

FÁBIO DE OLIVEIRA FELIPE

**EFEITO DE NISINA SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Serratia liquefaciens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F315e Felipe, Fábio de Oliveira, 1987-  
2016 Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica de *Serratia  
liquefaciens* / Fábio de Oliveira Felipe. – Viçosa, MG, 2016.  
xiii, 38f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.30-38.

1. Nisina. 2. *Serratia liquefaciens*. 3. Enzimas proteolíticas.  
4. Bacteriocinas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 579.3

FÁBIO DE OLIVEIRA FELIPE

**EFEITO DE NISINA SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Serratia liquefaciens***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de setembro de 2016.



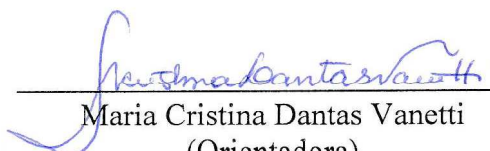
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Cláudia Vieira Prudêncio  
(Coorientadora)



François Baglinière  
(Coorientador)



Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

*“Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam” (I Coríntios, 2:9).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela Sua infinita bondade e amor. Tudo que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem dEle. Agradeço pela força, por sua presença e por me permitir chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe, por todo amor e incentivo em todas as etapas da minha vida e por me orientar e apoiar as minhas decisões.

Aos meus familiares, pela torcida nesta caminhada.

À Gleice, pelo amor, companheirismo e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela infraestrutura para realização dos experimentos e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, por me receber no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelos ensinamentos e orientação, pela excelente convivência, pelos momentos de descontração, profissionalismo e atenção.

Aos doutores François e Cláudia, pelas orientações, amizades e conselhos, sejam em reuniões formais ou no cafezinho.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela oportunidade de conhecer a pesquisa em microbiologia.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que de alguma maneira contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Geral, em especial a professora Karla, que sempre me incentivou.

À doutora Solimar Machado, pela ajuda e pelos “isolados”.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Cleonice, Cleriane, Érika, Deisy, Felipe, Gabriel, Leandro, Leonardo, Manuela e Mayara, pelos momentos agradáveis, tornando o dia a dia mais descontraído e prazeroso, além de sempre se disponibilizarem para ajudar, em especial, à Jéssika pelo preciosíssimo auxílio e parceria nos experimentos.

Ao Andrés e à Amanda Meira, pela amizade e parceria.

Ao Alan, Aneli, Marcílio e Thamar, pela amizade e companheirismo nas disciplinas e na vida, pelos risos e gargalhadas, pelo choro, pelos lamentos, pelos divertidos e difíceis momentos.

A todos os meus amigos da graduação e de outras etapas da vida, que sempre estiveram comigo e por fazerem parte da minha vida.

Ao pessoal do Petróleo e do BioAgro, especialmente ao Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, que me acolheu calorosamente nos meses iniciais deste curso, e ao Laboratório de Micorrizas pela amizade e por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos do Laboratório de Anaeróbios, pela amizade, pelas experiências e pela ajuda no decorrer deste curso, sempre dispostos a dividir os equipamentos e laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia e do BioAgro, especialmente a Raquel, Leticia, Sandra, Sr. Cesário, José Carlos e Emília.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para o andamento deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

FÁBIO DE OLIVEIRA FELIPE, brasileiro, filho de Antônio Pedro Felipe e Julia Raimunda de Oliveira, nasceu em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, em janeiro de 1987.

Em março de 2009 iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em março de 2014.

Em agosto de 2014 ingressou como discente de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Microbiologia de Alimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
<b>2.1 Bactérias psicrotróficas contaminantes do leite cru.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 <i>Serratia liquefaciens</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Uso de bacteriocinas em alimentos.....</b>	<b>6</b>
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
<b>3.1 Micro-organismos e condições de manutenção dos estoques.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Atividade proteolítica de <i>S. liquefaciens</i> em diferentes meios de cultivo.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Atividade proteolítica de <i>S. liquefaciens</i> sob diferentes temperaturas.....</b>	<b>12</b>
<b>3.4 Ensaio da atividade proteolítica.....</b>	<b>12</b>
<b>3.5 Efeito de nisina sobre o crescimento e a atividade proteolítica total e de Ser2 de <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>3.6 Avaliação do efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular.....</b>	<b>14</b>
4. RESULTADOS.....	15
<b>4.1 Influência dos meios de cultura sobre e atividade proteolítica de <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Atividade proteolítica de 17 isolados de <i>S. liquefaciens</i> em diferentes temperaturas.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular de <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>23</b>

