', como descrito por Baron et al. (2004). O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil). Para o estudo do fragmento sequenciado, foi utilizado o programa *ContigExpress* (VectorNTI, Invitrogen) e, após a ferramenta BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foi usada para comparar a similaridade do resultado com outras sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.8 Avaliação *in vitro* da estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de NaCl, sais de cura, diferentes valores de pH e temperatura

A ação do NaCl e dos sais de cura na estabilidade das substâncias antimicrobianas foi analisada pela adição de 2, 5 e 10 % (m/v) de NaCl, e 0,1, 0,2 e 0,3 % (m/v) de sais de cura (preparado com 85 % NaCl, 10 % nitrito de sódio e 5 % nitrato de sódio) em alíquotas de 1 mL de SLC. Os mesmos foram incubados a 37 °C por 1 hora (TODOROV et al., 2010).

O efeito do pH foi avaliado ajustando-se alíquotas de 1 mL do SLC para pH 2, 4, 6, 8 e 10, com adição de solução de HCl 1 ou 5 M ou NaOH 1 ou 5 M, seguido de incubação a 37 °C por 1 hora (TODOROV et al., 2010).

A estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes temperaturas foi avaliada incubando-se alíquotas de 1 mL do SLC a 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C em banho-maria por 1 hora e 121 °C por 15 minutos (TODOROV et al., 2010).

Decorridos os períodos de incubação de cada uma das análises, o pH das amostras foi neutralizado pela adição de solução de HCl 1,0 ou 5,0 M ou NaOH 1,0 ou 5,0 M e a atividade antimicrobiana dos SLC avaliada, conforme descrito na seção 2.5. Cada um dos ensaios foi realizado em duplicata e, como controle, foi utilizado SLC sem nenhum tratamento.

2.9 Quantificação da atividade antimicrobiana do SLC

A quantificação da atividade antimicrobiana do SLC foi avaliada pelo método de difusão em ágar, conforme descrito por Biscola et al. (2013), onde foram adicionados 10 µL do SLC bruto e diluído, sobre ágar BHI previamente inoculado com *L. monocytogenes* Scott A, na concentração de 10⁵ UFC.mL⁻¹. Após, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e então analisadas quanto à formação de

halos de inibição. A atividade antimicrobiana foi expressa em unidades arbitrárias por mL (UA.mL⁻¹), calculada levando-se em consideração a maior diluição capaz de produzir halos de inibição ≥ 2 mm de diâmetro.

2.10 Citotoxicidade das substâncias antimicrobianas no SLC

Para a avaliação da toxicidade foi utilizado o método colorimétrico com metil tetrazólio (MTT) descrito por Mosmann (1983), utilizando células renais bovinas linhagem MDBK (Madin-Darby bovine kidney, NBL-1- ATCC[®] CCL22[™], USA), através da atividade enzimática mitocondrial das células vivas, pela leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

O percentual da viabilidade celular foi calculado através da relação entre a absorbância dos tratamentos (AT) com a respectiva diluição e a absorbância das células controle (AC): $(AT/AC \times 100)$ (VAUCHER et al., 2010). As concentrações não tóxicas consideradas foram aquelas em que a viabilidade celular foi superior a 90%, quando comparada ao controle.

2.11 Detecção de genes que codificam para a produção de bacteriocinas

Os isolados identificados como *E. faecium* foram submetidos a PCR (Polymerase Chain Reaction) (Özdemir et al., 2011) para detecção dos genes que codificam para a produção das enterocinas A, B, P e L50A/B, conforme condições descritas na Tabela 1.

Cada reação foi realizada com volume total de 25 μ L onde foram colocados 12,5 μ L de 2X Go Taq Green Master Mix, 10 pmol de cada primer, 1 μ L de DNA e água ultrapura até completar o volume final. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5% (Tris borate – EDTA[®]) e visualizados sob luz UV em transiluminador (L-Pix Image HE – Locus, L-Pix Touch). Os genes que apresentaram amplificação por PCR foram submetidos ao sequenciamento para confirmação, conforme descrito na seção 2.7.

Tabela 1: Oligonucleotídeos e condições de PCR utilizadas para identificação de genes que codificam para a produção das enterocinas A, B, P e L50A/B nos isolados de *E. faecium* de carne ovina

Bacteriocinas	Gene	Oligonucleotídeos	Temperatura anelamento	Tamanho fragmento
Enterocina A	<i>entA</i>	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	55 °C	138 pb
Enterocina B	<i>entB</i>	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	55 °C	201 pb
Enterocina P	<i>entP</i>	GCTACGCGTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTTTAGC	58 °C	87 pb
Enterocina L50A/B	<i>entL50A/B</i>	ATGGGAGCAATCGCAAATTA TAGCCATTTTCAATTTGATC	60 °C	274 pb

2.12 Cinética de crescimento e produção de substâncias antimicrobianas

A cinética de crescimento do isolado de *E. faecium* e a respectiva produção de substâncias antimicrobianas foi avaliada por um cultivo do isolado em 100 mL de caldo MRS, o qual foi incubado a 37 °C, sob agitação (100 rpm, MARQ LABOR[®]). Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 e 48 h, para determinação do pH, contagem de células viáveis e quantificação da atividade antimicrobiana (TODOROV et al., 2010).

2.13 Aplicação e avaliação do SLC de *E. faecium* em linguiça ovina frescal contaminada com *L. monocytogenes*

Para elaboração das linguiças foi usada a seguinte formulação base: cortes de carne ovina de animais mais velhos (80%), toucinho suíno (20%), água (3%), NaCl (2%) (Diana[®]), pimenta do reino em pó (0,2%) (Bom gosto[®]), alho em pó (0,2%) (Rey temper[®]) e sal de cura (0,2%) (Duas Rodas[®]).

A carne ovina e toucinho foram moídos, separadamente, em disco de 8 mm, e misturados em um recipiente com os demais ingredientes. Baseado em testes preliminares, foram preparados quatro tratamentos: controle (10% de água destilada esterilizada); T1 (0,1% de *L. monocytogenes* Scott A (10^7 UFC.mL⁻¹) + 10% de água destilada esterilizada); T2 (0,1% de *L. monocytogenes* Scott A (10^7 UFC.mL⁻¹) + 5% de SLC + 5% de água destilada esterilizada) e T3 (0,1% de *L. monocytogenes* Scott A (10^7 UFC.mL⁻¹) + 10% de SLC). Os percentuais estão relacionados à massa total de linguiça em cada tratamento, e o SLC foi obtido nas condições onde apresentou

maior atividade antimicrobiana, no teste anterior. Em seguida, a massa cárnea foi embutida em tripa natural bovina, e o produto foi armazenado sob refrigeração (4 °C) e acondicionado em embalagens plásticas individuais, por 30 dias.

Análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas nos tempos zero, 7, 14, 21 e 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C).

Para a contagem de *L. monocytogenes* foram realizadas diluições decimais seriadas a partir de 10 g de amostra, e as mesmas foram inoculadas em Agar Oxford (Oxoid). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e os resultados expressos em log UFC.g⁻¹ (SANT'ANNA et al., 2013)

Para verificação do pH realizou-se a medição em pHmetro digital (Ion pHB 500), de acordo com AOAC (2005). A atividade de água foi medida em Analisador de Atividade de Água Modelo Labtouch (Novasina).

2.14 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em duplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa STATISTICA 7.0.

3 Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e caracterização de BAL

No presente estudo, foram obtidos 186 isolados de carcaças ovinas *in natura*, dos quais 84 com características de BAL (morfologia de cocos, coloração Gram-positiva e catalase negativa).

Segundo Liu et al. (2014) a presença de BAL está associada a matérias-primas ricas em nutrientes, como vegetais, frutas, produtos lácteos, carne e peixe cru ou fermentados, cereais, legumes em conserva, batatas, silagem, bebidas fermentadas e sucos.

No estudo de Castro et al. (2011) ao analisarem 14 tipos diferentes de embutidos fermentados, 141 isolados foram obtidos com características referentes às BAL, com morfologia de bacilos.

Quanto ao perfil fermentativo, dos 84 isolados, 29 (34,5%) foram classificados como homofermentativos, ou seja, apenas turvaram o meio, enquanto 55 isolados (65,5%), por turvarem o meio e produzirem dióxido de carbono, foram caracterizados como heterofermentativos (PARADA et al., 2007).

Em função das diferenças no perfil fermentativo, as BAL podem ser utilizadas para melhorar a textura e as propriedades sensoriais dos alimentos, especialmente na fabricação de produtos fermentados (FONDÉN et al., 2000; D'SOUZA et al., 2002). Em virtude de uma futura utilização desses isolados em embutidos cárneos, os isolados adequados para aplicação são os que possuem características homofermentativas, para que não ocorra o estufamento do produto embutido. No entanto, para os demais testes todos os 84 isolados foram avaliados, independente do perfil fermentativo.

3.2 Atividade antagonista dos isolados de BAL contra *L. monocytogenes* Scott A

Neste estudo, 36 (43%) isolados homofermentativos foram capazes de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* Scott A, apresentando zonas de inibição que variaram entre 1,2 a 6,2 mm. Este resultado corrobora com o encontrado por Fontana et al. (2015), os quais analisaram 115 cepas de BAL isoladas de carne crua e fermentada, e as mesmas apresentaram atividade anti-listerial, com a maioria das zonas de inibição variando de 2 a 4 mm de diâmetro.

De acordo com Lewus e Montville (1991) e Moraes et al. (2010), o meio MRS favorece a produção de ácidos orgânicos. Como apresenta alta concentração de glicose e não possui substâncias inibidoras, não há como se definir qual a natureza da atividade antagonista, tendo em vista que pode ter ocorrido pela produção de ácidos orgânicos, de peróxido de hidrogênio e/ou de bacteriocinas. No entanto, a quantidade de ácido lático produzida é dependente da cepa (SORIA e AUDISIO, 2014), o que justificaria a diferença de tamanho das zonas de inibição, apresentadas pelos isolados.

3.3 Atividade antimicrobiana do SLC

Dos 36 isolados que foram capazes de inibir o micro-organismo indicador pelo teste *spot-on-the-lawn*, apenas 8 isolados (22,2%) apresentaram atividade

antimicrobiana a partir do SLC contra *L. monocytogenes* Scott A, formando zonas de inibição que variaram de 8,76 a 11,67 mm, conforme apresentado na Tabela 2. Esta atividade pode ser devido à produção de peptídeos antimicrobianos, visto que a atividade foi mantida mesmo após a neutralização do pH e tratamento térmico do SLC.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana dos Sobrenadantes Livres de Céulas contra *L. monocytogenes* Scott A.