5. DISCUSSÃO.....	24
<b>5.1 Influência dos meios de cultura sobre o número de células viáveis e atividade proteolítica de <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Viabilidade e atividade proteolítica de 17 isolados de <i>S. liquefaciens</i> em diferentes temperaturas.....</b>	<b>25</b>
<b>5.3 Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica total e de Ser2 de <i>S. liquefaciens</i>.....</b>	<b>26</b>
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de células viáveis e atividade proteolítica total de *S. liquefaciens* L53 e L153 em diferentes meios de cultivo a 30 °C, sob agitação de 150 RPM por 24 h.

Figura 2 - Número de células viáveis e atividade proteolítica total e de Ser2 de 17 isolados de *S. liquefaciens*, a 7 °C, sob agitação de 150 RPM por 48h.

Figura 3 - Número de células viáveis e atividade proteolítica total e de Ser2 de 17 isolados de *S. liquefaciens*, a 30 °C, sob agitação de 150 RPM por 24h.

Figura 4 - Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica total e de Ser2 de *S. liquefaciens* L53, L95 e L98 a 7 °C, sob agitação de 150 RPM por até 68 h.

Figura 5 - Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica total e de Ser2 de *S. liquefaciens* L53, L95 e L98 a 30 °C, sob agitação de 150 RPM por 24 h.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>S. liquefaciens</i> produtores de proteases termorresistentes.....	22
Tabela 2 - Porcentagem da atividade proteolítica de Ser2 a 7 °C e a 30 °C.....	32

## RESUMO

FELIPE, Fábio de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2016. **Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica de *Serratia liquefaciens***. Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientador: François Baglinière.

A desestabilização, a diminuição do rendimento, da qualidade sensorial e da vida útil de produtos lácteos processados durante a estocagem são problemas associados principalmente, à atividade de proteases resistentes a altas temperaturas, muitas dessas de origem bacteriana. Em busca do aumento do tempo de prateleira dos produtos alimentares, antimicrobianos naturais, como as bacteriocinas, são uma importante alternativa. Nisina é uma bacteriocina geralmente reconhecida como segura (GRAS) e de reconhecida efetividade para inibir o crescimento de bactérias envolvidas em doenças de origem alimentar e bactérias deterioradoras de alimentos. No intuito de ampliar o uso de nisina, objetivou-se avaliar o seu efeito sobre a atividade proteolítica de isolados de *Serratia liquefaciens*, uma das bactérias prevalentes em amostras de leite cru. Esta bactéria produz dois tipos de metaloproteases, Ser1, termossensível e Ser2, termorresistente. Inicialmente, foi avaliada a influência dos meios de cultura sobre a atividade proteolítica total de dois isolados de *S. liquefaciens* e, na presença de cálcio, a atividade proteolítica foi aumentada. Na avaliação da atividade proteolítica total e de Ser2 de *S. liquefaciens* em duas temperaturas, em que 17 isolados foram avaliados, apenas cinco foram proteolíticos a 7 °C, enquanto 12 o foram a 30 °C. Esta diferença pode ser atribuída ao tempo de incubação nas temperaturas avaliadas. Os isolados L53, L95 e L98 foram selecionados para a comparação da atividade proteolítica de Ser1 e Ser2 e, principalmente, para avaliação do efeito de nisina sobre a atividade proteolítica de *S. liquefaciens*. Constatou-se que a proteólise detectada ao final da fase exponencial de crescimento é causada, essencialmente, por Ser2, enquanto a atividade de Ser1 é maior na fase estacionária. Nisina não afetou o crescimento dos isolados de *S. liquefaciens* L53, L95 e L98, sob temperatura ótima, enquanto que, sob refrigeração, houve redução no crescimento dos isolados L53 e L95. A 7 °C e a 30 °C, a presença de nisina reduziu, significativamente, a atividade proteolítica de *S. liquefaciens*, sendo

mais eficiente na redução da proteólise causada por Ser2. A redução da atividade proteolítica de Ser2 de *S. liquefaciens* na presença de nisina sugere que o uso de bacteriocinas pode ser uma estratégia a ser explorada para a melhoria da qualidade de leite e dos produtos lácteos, considerando que proteases termorresistentes representam grande problema na indústria do leite.