Amostras	Zona de inibição (mm)
EO1	11,67±1,07 ^a
EO2	11,67±0,50 ^a
SO8	8,76±0,18 ^c
SO9	10,91±0,85 ^{a,b}
SO10	10,21±0,33 ^{a,b,c}
EO18	10,06±0,21 ^{a,b,c}
IO45	9,57±0,34 ^{b,c}
IO71	9,00±0,33 ^c
* <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13	9,67±0,91 ^c

As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, não diferem entre si a $P < 0,05$ de significância pelo Teste de Tukey. *Controle positivo.

Esse resultado foi superior ao encontrado por Castro et al. (2011), no qual somente 3 isolados apresentaram atividade do SLC contra *Listeria innocua* ATCC 33090, de um total de 21 isolados testados.

Em estudo realizado por Biscola et al.(2013), de 100 isolados com atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, somente 5 isolados apresentaram ação bacteriocinogênica do SLC.

Diversos estudos têm sido realizados a fim de identificar BAL com atividade antimicrobiana oriundas de diferentes fontes, no entanto, tem-se observado que dentre estas, o percentual com atividade bacteriocinogênica, é consideravelmente pequeno (MURUA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014; CASABURI et al., 2016), o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho, pois dentre 84 isolados, somente 8 apresentaram atividade, supostamente, bacteriocinogênica.

3.3.1 Natureza proteica de substâncias antimicrobianas do SLC

Dentre os 8 isolados que apresentaram atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes* Scott A, 7 isolados (EO1, EO2, SO8, SO9, SO10, EO18 e IO45) confirmaram que a substância antagonista é de natureza protéica, pois apresentaram sensibilidade para as três enzimas proteolíticas testadas.

No estudo de Castro et al. (2011), dos 3 isolados testados, somente um apresentou sensibilidade às enzimas tripsina e proteinase k, considerando-se que esse isolado era produtor de uma substância tipo bacteriocina. Já em estudo desenvolvido por Biscola et al. (2013), dos 5 isolados que apresentaram atividade antimicrobiana no SLC, 2 apresentaram sensibilidade as proteases, revelando a natureza proteica da substância inibidora, sugerindo a produção de substância tipo bacteriocina.

A sensibilidade a mais de uma enzima proteolítica, sugere a produção simultânea de diferentes bacteriocinas. No entanto, apenas avaliando-se o perfil de sensibilidade às proteases, não é possível determinar quantas bacteriocinas são produzidas pelo isolado, tendo em vista que as diferentes bacteriocinas podem ser sensíveis a uma ou mais enzimas proteolíticas (ARAUZ et al., 2009).

3.4 Aspectos de segurança dos isolados de BAL

3.4.1 Atividade da enzima DNase

Os sete isolados (EO1, EO2, SO8, SO9, SO10, EO18 e IO45) produtores de substâncias antimicrobianas de natureza proteica apresentaram resultados negativos para a produção da enzima DNase, a qual degrada os ácidos nucleicos.

Anacarso et al. (2017) caracterizaram duas cepas de BAL isoladas de fatias de presunto, e observaram que os isolados não apresentaram atividade da enzima DNase. Os resultados do presente estudo também corroboram com os encontrados por Vitola et al. (2018), em que seis isolados testados provenientes de silagem de colostro apresentaram resultados negativos para a produção da enzima DNase.

3.4.2 Atividade da enzima gelatinase

Para a presença da enzima gelatinase, que hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, os resultados mostraram que 6 (85,7%) isolados (EO1, EO2, SO8, SO9, SO10, EO18) não produziram a enzima.

Estudos conduzidos por Vitola et al. (2018) não identificaram nenhum dos isolados de *Lactobacillus casei*, como produtores da enzima gelatinase. Moreno et al. (2018) ao avaliarem 5 isolados de BAL obtidos de produtos cárneos, também verificaram que nenhum isolado apresentou atividade da enzima gelatinase.

Como o isolado IO45 apresentou atividade da enzima gelatinase, o mesmo foi excluído das posteriores análises.

3.4.3 Atividade hemolítica

No presente estudo, os 7 isolados (EO1, EO2, SO8, SO9, SO10, EO18 e IO45) foram positivos para a atividade da enzima α -hemolisina (lise parcial), apresentando halos de coloração amarelada/esverdeada. Quanto a atividade β -hemolítica, nenhum isolado foi capaz de produzir essa enzima.

Esse resultado é importante, visto que a β -hemolisina é uma enzima capaz de lisar eritrócitos humanos e de animais como equinos e coelhos (EATON e GASSON, 2001), sendo uma das características fenotípicas utilizadas como marcador de patogenicidade.

Gomes et al. (2008) relataram a presença da enzima α -hemolisina em 81% dos isolados de *E. faecium* provenientes de produtos cárneos e completa ausência de β -hemolisina nesses mesmos isolados.

3.4.4 Susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos de uso clínico

Na Tabela 3 podem ser observados os resultados de susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

Tabela 3: Perfil de susceptibilidade dos isolados de bactérias ácido lácticas a antimicrobianos de uso clínico.

Isolados	CIP (5 µg)	CLO (30 µg)	GEN (10 µg)	TET (30 µg)	PEN (10 µg)	SUL (300 µg)	ERI (15 µg)
EO1	S	S	S	S	R	R	S
EO2	S	S	S	S	R	R	S
EO18	S	S	S	S	R	R	I
SO8	S	S	S	S	R	R	I
SO9	S	S	S	S	R	R	I
SO10	S	S	S	S	R	R	S
IO45	S	S	S	S	R	R	S

CIP: ciprofloxacina; CLO: cloranfenicol; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; PEN: penicilina G; SUL: sulfonamidas; ERI: eritromicina; S: sensível; R: resistente; I: intermediário.

Pode-se observar que os sete isolados apresentaram-se susceptíveis à ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina. A resistência apresentada pelos isolados à sulfonamidas pode ter relação com o uso do antimicrobiano em ovinos, visto que é um dos antimicrobianos usados na medicina veterinária para tratar ou prevenir doenças (SARMAH et al., 2006).

Além disso, 100% dos isolados demonstraram resistência ao antimicrobiano penicilina G. Esse resultado contrasta com os dados encontrados por Valenzuela et al. (2010) e Vitola et al. (2018), nos quais nenhum isolado apresentou resistência à esse antimicrobiano. Contudo, Kayser (2003) afirmou que *Enterococcus* podem ser intrinsecamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas, possuindo a capacidade de adquirir genes de resistência, através de plasmídeos e transposons.

Moreno et al. (2018), ao analisarem a resistência de isolados de BAL de produtos cárneos (*Lactococcus* e *Lactobacillus*), observaram resistência à cloranfenicol e à eritromicina, contrastando com os resultados encontrados neste estudo. Porém, os mesmos isolados apresentaram sensibilidade à tetraciclina, como o que foi encontrado no presente estudo.

No estudo de Anacarso et al. (2017), os isolados (*Lactobacillus*) apresentaram sensibilidade à tetraciclina e cloranfenicol, porém um dos isolados demonstrou resistência a gentamicina, diferente do que foi encontrado neste estudo e também por Vitola et al. (2018), os quais todos os isolados de *L. casei* foram susceptíveis à gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol e ciprofloxacina.

A capacidade de uma bactéria resistir à exposição aos antimicrobianos pode representar uma ameaça à saúde humana e animal, pois a presença dessa bactéria nos alimentos e no trato gastrointestinal pode agir como reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos, os quais podem ser transferidos para outras bactérias, tornando-as multirresistentes (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014).

3.5 Identificação molecular dos isolados

A análise do sequenciamento do gene 16S rDNA identificou os isolados EO1, EO2 e EO18 como *Enterococcus faecium*, com 97, 96 e 93% de similaridade, respectivamente. Já os isolados SO8, SO9 e SO10 foram identificados como *Streptococcus gallolyticus*, com 92, 94 e 94% de similaridade, respectivamente.

Streptococcus gallolyticus é uma espécie encontrada na microbiota intestinal de animais e humanos, podendo causar neste último, carcinoma gastrointestinal (ABDULAMIR et al., 2009; POTTER et al., 1998). Em trabalhos realizados por O'Shea et al. (2009), foram isoladas e identificadas várias BAL do trato gastrointestinal de mamíferos, e foi possível verificar a produção de bacteriocina por uma cepa de *Streptococcus gallolyticus* isolada do jejuno suíno.

O gênero *Enterococcus* spp. compreende bactérias que fazem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de humanos e animais, podendo ser encontrados também na água, alimentos e em outras fontes (REFFUVEILLE et al., 2011).

De acordo com o estudo de Gomes et al. (2008), foi evidenciada a prevalência de *Enterococcus* sp. em 60% dos produtos cárneos, sendo a espécie *E. faecium* mais frequentemente isolada.

Em virtude de *S. gallolyticus* apresentar importância clínica para o homem, e por sua vez, *E. faecium* estar vinculado à alimentos (ASPRI et al., 2017; VALENZUELA et al., 2010), deu-se continuidade aos estudos somente com os isolados de *E. faecium*.

3.6 Avaliação da estabilidade e quantificação da substância antimicrobiana

3.6.1 Estabilidade na presença de NaCl, sais de cura, diferentes valores de pH e temperatura

O efeito da adição de NaCl e sais de cura na atividade antimicrobiana dos SLC obtidos dos isolados de *E. faecium* foram avaliados e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos às diferentes concentrações de NaCl e sais de cura (% de atividade em relação ao controle).

Sais	Atividade antimicrobiana residual (%)		
	EO1	EO2	EO18
2% NaCl	98	86	88
5% NaCl	96	93	90
10% NaCl	97	94	-
0,1% sais cura	98	90	86
0,2% sais cura	95	89	91
0,3% sais cura	94	87	89
Controle	100	100	100

De acordo com os valores obtidos, observa-se que o aumento na concentração de NaCl e sais de cura adicionados, não apresentou efeito proporcional na diminuição da atividade antimicrobiana residual dos SLC. A única exceção, foi no tratamento com concentração de 10% de NaCl para a amostra EO18, a qual não apresentou atividade antimicrobiana. Esses resultados são importantes, pois a maioria dos produtos cárneos fazem uso de aditivos como sal (NaCl) e sais de cura, e foi possível perceber que os referidos aditivos não influenciaram na atividade antagonista.

O efeito dos diferentes valores de pH na atividade antagonista dos SLC, obtidos de cada isolado estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos a diferentes valores de pH (% de atividade em relação ao controle).

pH	Atividade antimicrobiana residual (%)		
	EO1	EO2	EO18
2	99	83	84
4	96	82	91
6	100	86	83
8	93	86	90
10	83	71	83
Controle	100	100	100

A atividade antimicrobiana dos SLC foi superior a 70% nos diferentes tratamentos. É importante que nos pH 2 e 4 a substância antimicrobiana tenha estabilidade, visto que alguns produtos cárneos possuem condições ácidas e, dessa maneira a substância antimicrobiana se apresenta como uma alternativa para aplicação nesse tipo de alimento. Nesses valores de pH, a atividade se mostrou acima de 70% para todos os isolados, destacando o isolado EO1, o qual manteve atividade residual acima de 90% em todos os tratamentos, exceto em pH 10.

Aspri et al. (2017) encontraram resultados semelhantes a este estudo, visto que os SLC produzidos por *E. faecium*, mantiveram atividade residual acima de 80% durante os diferentes tratamentos (pH 2 a 8).

Em estudos conduzidos por Barbosa et al. (2016), a atividade residual da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolada de salame tipo italiano, manteve-se igual ao tratamento controle em pH ácido (2-6), porém diminuiu para 20,8% em pH 8 e não apresentou atividade antimicrobiana em pH 10. Diferentemente do resultado encontrado neste trabalho, a atividade residual foi mantida tanto em pH ácido quanto alcalino (8-10).

O efeito do tratamento térmico na atividade antimicrobiana dos SLC obtidos, de cada isolado estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Atividade antimicrobiana residual dos Sobrenadantes Livres de Células, produzida pelos isolados de BAL de carne ovina (EO1, EO2 e EO18), submetidos às diferentes temperaturas (% de atividade em relação ao controle).

Temperaturas (°C)	Atividade antimicrobiana residual (%)		
	EO1	EO2	EO18
40	100	85	88
50	100	88	84
60	82	86	94
70	92	87	87
80	85	83	89
90	74	92	92
100	-	88	82
121	-	-	61,5
Controle	100	100	100

Pode-se observar que em todos os SLC foi verificada atividade potencialmente bacteriocinogênica entre as temperaturas de 40 a 90 °C, não reduzindo mais que 30% em comparação ao tratamento controle (não submetido ao tratamento térmico). Porém, quando os SLC foram submetidos às condições de calor úmido (121 °C/15 min), somente o isolado EO18 manteve atividade residual, com percentual inferior ao encontrado em outras temperaturas.

Estes resultados são importantes, pois demonstra uma relativa estabilidade do SLC contendo substâncias antimicrobianas durante aquecimento a altas temperaturas, o que é interessante do ponto de vista tecnológico para aplicação em alimentos submetidos ao tratamento térmico.

Estes resultados são similares ao trabalho de Aspri et al. (2017), os quais avaliaram o efeito das mesmas temperaturas, porém durante menor tempo de aplicação, nos SLC obtidos de isolados de *E. faecium*. Neste trabalho a atividade antimicrobiana residual manteve-se nos diferentes tratamentos.

3.6.2 Citotoxicidade das substâncias antimicrobianas no SLC

A avaliação de citotoxicidade com a substância antimicrobiana produzida é fundamental para uma futura aplicação em alimentos para consumo humano (BELGACEM et al., 2010; GOMES et al., 2008).

De acordo com os dados obtidos, o SLC puro e as diluições 1:10 e 1:20 do SLC dos isolados EO1, EO2 e EO18, apresentaram citotoxicidade para as células MDBK. Nas diluições subsequentes (1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640) a viabilidade celular foi superior a 90% para todas as amostras.

Em um estudo que avaliou a toxicidade do peptídeo antimicrobiano P34 produzido por *Bacillus* sp. isolado de pescado, também sobre células MDBK, não foi verificada citotoxicidade em concentrações menores que $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CASTRO et al., 2017).

Vaucher et al. (2010) estudaram a citotoxicidade em células Vero da bacteriocina P40 produzida pela cepa *Bacillus licheniformis* P40 e também da nisina que foi usada como comparação. Nesse trabalho, ambos peptídeos apresentaram comportamento semelhante, onde com o aumento da concentração da bacteriocina (0,02 até $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ocorria a diminuição da viabilidade celular. Esses autores sugeriram que o aumento da citotoxicidade da nisina e de outros peptídeos antimicrobianos contra alguns tipos de células, pode estar relacionado com diferenças na hidrofobicidade da superfície celular, que pode influenciar na ligação do peptídeo e na sua ação citotóxica.

3.6.3 Quantificação da atividade antimicrobiana do SLC

A atividade antimicrobiana referente aos SLC dos isolados EO1, EO2 e EO18 contra *L. monocytogenes* Sott A foi de 400 UA.mL^{-1} .

Anacarso et al. (2017) relataram atividade bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes* NCTC 10888 para os SLC de *L. plantarum*-GS16 e *L. paraplantarum*-GS54, isoladas de fatias de presunto. As atividades antimicrobianas foram de 1.600 e 3.200 UA.mL^{-1} , respectivamente. No entanto, em outro estudo onde foram avaliadas a atividade antimicrobiana de enterocinas produzidas por *Enterococcus* isolados de salame do tipo italiano, os resultados encontrados foram de 620 a 1.280 UA.mL^{-1} (SABIA et al., 2004).

3.7 Identificação da presença de genes produtores de bacteriocinas

Dentre os 3 isolados de *E. faecium* avaliados, somente o isolado EO1 apresentou um dos genes estruturais que codifica a enterocina A (*entA*), confirmado

pela amplificação de um fragmento de 138pb (Figura 1), e não apresentando os genes que codificam para as enterocinas B, P e L50A/B. Além disso, o gene *entA* foi confirmado pela técnica de sequenciamento, com 99% de similaridade. Diferente do que aconteceu no trabalho de Özdemir et al. (2011), onde foram identificados a presença dos genes estruturais das enterocinas A, B, P e L50A/B em 94,7% de 57 isolados de *Enterococcus* spp., obtidos de água, alimentos e animais.

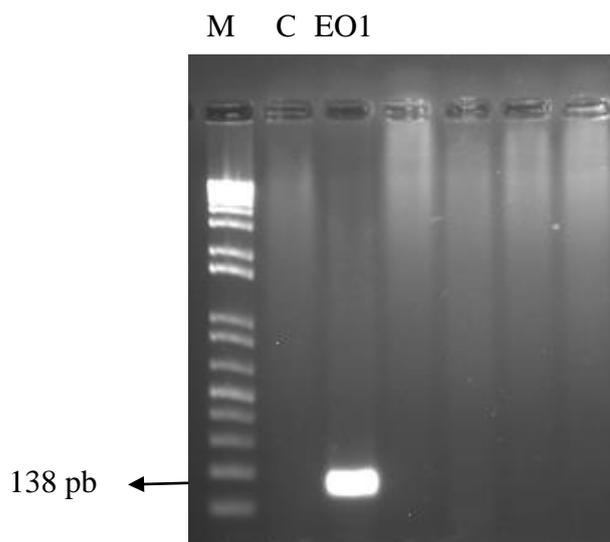


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR do isolado de *E. faecium* EO1 proveniente de carne ovina, para identificação do gene estrutural da enterocina A. M: marcador de peso molecular Ladder 1kb; C: controle negativo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923); EO1 isolado positivo para o gene de Enterocina A.

Em estudo conduzido por Valenzuela et al. (2010), ao analisarem 12 isolados de *E. faecium* que possuíam atividade anti-listerial, provenientes de frutos do mar, obtiveram somente um isolado portador do gene estrutural para enterocina A. A frequência de isolados de *Enterococcus* portadores desse gene é bastante variável, visto que 9 isolados de *E. faecium* obtidos de produtos lácteos foram analisados quanto a presença de genes codificadores de bacteriocina, e todos apresentaram somente o gene correspondente para enterocina A (MIRHOSSEINI et al., 2010).

Sabe-se que a enterocina A pertence a família da pediocina e está agrupada na Classe II.a, as quais são efetivas contra a multiplicação de *Listeria* (EIJNSINK et al., 1998), corroborando com os resultados encontrados nesse estudo. Além disso, os peptídeos dessa classe possuem um restrito espectro de inibição, têm sido extensivamente estudados em relação à genética, estrutura e modo de ação, e podem possuir espectro de atividade frente a outros micro-organismos deteriorantes

e patogênicos como *Brochotrix* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. (ALVAREZ-SIERO et al., 2016; ENNAHAR et al., 2000).

3.8 Cinética de crescimento e produção de substância antimicrobiana pelo isolado *E. faecium* EO1

A cinética de ação (Fig. 2) foi avaliada somente para o isolado EO1, pois foi o único que apresentou o gene que codifica para a produção de enterocina.

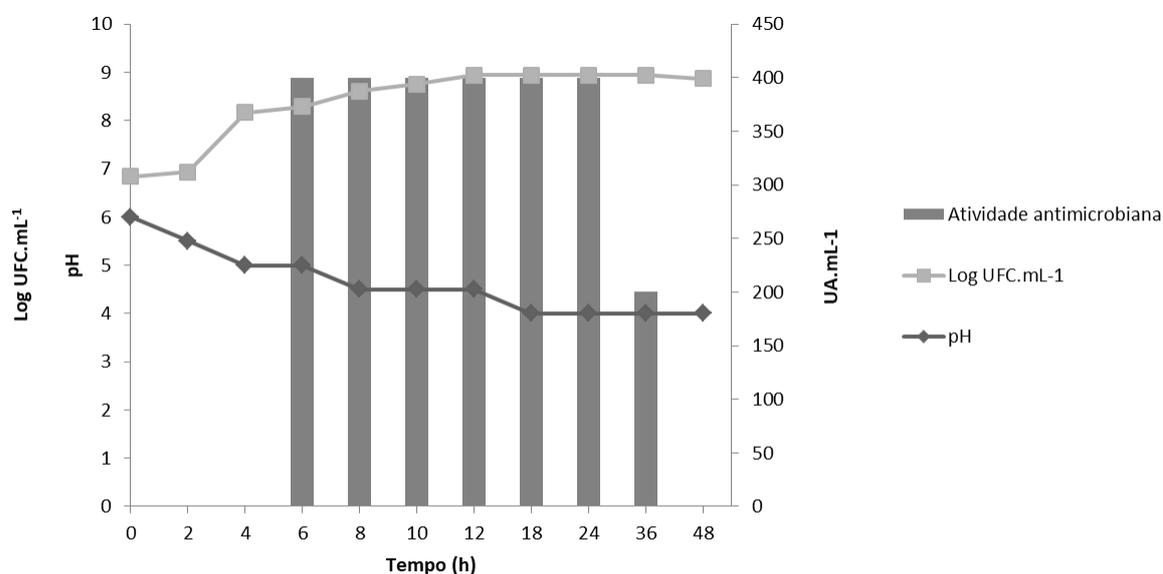


Figura 2: Número de células viáveis (Log UFC.mL⁻¹), produção de substância antimicrobiana (UA.mL⁻¹) e variação do pH durante a multiplicação de *E. faecium* EO1 em 48 horas.

Verificou-se que a fase exponencial de crescimento do isolado *E. faecium* EO1 iniciou após duas horas da inoculação, terminando aproximadamente após 12 h de incubação. A partir deste período, manteve relativa constância (fase estacionária) até 36 h, seguido de declínio ao final do experimento (48 h), variando de 6,8 Log UFC.mL⁻¹ até 8,8 Log UFC.mL⁻¹.

A atividade antimicrobiana atingiu o valor máximo de 400 UA.mL⁻¹ após 6 h de cultivo (fase exponencial), mantendo-se até as 24 h, com posterior decréscimo, coincidindo com o final da fase estacionária e início da fase de declínio. Isto pode ter ocorrido devido a vários fatores, como agregação, presença e ação de proteases

extracelulares ou mesmo a adsorção às células do próprio isolado produtor da substância antimicrobiana (DE VUYST et al., 1996).

Quanto ao pH do meio, o valor inicial foi próximo de 6,0 e finalizou com pH igual a 4,0 após as 48 h de incubação. Este comportamento era esperado, visto que quanto maior a concentração celular, maior é a produção de ácidos orgânicos, e conseqüentemente diminuição do pH. Observa-se também que a atividade é máxima nos valores de pH entre 5,0 e 4,0, demonstrando que a substância antimicrobiana é estável ao pH ácido, o que já foi comprovado no experimento de estabilidade ao pH.

No trabalho de Mirhosseini et al. (2010), a produção de bacteriocinas por isolados de *E. faecium* iniciou na metade da fase exponencial de crescimento, e as atividades antimicrobianas máximas foram encontradas durante a fase estacionária, porém essa atividade só foi atingida após 33 h de crescimento.

Diferentemente, Barbosa et al. (2015) ao avaliarem 2 isolados de *L. curvatus*, provenientes de salame, verificaram que a produção das respectivas bacteriocinas ocorreram no início da fase exponencial (após 4 h de incubação), atingindo valores máximos após 8 h de crescimento. Perez et al. (2014) afirmaram que talvez a maior vantagem das bacteriocinas sobre os antibióticos convencionais é que elas são consideradas metabólitos primários naturais, com mecanismos biossintéticos relativamente simples, diferente dos antibióticos que são metabólitos secundários. Os resultados encontrados por esses autores vão de encontro ao que foi constatado nesse trabalho e demonstra a grande variação no tempo e quantidade de substâncias antimicrobianas produzidas pelos diferentes micro-organismos.

3.9 Aplicação e avaliação da substância antimicrobiana em linguiça ovina frescal contaminada com *L. monocytogenes* Scott A

3.9.1 Verificação do efeito das substâncias antimicrobianas no produto

A atividade antimicrobiana do SLC de *E. faecium* EO1 sobre *L. monocytogenes* Scott A na linguiça ovina frescal está apresentado na Figura 3.

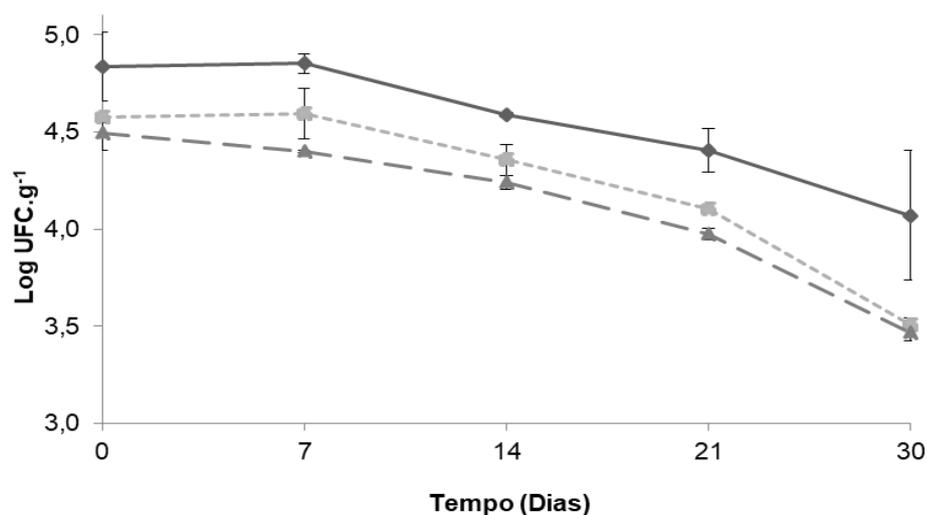


Figura 3 - Contagem de *L. monocytogenes* Scott A em linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada, durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (♦) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (■) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (▲) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.

Pode ser observado que a contagem de células viáveis de *L. monocytogenes* ao decorrer do período de armazenamento reduziu em todos os tratamentos, e as maiores reduções foram naqueles que utilizaram o SLC na formulação. Os resultados variaram de 4,57 e 4,49 log UFC.g⁻¹ a 3,5 e 3,47 log UFC.g⁻¹ nos tratamentos contendo 5 e 10% da substância antimicrobiana, respectivamente (redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico). A contagem de *L. monocytogenes* diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) a partir do 21º dia, quando comparado à contagem inicial, nos tratamentos que continham o SLC. Porém, ao final dos 30 dias de armazenamento, ao comparar as contagens finais de *L. monocytogenes* Scott A em todos os tratamentos, aqueles que continham o SLC não foram suficientemente eficientes no controle do patógeno, visto que não diferiram significativamente do tratamento que possuía somente o micro-organismo contaminante. Apesar deste patógeno ser capaz de se desenvolver em temperatura de refrigeração (4 °C), o mesmo apresentou viabilidade após 7 dias, porém seguiu decrescendo até os 30 dias de armazenamento (4,07 log UFC.g⁻¹).

De acordo com esses resultados, o melhor efeito foi produzido pela adição de 10% de SLC à linguiça ovina frescal, pois manteve contagens significativamente

inferiores ao tratamento que continha apenas *L. monocytogenes* nos tempos 7, 14 e 21 dias de armazenamento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa et al. (2015), que adicionaram a bacteriocina semi-purificada produzida por *L. curvatus* MBSa2 em salame experimentalmente contaminado com *L. monocytogenes* Scott A. A ação da bacteriocina promoveu uma redução não significativa na contagem do micro-organismo indicador nos primeiros 4 dias de fermentação, e ao final dos 30 dias a diferença significativa foi de 1,77 ciclos logarítmicos para o tratamento controle (somente com *L. monocytogenes*).

Sant'Anna et al. (2013) ao analisarem o efeito da bacteriocina P34 parcialmente purificada em linguiça frescal de frango inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 7644 durante 10 dias de armazenamento refrigerado, encontraram diminuição das contagens tanto no tratamento controle quanto no tratamento contendo a bacteriocina, porém com uma redução significativa, principalmente, nos primeiros 3 dias de armazenamento.

Deve-se levar em consideração que a presença de alguns ingredientes na linguiça, bem como a gordura e a própria carne ovina, podem ter influenciado na difusão do SLC no produto, afetando sua ação frente ao patógeno. Além disso, a presença de proteases ou agentes conservantes como NaCl e sais de cura, também podem ter afetado a conservação do produto, visto que diminuiu a contagem de *L. monocytogenes* Scott A durante o período de armazenamento, e ao final dos 30 dias de armazenamento, o produto não apresentava aspecto de deterioração, o que pôde ser visualizado diretamente no produto (Figura 4). No estudo de Rivas et al. (2014), os autores verificaram que quando o SLC foi aplicado em matriz cárnea contendo carne e gordura suína, a atividade antimicrobiana diminuiu 50% durante o armazenamento devido à absorção da bacteriocina por estes componentes.

De acordo com Castellano et al. (2017), para assegurar a eficácia de uma nova bacteriocina, testes contra bactérias-alvo específicas devem ser realizados no próprio alimento no qual ela será aplicada. Dessa maneira, devem ser considerados alguns fatores que podem influenciar na propagação das bacteriocinas no alimento, como: concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, enzimas presentes no alimento, solubilidade no produto, conteúdo e superfície lipídica disponível para solubilização, distribuição uniforme no alimento e possível inativação por outros aditivos (TIWARI et al., 2009).



Figura 4 - Foto da linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A. Fonte: Autor.

3.9.2 Avaliação do pH e atividade de água no produto

Os valores de pH variaram durante o experimento, entre 5,96 a 6,33, apresentando um aumento nos primeiros 7 dias de armazenamento, seguido de uma estabilidade até o 21º dia, e após um decréscimo ao final dos 30 dias (Figura 5).

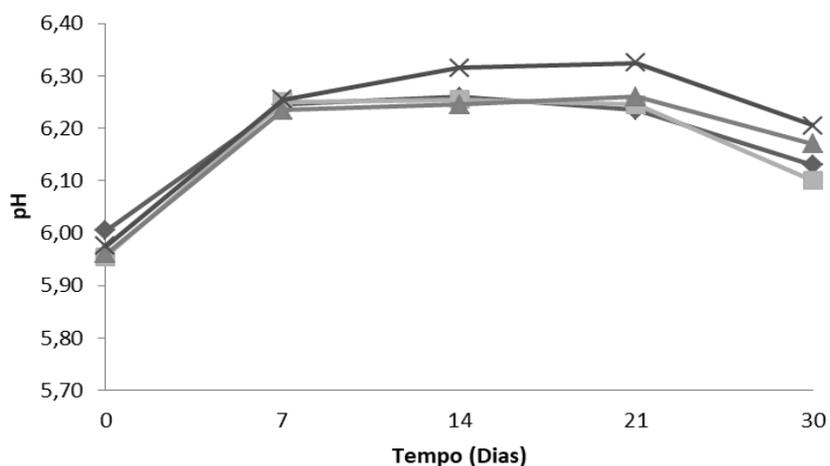


Figura 5 - Variação do pH em linguiça ovina frescal experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (◆) Tratamento controle: sem adição do micro-organismo indicador e sem adição do SLC; (■) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (▲) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (X) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.

Pode-se afirmar que o pH não influenciou negativamente na atividade do SLC, visto que de acordo com a Tabela 5, o isolado utilizado para a produção e aplicação do SLC (EO1) apresentou 100% de atividade antimicrobiana residual em valores de pH próximos a 6,0.

Resultado semelhante foi verificado por Zhang et al. (2010), no qual o pH das amostras de carne suína refrigerada adicionadas de nisina e pentocina, aumentou gradualmente (5,5 – 7,1) com o tempo de armazenamento (18 dias). Em estudo de Mattila et al. (2003), a adição de um preparado de pediocina AcH não influenciou no pH de embutido cárneo cozido fatiado embalado à vácuo durante 21 dias de armazenamento.

Os resultados da análise de atividade de água variaram entre 0,976 e 0,897, e estão apresentados na Figura 6, onde pode-se observar que houve um aumento durante os 30 dias de armazenamento. Esse aumento pode ter ocorrido devido aos valores de pH terem se mantido acima de 6,0, o que leva a um aumento na capacidade de retenção de água na carne. Mesmo com esse aumento na atividade de água, não houve influência na multiplicação do micro-organismo indicador, pois houve uma diminuição nas contagens de células viáveis ao longo do armazenamento.

Em um estudo que avaliou a atividade de água em presunto cozido adicionado de diferentes concentrações de nisina, durante 60 dias de armazenamento à temperatura de 8 °C, os valores ficaram em 0,97 em todas formulações (KALSCHNE et al., 2014).

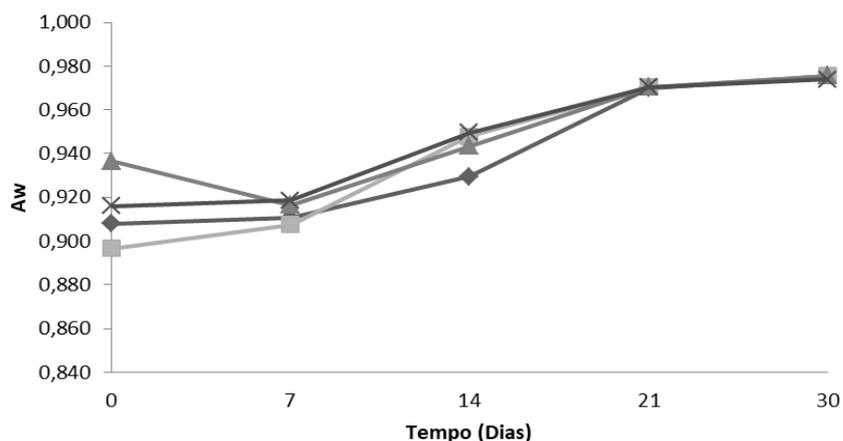


Figura 6 - Variação da atividade de água (A_w) em linguiça ovina fresca experimentalmente contaminada com *L. monocytogenes* Scott A durante 30 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). (◆) Tratamento controle: sem adição do micro-organismo indicador e sem adição do SLC; (■) T1: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador; (▲) T2: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 5% de SLC; (X) T3: Tratamento contendo 0,1% de micro-organismo indicador + 10% de SLC.

4 Conclusões

Obteve-se três isolados de BAL (*E. faecium*) a partir de carne ovina, produtores de substâncias antimicrobianas com atividade anti-listerial, sendo que o isolado *E. faecium* EO1 apresentou o gene codificador da enterocina A. O SLC obtido deste isolado, apresentou estabilidade a diferentes temperaturas, valores de pH, presença de NaCl e sais de cura. Além disso, também apresentou atividade antimicrobiana em linguiça ovina fresca contaminada com *L. monocytogenes*, reduzindo-a significativamente em 21 dias de armazenamento. Dessa forma, a linguiça ovina fresca pode ser considerada um bom veículo para incorporação do SLC de *E. faecium* EO1 com atividade potencialmente bacteriocinogênica contra *L. monocytogenes*.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6 Referências Bibliográficas

ABDULAMIR A. S.; HAFIDH, R. R.; MAHDI, L. K.; AL-JEBOORI, T.; ABUBAKER, F. Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. BMC Cancer, v. 19, p.399-403, 2009.

ABDULLAH, B. M. Beef and sheep mortadella: formulation, processing and quality aspects. International Journal of Food Science and Technology. v. 39. 2004.

ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. Applied Microbiology Biotechnology, v. 100, p. 2939-2951, 2016.

ANACARSO, I.; GIGLI, L.; BONDI, M.; NIEDERHAUSERN, S. de; STEFANI, S.; CONDO, C.; MESSI, P. Isolation of two lactobacilli, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for potential food-preservative use. European Food Research and Technology. 2017.

ANANOU, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. Food Control, v. 21, p. 478-486, 2010.

ARAUZ, L. J.; JOZALA, A. F.; MAZZOLA, P. G.; PENNA, T. C. V. Nisin biotechnological production and application: A review. Trends in Food Science and Technology, v.20, p.146-154, 2009.

ASPRI, M.; O'CONNOR, P. M.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73, p.1-9, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the AOAC (18th ed.). Gaithersburg: M.D, USA. 2005.

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; FRANCO, B. D. G. M. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, v. 46, p. 254-262, 2015.

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; BELGUESMIA, Y.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; FRANCO, B. D. G. M. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*, v. 60, p. 103-112, 2016.

BARON, F.; COCHET, M.-F.; PELLERIN, J.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Journal Food Protection*, v. 67, p. 2302–2305, 2004.

BEHRENDT, K.; WEEKS, P. How are global and Australian sheep meat producers performing? Global agri benchmark network results 2016. Published by Meat & Livestock Australia Limited, p. 1–14, 2017.

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

BISCOLA, V.; TODOROV, S. D.; CAPUANO, V. S. C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin

produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*, v. 93, n. 3, p.607–613, 2013.

CABRAL, C. C.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, v. 9, n. 3, p. 243-249, 2014.

CASABURI, A.; MARTINO, V. D.I.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, L.; VILLANI, F. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*. 2016.

CASTELLANO, P.; IBARRECHE, M. P.; MASSANI, M. B.; FONTANA, C.; VIGNOLO, G. M. Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, v. 5, n. 3, p. 38-63. 2017.

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. 2008.

CASTRO, C. C. de; SILVA, D. S.; COSTA, G. A.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D.; BRANDELLI, A.; LIMA, M. de; MOTTA, A. S. da; HÜBNER, S. O. Activity of the antimicrobial peptide P34 against bovine alphaherpesvirus type 1. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47, n.6, 2017.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.Z.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, v.87, p.321–329, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved

standard - Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COTON, E.; COTON, M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 63, n. 3, p. 296-304, 2005.

CRUXEN, C. E. dos S.; BRAUN, C. L. K.; FAGUNDES, M. B.; GULARTE, M. A.; WAGNER, R. DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Development of fermented sausage produced with mutton and native starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, v. 95, p. 23-31, 2018.

DE ANDRADE, J. C.; NALÉRIO, E. S.; GIONGO, C.; DE BARCELLOS, M. D.; ARES, G.; DELIZA, R. Consumer sensory and hedonic perception of sheep meat coppa under blind and informed conditions. *Meat Science*, v. 137, p. 201-210, 2018.

DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBE, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, v. 142, p. 817-827, 1996.

D'SOUZA, A. L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, J.; BULPITT, C. J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis. *British Medical Journal*, v. 324, n. 7350, p. 1-6, 2002.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635, 2001.

EIJSSINK, V. G. H.; SKEIE, M.; MIDDELHOVEN, P. H.; BRURBERG, M. B.; NES, I. F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied Environment Microbiology*, 64:3275–3281, 1998.

ENNAHAR S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 24, 2000.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, v.30, n.6, p.1040-1042, 1975.

FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. *Bulletin of International Dairy Federation*, v. 352, n. 1, p. 5-30, 2000.

FONTANA, C.; COCCONCELLI, P. S.; VIGNOLO, G.; SAAVEDRA, L. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control*, v. 47, p. 53-59, 2015.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H.; GÁLVEZ, A. Safety of lactic acid bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. p. 341-359. 2010.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, v. 25, 668-675. 2008.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. LWW; Ninth edition. 1994.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; DE PAULA, A. T.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 6, n. 3-4, p. 141–156, 2014.

KALSCHNE, D. L.; GEITENES, S.; VEIT, M. R.; SARMENTO, C. M. P.; COLLA, E. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. *Meat Science*, v. 98, p. 744-752, 2014.

KATEETE, D. P., KIMANI, C. N., KATABAZI, F. A., OKENG, A., OKEE, M. S., NANTEZA, A., JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 9, n. 23, 2010.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, 255-262, 2003.

KUMAR, M., SRIVASTAVA, S. Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 698–706. 2010.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, n. 13, p. 145–150, 1991.

LIU, W.; PANG, H.; ZHANG, H.; CAI, Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*; ZHANG, Y., CAI, Y., Eds.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands, 2014.

MATTILA, K.; SARIS, P.; TYOPPONEN, S. Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausages after treatment with pediocin Ach. *International Journal of Food Microbiology*, v. 89, p. 281-286, 2003.

MIRHOSSEINI, M.; NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; TAVASSOLI, M. Characterisation of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin from *Enterococcus faecium* strains isolated from dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v. 63, p. 55-61, 2010.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with

bacteriocinogenic potencial. LWT. Food Science and Technology, v. 43, p. 1320-1324, 2010.

MORENO, I.; MARASCA, E. T. G.; SÁ, P. B. Z. R. de; MOITINHO, J. S.; MARQUEZINI, M. G.; ALVES, M. R. C.; BROMBERG, R. Evaluation of Probiotic Potential of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Meat Products. Probiotics and Antimicrobial Proteins, v. 10, p. 762-774, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity tests. Journal of Immunology Methods. 65, 55–63. 1983.

MURUA, A.; TODOROV, S. D.; VIEIRA, A. D. S.; MARTINEZ, R. C. R.; CENCIČ, A.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. Journal of Applied Microbiology, v. 114, n. 6, p. 1793–1809, 2013.

NASSU, R. T.; BESERRA, F. J.; GONÇALVES, L. A. G. Processo Agroindustrial: Obtenção de Embutido Fermentado Tipo Salame de Carne de Caprinos. Fortaleza, CE: Embrapa, Comunicado Técnico, v. 74. 2002.

OSÓRIO, J. C. da S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 38(Suppl. 1), p. 292–300, 2009.

O'SHEA, E. F.; GARDINER, G. E.; O'CONNOR, P. M.; MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Characterization of enterocin- and salivaricin-producing lactic acid bacteria from the mammalian gastrointestinal tract. FEMS Microbiology Letters, v. 291(1), p. 24-34, 2009.

ÖZDEMİR, G. B.; ORYASIN, E.; BIYIK, H. H.; ÖZTEBER, M.; BOZDOGAN, B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. Indian Journal of Microbiology, v. 51, n. 2, p. 182-187, 2011.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 3, p. 521–542, 2007.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*, 26(3), 278–282, 2009.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (lab): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13 (Suppl 1):S3, 2014.

POTTER, M. A.; CUNLIFFE, N. A.; SMITH, M.; MILES, R. S.; FLAPAN, A. D.; DUNLOP, M. G. A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, v. 51(6), p.473–474, 1998.

REFFUVEILLE, F.; LENEVEU, C.; CHEVALIER, S.; AUFFRAY, Y.; RINCÉ, A.: Lipoproteins of *Enterococcus faecalis*: bioinformatic identification, expression analysis and relation to virulence. *Microbiology*, v. 157, n. 11, p. 3001-3013, 2011.

RIBEIRO, S. C.; COELHO, M. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*. v. 116, n. 3, p. 573–585, 2014.

RIVAS, F. P.; CASTRO, M. P.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.; CAMPOS, C. A. Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: Functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. *Meat Science*, v. 97, p. 475-479, 2014.

SABIA, C.; MESSI, P.; NIEDERHÄUSERN, S.; MANICARDI, G.; BONDI, M. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus faecalis*. Letters Applied in Microbiology, v. 38 (2), p. 99-105, 2004.

SANT'ANNA, V.; QUADROS, D. A. F.; MOTTA, A.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 4, p. 1163-1167, 2013.

SARMAH, A. K., MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere, 65(5), 725–759, 2006.

SORIA, M. C.; AUDISIO, M. C. Inhibition of *Bacillus cereus* Strains by Antimicrobial Metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21. Probiotics and Antimicrobial Proteins, p. 1–24, 2014.

SZABÓOVÁ, R.; LAUKOVÁ, A.; SIMONOVÁ, M. P.; STROMPFOVÁ, V.; CHRASTINOVÁ, L. Bacteriocin-Producing Enterococci from Rabbit Meat. Malaysian Journal of Microbiology, v. 8, n. 4, p. 211-218, 2012.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O'DONNELL C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 31, n. 7, p. 323-329, 2004.

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, n. 3, p. 334–343. 2010.

TODOROV, S. D.; VAZ-VELHO, M.; FRANCO, B. D. G. M.; HOLZAPFEL, W. H. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from *salpicão*, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 111-121, 2013.

VALENZUELA, A. S.; BENOMAR, N.; ABRIQUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*, v. 27, p. 955-961, 2010.

VAN HEEL, A. J., MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. v.7, p.675–680, 2011.

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*, 84, 1131–1137, 1998.

VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L.; BRANDELLI, A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Current Microbiology*, v. 60, p.1-5, 2010.

VIGNOLO, G.; SAAVEDRA, L.; SESMA, F.; RAYA, R. R. Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. In R. BHAT; A. K. ALIAS; G. PALIYATH (Eds.), *Progress in food preservation* (p. 453-483). Ames, Iowa, USA: Willey-Blackwell. 2012.

VITOLA, H. R. S; DANNENBERG, G. da S.; MARQUES, J. de L.; LOPES, G. V.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, A. M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*. 2018.

ZHANG, J.; LIU, G.; LI, P.; QU, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control*, v. 21, p. 198-202, 2010.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que:

- Foram isolados 84 BAL procedentes de carne ovina, dos quais 6 apresentaram atividade bacteriocinogênica no SLC contra *Listeria monocytogenes* Scott A, confirmaram a natureza protéica da substância antagonista e apresentaram segurança microbiológica;
- Os isolados SO8, SO9 e SO10 foram identificados molecularmente como *Streptococcus gallolyticus* e os isolados EO1, EO2 e EO18 como *Enterococcus faecium*;
- O isolado *Enterococcus faecium* EO1 apresentou genes que codificam a bacteriocina enterocina A, atingindo produção máxima a partir de 6 horas de cultivo, durante fase exponencial de crescimento;
- O SLC deste isolado apresentou estabilidade a diferentes temperaturas, valores de pH, presença de sal e sais de cura;
- Foi possível elaborar uma linguiça frescal de carne ovina proveniente de animais adultos;
- As quantidades de 5% e 10% de SLC foram capazes de inibir *L. monocytogenes* Scott A inoculada em linguiça ovina frescal (cortes de animais mais velhos), por 21 dias de armazenamento refrigerado (4 °C).

Como perspectivas futuras, sugere-se avaliar as características sensoriais do produto, sua aceitação e se a presença do SLC influencia nessas características. Também, realizar a purificação da bacteriocina e identificação dos aminoácidos presentes nos peptídeos que a compõem, bem como avaliar a atividade antimicrobiana na matriz alimentar.

Outra alternativa, é estudar a aplicação da substância antimicrobiana em embalagens/filmes ou então testá-la em outros produtos cárneos e/ou frente a outros micro-organismos indicadores. Assim poderá tornar-se uma alternativa na bioconservação de alimentos, podendo reduzir o uso de conservantes sintéticos e/ou a intensidade de tratamentos físicos, satisfazendo as demandas dos consumidores por alimentos frescos, saudáveis e seguros.

Por fim, é evidente que existe uma ampla possibilidade de aplicação das bacteriocinas, devendo ser vista não como uma única solução, mas sim como mais uma alternativa, a ser empregada pela indústria, em termos de segurança de

alimentos, especialmente quando combinadas com outras substâncias conservantes.

Referências Bibliográficas

ABDULAMIR A. S.; HAFIDH, R. R.; MAHDI, L. K.; AL-JEBOORI, T.; ABUBAKER, F. Investigation into the controversial association of *Streptococcus gallolyticus* with colorectal cancer and adenoma. *BMC Cancer*, v. 19, p.399-403, 2009.

ABDULLAH, B. M. Beef and sheep mortadella: formulation, processing and quality aspects. *International Journal of Food Science and Technology*. v. 39. 2004.

ACEDO, J. Z.; VAN BELKUM, M. J.; LOHANS, C. T.; McKAY, R. T.; MISKOLZIE, M.; VEDERAS, J. C. Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, p. 2910-2918, 2015.

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIYRY, M. A.; AL KARAAWI, M. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 49, n. 1, p. 1-11, 2017.

ALI, N. M.; ANDLEEB, S.; MAZHAR, B.; KHADIJA, I.; KALIM, B. Antibacterial Activity and Optimisation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef (Red Meat) Samples. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, Series B: biological sciences*, v. 59, n. 2, p. 85-98, 2016.

ALVAREZ-SIEIRO, P.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; MU, D.; KUIPERS, O. P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 100, p. 2939-2951, 2016.

AN, Y.; WANG, Y.; LIANG, X.; YI, H.; ZUO, Z.; XU, X.; ZHANG, D.; YU, C.; HAN, X. Purification and partial characterization of M1-UVs300, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented sausage. *Food Control*, v. 81, p. 211-217, 2017.

ANACARSO, I.; GIGLI, L.; BONDI, M.; NIEDERHAUSERN, S. de; STEFANI, S.; CONDO, C.; MESSI, P. Isolation of two lactobacilli, producers of two new bacteriocin-like substances (BLS) for potential food-preservative use. *European Food Research and Technology*. 2017.

ANANO, S.; BAÑOS, A.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; GÁLVEZ, A.; VALDIVIA, E. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control*, v. 21, p. 478-486, 2010.

ANASTASIADOU, S., PAPAGIANNI, M., FILIOUSIS, G., AMBROSIADIS, I., KOIDIS, P., Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5384-5390, 2008.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science e Emerging Technologies*, Wageningen, v. 3, p. 113-126, 2002.

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

ARTHUR, T. D.; CAVERA, V. L.; CHIKINDAS, M. L. On bacteriocin delivery systems and potential applications. *Future Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 235–248, 2014.

ASPRI, M.; O'CONNOR, P. M.; FIELD, D.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C.; PAPADEMAS, P. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *International Dairy Journal*, 73, p.1-9, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of the AOAC (18th ed.). Gaithersburg: M.D, USA. 2005.

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

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; CHOBERT, J.; HAERTLE, T.; FRANCO, B. D. G. M. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, v. 46, p. 254-262, 2015.

BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; IVANOVA, I.; BELGUESMIA, Y.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; FRANCO, B. D. G. M. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*, v. 60, p. 103-112, 2016.

BARBOZA, Y. M.; FERRER, K.; SALAS, E. M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 65, p. 1780-1783, 2002.

BARON, F.; COCHET, M.-F.; PELLERIN, J.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. *Journal Food Protection*, v. 67, p. 2302–2305, 2004.

BASTOS, M. C. F.; COUTINHO, B. G.; COELHO, M. L. V. Lysostaphin: A Staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals*, v. 3 (4), p. 1139-1161, 2010.

BEHRENDT, K.; WEEKS, P. How are global and Australian sheep meat producers performing? Global agri benchmark network results 2016. Published by Meat & Livestock Australia Limited, p. 1–14, 2017.

BELGACEM, Z. B.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CANAMERO, M.; GÁLVEZ, A.; MANAI, M. Antimicrobial activity, safety aspects, and

some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21, 462-470. 2010.

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

BHARTI, V.; MEHTA, A.; SINGH, S.; JAIN, N.; AHIRWAL, L.; MEHTA, S. Bacteriocin: a novel approach for preservation of food. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 9, p. 20-29, 2015.

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

BONOMO, M. G.; RICCIARDI, A.; SALZANO, G. Influence of autochthonous starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of traditional fermented sausages of Basilicata region. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 27, p. 137–146, 2011.

CABRAL, C. C.; CONTE-JUNIOR, C. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. *Salmonella* spp. contamination in fresh pork and chicken sausages marketed in Niterói and Rio de Janeiro, Brazil. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, v. 9, n. 3, p. 243-249, 2014.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems – A Review. *Food Control*, v. 54, p. 111-119. 2015.

CASABURI, A.; MARTINO, V. D. I.; FERRANTI, P.; PICARIELLO, L.; VILLANI, F. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*. 2016.

CASTELLANO, P.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. M. Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology*, v. 85, p. 35-43, 2002.

CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. M. Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins. *Letters of Applied Microbiology*, v. 43, p. 194-199, 2006.

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

CASTELLANO, P.; IBARRECHE, M. P.; MASSANI, M. B.; FONTANA, C.; VIGNOLO, G. M. Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, v. 5, n. 3, p. 38-63, 2017.

CASTRO, C. C. de; SILVA, D. S.; COSTA, G. A.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D.; BRANDELLI, A.; LIMA, M. de; MOTTA, A. S. da; HÜBNER, S. O. Activity of the antimicrobial peptide P34 against bovine alphaherpesvirus type 1. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47, n. 6, 2017.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, v. 87, p. 321–329, 2011.

CHAKCHOUK-MTIBAA, A.; SMAOUI, S.; KTARI, N.; SELLEM, I.; NAJAH, S.; KARRAY-REBAI, I.; MELLOULI, L. Biopreservative Efficacy of Bacteriocin BacFL31 in Raw Ground Turkey Meat in terms of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Qualities. *Biocontrol Science*, v. 22, n. 2, p. 67-77, 2017.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 2, p. 82, 2003.

CHO, G.-S.; HANAK, A.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Investigation into the potential of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* BFE 5092 for biopreservation of raw turkey meat. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 2, p. 241-249, 2010.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNANDEZ, P. E. Review: Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, v. 7, p. 281-305, 2001.

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.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2015. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

COTON, E.; COTON, M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 63, n. 3, p. 296-304, 2005.

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

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, London, n. 11, p. 95-105, 2013.

CRUXEN, C. E. dos S.; BRAUN, C. L. K.; FAGUNDES, M. B.; GULARTE, M. A.; WAGNER, R. DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Development of fermented

sausage produced with mutton and native starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, v. 95, p. 23-31, 2018.

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1151-1159, 2010.

DE ANDRADE, J. C.; NALÉRIO, E. S.; GIONGO, C.; DE BARCELLOS, M. D.; ARES, G.; DELIZA, R. Consumer sensory and hedonic perception of sheep meat coppa under blind and informed conditions. *Meat Science*, v. 137, p. 201-210, 2018.

DE MARTINIS, E. C. P., ALVES, V. F., FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*. v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

DE VUYST, L.; CALLEWAERT, R.; CRABBE, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, v. 142, p. 817-827, 1996.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf life extension. *International Dairy Journal*, Barking, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, Amsterdam. v. 38, Suppl. 2, p. S248-S255, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.*, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990.

DÍEZ, L.; ROJO-BEZARES, B.; ZARAZAGA, M.; RODRÍGUEZ, J. M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiology*, 31, 167-172, 2012.

DORTU, C.; HUCH, M.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P.; THONART, P. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-b28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-b1365 on raw beef and poultry meat. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, p. 581-586, 2008.

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

DUARTE, M. T.; CARRIJO, K. F. Quantificação do teor de nitrito de sódio residual em linguiças cozidas tipo calabresa comercializadas no sul do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10(19), p. 1606-1615, 2014.

D'SOUZA, A. L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, J.; BULPITT, C. J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis. *British Medical Journal*, v. 324, n. 7350, p. 1-6, 2002.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635, 2001.

EIJSINK, V. G. H.; SKEIE, M.; MIDDELHOVEN, P. H.; BRURBERG, M. B.; NES, I. F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied Environment Microbiology*, 64:3275–3281, 1998.

EIJSINK, V. G. H.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins of lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, 2002.

EMIROGLU, Z. K.; YEMIS, G. P.; COSKUN, B. K.; CANDOGAN, K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, v. 86, p. 283-288, 2010.

ENNAHAR S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 24, 2000.

ESKANDARI, M. H.; HOSSEINPOUR, S.; MESBAHI, G.; SHEKARFOROUSH, S. New composite nitrite-free and low-nitrite meat-curing systems using natural colorants. *Food Science and Nutrition*, v. 1, n. 5, p. 392-405, 2013.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, v.30, n.6, p.1040-1042, 1975.

FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. *Bulletin of International Dairy Federation*, v. 352, n. 1, p. 5-30, 2000.

FONTANA, C.; COCCONCELLI, P. S.; VIGNOLO, G.; SAAVEDRA, L. Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control*, v. 47, p. 53-59, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Food outlook: global market analysis*, 129 p., 2012.

FRANZ, C. M. A. P.; CHO, G. S.; HOLZAPFEL, W. H.; GÁLVEZ, A. Safety of lactic acid bacteria. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. p. 341-359. 2010.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. *Wine microbiology: practical applications and procedures*. Springer, 2.ed., 2007.

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

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R. L.; ABRIOEL, H.; VALDIVIA, E.; BEN OMAR, N. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 125-152, 2008.

GARCIA, M. T.; CANAMERO, M. M.; LUCAS, R.; OMAR, N. B.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *International Journal Food Microbiology*, v. 90, n. 2, p. 161-170, 2004.

GAUTAM, S.; SHARMA, N. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology, India*. v. 49. 2009.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D.; DE MARTINIS, E. C. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 668-675, 2008.

GUERRA, N. P.; MACÍAS, C. L.; AGRASAR, A. T.; CASTRO, L. P. Development of a bioactive packaging cellophane using nisaplin as biopreservative agent. *Letters of Applied Microbiology*, v. 40, p. 106-110, 2005.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology, Lausanne*, v. 4, p. 1-12, 2013.

HAMMOU, F. B.; SKALI, S. N.; IDAOMAR, M.; ABRINI, J. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (8), p. 1190-1195, 2010.

HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Developments in nisin research. *Food Res. Int.*, v. 25, n. 1, p. 57-66, 1992.

HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, p. 192-199, 2011.

HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. P.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. The diversity of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan M (eds), New York: Springer Inc. *Evolution and ecology of bacteriocins*, p. 45-92, 2007.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. LWW; Ninth edition. 1994.

HU, Y.; LIU, X.; SHAN, C.; XIA, X.; WANG, Y.; DONG, M.; ZHOU, J. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM₄ from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, v. 77, p. 290-297, 2017.

ISHIBASHI, N.; HIMENO, K.; FUJITA, K.; MASUDA, Y.; PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; WILAIPUN, P.; LEELAWATCHARAMAS, V.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Purification and Characterization of Multiple Bacteriocins and an Inducing Peptide Produced by *Enterococcus faecium* NKR-5-3 from Thai Fermented Fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 76, n. 5, p. 947-953, 2012.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; DE PAULA, A. T.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 6, n. 3-4, p. 141-156, 2014.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C. *Principles of Meat Science*. 3 ed. Published by Kendall/Hunt Publishing Co., 1989, 351 p.

JUODEIKIENE, G.; BARTKIENE, E.; VISKELIS, P.; URBONAVICIENE, D.; EIDUKONYTE, D.; BOBINAS, C. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In: Petre M, editor. *Advances in applied biotechnology*. Intech, Croatia. pp. 63-100, 2012.

KALSCHNE, D. L.; GEITENES, S.; VEIT, M. R.; SARMENTO, C. M. P.; COLLA, E. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. *Meat Science*, v. 98, p. 744-752, 2014.

KATEETE, D. P., KIMANI, C. N., KATABAZI, F. A., OKENG, A., OKEE, M. S., NANTEZA, A., JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 9, n. 23, 2010.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, 255-262, 2003.

KERRY, J.; O'GRADY, M.; HOGAN, S. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, v. 74, p. 113-130, 2006.

KINGCHA, Y.; TOSUKHOWONG, A.; ZENDO, T.; ROYTRAKUL, S.; LUXANANIL, P.; CHAREONPORN SOOK, K.; VALYASEVI, R.; SONOMOTO, K.; VISESSANGUAN, W. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*, v. 25, p. 190-196, 2012.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. *FEMS Microbiological Review*, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-86, 1993.

KRISTO, E.; KOUTSOUMANIS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 373-386, 2008.

KUMAR, M., SRIVASTAVA, S. Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162, 698–706. 2010.

KUORWEL, K. K.; CRAN, M. J.; SONNEVELD, K.; MILTZ, J.; BIGGER, S. W. Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Science*, v. 76, n. 3, R90–R102, 2011.

KYUNGWHA, L.; AZLIN, M. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. *Food Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 89-94, 2007.

LA STORIA, A.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F.; ERCOLINI, D. Coating-activation and antimicrobial efficacy of different polyethylene films with a nisin-based solution. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 2770-2779, 2013.

LEE, C. H.; AN, D. S.; PARK, H. J.; LEE, D. S. Wide-spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Package Technology Science*, v. 16, p. 99-106, 2003.

LEE, H.; KIM, H. Y. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21 (3), p. 229-235, 2011.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, n. 13, p. 145–150, 1991.

LIU, W.; PANG, H.; ZHANG, H.; CAI, Y. Biodiversity of lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria*; ZHANG, Y., CAI, Y., Eds.; Springer Science + Business Media: Dordrecht, The Netherlands, 2014.

LV, X.; MA, H.; SUN, M.; LIN, Y.; BAI, F.; LI, J.; ZHANG, B. A novel bacteriocin DY4-2 produced by *Lactobacillus plantarum* from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of *Pseudomonas fluorescens* in fresh turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food Control*, v. 89, p. 22-31, 2018.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D.; PRAJAPATI, J. B. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

MADRUGA, M. S.; SOUSA, W. H. de; MENDES, E. M. de S.; BRITO, E. A. de. Carnes caprina e ovina: Processamento e fabricação de produtos derivados. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v. 1, 2007.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal Bacteriology*, v. 189, p. 1199-1208, 2007.

MARAGKOUDAKIS, P. A.; MOUNTZOURIS, K. C.; PSYRRAS, D.; CREMONESE, S.; FISCHER, J.; CANTOR, M. D.; TSAKALIDOU, E. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 130, p. 219-226, 2009.

MARCOS, B.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, p. 152-158, 2007.

MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras-MG. *Ciência Agrotécnica*, v. 30, 2006.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at smallscale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, v. 74, n. 5, p. 812-815, 2011.

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

MATTILA, K.; SARIS, P.; TYOPPONEN, S. Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausages after treatment with pediocin AcH. *International Journal of Food Microbiology*, v. 89, p. 281-286, 2003.

MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Bacteriocins in plastics. In J. M. Lagar on, M. J. O. Zapata, & A. Lopez-Rubio (Eds.), *Antimicrobial polymers* (1st ed.). (p. 117-158). John Wiley & Sons, Inc. 2012.

MING, X.; WEBER, G. H.; AYRES, J. W.; SANDINE, W. E. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, v. 62, p. 413-415, 1997.

MIRHOSSEINI, M.; NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; TAVASSOLI, M. Characterisation of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin from *Enterococcus faecium* strains isolated from dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, Huntingdon, v. 63, p. 55-61, 2010.

MORACANIN, S. V.; TURUBATOVIC, L.; SKRINJAR, M.; OBRADOVIC, D. Antilisterial Activity of Bacteriocin Isolated from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* IMAU:10231 in the Production of Sremska Sausages: Lactic Acid Bacteria Isolation, Bacteriocin Identification and Meat Application Experiments. *Food Technology and Biotechnology*. v. 51, n. 2, p. 247-256, 2013.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potencial. *LWT. Food Science and Technology*, v. 43, p. 1320-1324, 2010.

MORENO, I.; MARASCA, E. T. G.; SÁ, P. B. Z. R. de; MOITINHO, J. S.; MARQUEZINI, M. G.; ALVES, M. R. C.; BROMBERG, R. Evaluation of Probiotic Potential of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Meat Products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 10, p. 762-774, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity tests. *Journal of Immunology Methods*. 65, 55–63. 1983.

MÜLLER, D. M.; CARRASCO, M. S.; TONARELLI, G. G.; SIMONETTA, A. C. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* Ip 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2031-2040, 2009.

MURUA, A.; TODOROV, S. D.; VIEIRA, A. D. S.; MARTINEZ, R. C. R.; CENCIĆ, A.; FRANCO, B. D. G. M. Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 6, p. 1793–1809, 2013.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocins in food: a review. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 11, p. 120-127, 2008.

NASSU, R. T.; BESERRA, F. J.; GONÇALVES, L. A. G. Processo Agroindustrial: Obtenção de Embutido Fermentado Tipo Salame de Carne de Caprinos. Fortaleza, CE: Embrapa, Comunicado Técnico, v. 74, 2002.

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

NES, I. F.; EIJSINK, V. G. H. Regulation of group II peptide bacteriocina synthesis by quorum-sensing mechanisms. In G. M. Dunny, & S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signalling in bacteria* (p. 175-192). American Society for Microbiology. 1999.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. D. C.; SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, Á. J.; DE LA TORRE, A. H. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, v. 21, p. 679-685, 2010.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

OLIVEIRA, C. P.; JÚNIOR, J. P. S.; SILVA, J. A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

OSMANAGAOGLU, O.; KIRAN, F.; ATAOGU, H. Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 2, p. 162-174, 2010.

OSÓRIO, J. C. da S.; OSÓRIO, M. T. M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38(Suppl. 1), p. 292–300, 2009.

ÖZDEMİR, G. B.; ORYASIN, E.; BIYIK, H. H.; ÖZTEBER, M.; BOZDOGAN, B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 182-187, 2011.

O'SHEA, E. F.; GARDINER, G. E.; O'CONNOR, P. M.; MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Characterization of enterocin- and salivaricin-producing lactic acid bacteria from the mammalian gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, v. 291(1), p. 24-34, 2009.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU, S. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*. 8 (3). 2009.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Effects of the presence of the curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, on bacteriocin production by *Weissella paramesenteroides* DX grown in meat simulation medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 53, p. 1-5, 2013.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 3, p. 521–542, 2007.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*, 26(3), 278–282, 2009.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (lab): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13 (Suppl 1):S3, 2014.

PINHEIRO, R. S. B.; SOBRINHO, A. G. DA S.; YAMAMOTO, S. M.; BARBOSA, J. C. Composição tecidual dos cortes da carcaça de ovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, 2007.

POTTER, M. A.; CUNLIFFE, N. A.; SMITH, M.; MILES, R. S.; FLAPAN, A. D.; DUNLOP, M. G. A prospective controlled study of the association of *Streptococcus bovis* with colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, v. 51(6), p.473–474, 1998.

PRUDÊNCIO, C. V.; DOS SANTOS, M. T.; VANETTI, M. C. D. Strategies for the use of bacteriocins in gram-negative bacteria: Relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, p. 5408-5417, 2015.

REALINI, C.E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Science*, v. 98, p. 404-419, 2014.

REFFUVEILLE, F.; LENEVEU, C.; CHEVALIER, S.; AUFFRAY, Y.; RINCÉ, A.: Lipoproteins of *Enterococcus faecalis*: bioinformatic identification, expression analysis and relation to virulence. *Microbiology*, v. 157, n. 11, p. 3001-3013, 2011.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

RIBEIRO, S. C.; COELHO, M. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*. v. 116, n. 3, p. 573–585, 2014.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; MELO, N. R. de; SANCHES-SILVA, A. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 61, p. 132–140. 2017.

RILEY, M. A. Bacteriocin mediated competitive interactions of bacterial populations and communities. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. (Eds.). *Prokaryotic antimicrobial peptides*. London: Springer, p. 13-26, 2011.

RIVAS, F. P; CASTRO, M. P.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.; CAMPOS, C. A. Sakacin Q produced by *Lactobacillus curvatus* ACU-1: Functionality characterization and antilisterial activity on cooked meat surface. *Meat Science*, v. 97, p. 475-479, 2014.

ROGERS, L. A. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, v. 16, n. 2, p. 321-325, 1928.

ROSS, R. P.; GALVIN M.; MCAULIFFE, O.; MORGAN, S. M.; RYAN, M. P.; TWOMEY D. P.; MEANEY, W. J.; HILL, C. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Leeuwenhoek*, Dordrecht. v. 76. 1999.

SABIA, C.; MESSI, P.; NIEDERHÄUSERN, S.; MANICARDI, G.; BONDI, M. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus faecalis*. *Letters Applied in Microbiology*, v. 38 (2), p. 99-105, 2004.

SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews*, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 227-235, 2008.

SANT'ANNA, V.; QUADROS, D. A.; MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1163-1167, 2013.

SANTIAGO-SILVA, P.; SOARES, N. F.; NÓBREGA, J. E.; JÚNIOR, M. A.; BARBOSA, K. B.; VOLP, A. C. P.; ZERDAS, E. R.; WÜRLITZER, N. J. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, v. 20, p. 85-89, 2009.

SARMAH, A. K., MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–759, 2006.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 678-683, 2006.

SIVAKUMAR, N.; RAJAMANI; SAIF, A-B. Partial Characterization of Bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 5, p. 1177-1184, 2010.

SMAOUI, S.; ELLEUCH, L.; BEN SALAH, R.; NAJAH, S.; CHAKCHOUK-MTIBAA, A.; SELLEM, I.; BESBES, S.; MELLOULI, L. Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast. *Food Additives & Contaminants*, v. 31, n. 2, p. 218-225, 2014.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 329-343, 2008.

SORIA, M. C.; AUDISIO, M. C. Inhibition of *Bacillus cereus* Strains by Antimicrobial Metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, p. 1–24, 2014.

SWETWIWATHANA, A.; LOTONG, N.; NAKAYAMA, J.; SONOMOTO, K. Maturation of Nham — A Thai fermented meat product: Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation. *Fleischwirtschaft International*, v. 22, n. 3, p. 46-49, 2007.

SWETWIWATHANA, A.; VISESSANGUAN, W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Science*, v. 109, p. 101-105, 2015.

SZABÓOVÁ, R.; LAUKOVÁ, A.; SIMONOVÁ, M. P.; STROMPFOVÁ, V.; CHRASTINOVÁ, L. Bacteriocin-Producing Enterococci from Rabbit Meat. *Malaysian Journal of Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 211-218, 2012.

TERRA, N. N. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. Editora Unisinos, São Leopoldo-RS, 2003.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O'DONNELL C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 5987-6000, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 7, p. 323-329, 2004.

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.; VAZ-VELHO, M.; FRANCO, B. D. G. M.; HOLZAPFEL, W. H. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from *salpicão*, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 111-121, 2013.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M. L. Quorum sensing: Fact, fiction and everything in between. *Advances in Applied Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 191 –234, 2007.

VALENZUELA, A. S.; BENOMAR, N.; ABRIQUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*, v. 27, p. 955-961, 2010.

VAN HEEL, A. J., MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. v. 7, p. 675–680, 2011.

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*, 84, 1131–1137, 1998.

VAUCHER, R. A.; TEIXEIRA, M. L.; BRANDELLI, A. Investigation of the cytotoxicity of antimicrobial peptide P40 on eukaryotic cells. *Current Microbiology*, v. 60, p.1-5, 2010.

VIGNOLO, G.; SAAVEDRA, L.; SESMA, F.; RAYA, R. R. Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. In R. BHAT; A. K. ALIAS; G. PALIYATH (Eds.), *Progress in food preservation* (p. 453-483). Ames, Iowa, USA: Willey-Blackwell. 2012.

VIJAYAKUMAR, P. P.; MURIANA, P. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats using bacteriocin mixtures based on mode-of-action. *Foods*, v. 6:22, 2017.

VITOLA, H. R. S; DANNENBERG, G. da S.; MARQUES, J. de L.; LOPES, G. V.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, A. M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*. 2018.

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

WORAPRAYOTE, W.; PUMPUANG, L.; TOSUKHOWONG, A.; ROYTRAKUL, S.; PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control*, v. 55, p. 176-184, 2015.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. v. 120, p. 118-132, 2016.

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

YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, v. 25, p. 260-268, 2008.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. *Asia-Pacific Chemical Biological and Environmental Engineering Society*, Hong Kong, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZHANG, J.; LIU, G.; LI, P.; QU, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control*, v. 21, p. 198-202, 2010.

ZHANG, H.; LIU, L.; HAO, Y.; ZHONG, S.; LIU, H.; HAN, T.; XIE, Y. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiology and Immunology*, v. 57, p. 746-755, 2013.