## ABSTRACT

FELIPE, Fábio de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2016. **Effect of nisin on proteolytic activity of *Serratia liquefaciens***. Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-adviser: François Baglinière.

The destabilization, reduction in yield, sensory quality and shelf-life of processed dairy products during storage has been associated with the proteolytic activity resistant to high temperature, mainly of bacterial origin. In the search for alternatives to increase the shelf-life of food products, the addition of bacteriocins, which are natural antimicrobials, appear as important option. The bacteriocin nisin is generally recognized as safe (GRAS) and studies have shown its effectiveness to inhibit growth of both bacteria involved in food-borne diseases and spoilage of foods. In order to get new applications of nisin, this study aimed to evaluate its effect on the proteolytic activity of strains of *Serratia liquefaciens*, one of the prevalent bacteria in raw milk samples. This bacterium produces two types of metalloproteases, Ser1, heat-sensitive and Ser2, heat-resistant. The study of the composition of the culture media on proteolytic activity of 2 strains of *S. liquefaciens* was evaluated, and in the presence of calcium the proteolytic activity was significantly increased. The assessment of the total proteolytic activity and Ser2 of 17 strains of *S. liquefaciens* at two temperatures showed that only 5 were proteolytic at 7 °C, while 12 were proteolytic at 30 °C. This difference can be due to incubation times different. Because of their high proteolytic activities at both temperature, the strains L53, L95 and L98 were chosen to assess the effect of nisin on proteolytic activity of Ser1 and Ser2 and, especially, for the evaluation the effect of nisin on the proteolytic activity of *S. liquefaciens*. The quantification of proteolytic activity during the growth showed that there is a difference in time of secretion of the proteases of *S. liquefaciens*. Ser2 is mainly secreted during the exponential phase of growth while Ser1 is mainly secreted during the stationary phase. Relating to the effect of nisin, this bacteriocin did not affect the growth of *S. liquefaciens* at 30 °C. However, under refrigeration, a weak reduction in the growth of the strains L53 and L95 was observed. In the contrary, at both temperatures, the presence of nisin reduced

significantly the proteolytic activity of the three strains. Nisin seems to be more efficient in reducing the proteolysis caused by Ser2. The reduction of proteolytic activity of Ser2 of *S. liquefaciens* in the presence of nisin, suggests that the use of bacteriocins can be a strategy to be exploited for maintaining the quality of milk and dairy products, since heat resistant proteases represent a great problem in the dairy industry.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica do leite cru e de seus derivados está fortemente relacionada com a contaminação inicial por micro-organismos e com a temperatura de estocagem. A temperatura de refrigeração utilizada para armazenamento do leite cru traz grande benefício à qualidade do leite, uma vez que reduz, significativamente, a população de micro-organismos mesófilos que acidificam o produto. Porém, seletivamente, micro-organismos psicotróficos que podem crescer em temperaturas de 7 °C ou inferior, se multiplicam e passam a dominar este ambiente.

A microbiota psicotrófica gram-negativa tem sido destacada como grande problema para a indústria de laticínios, pois é capaz de deteriorar estes produtos em razão da produção de proteases extracelulares resistentes ao tratamento em temperatura ultra elevada (*Ultra High Temperature* – UHT). Os tratamentos térmicos como UHT e a pasteurização promovem a inativação destes micro-organismos, mas a permanência de proteases que hidrolisam a caseína diminui o rendimento, a qualidade sensorial e a vida útil de produtos lácteos processados durante a estocagem, já que a hidrólise da caseína pode desencadear um sabor amargo, além da gelificação e da coagulação do leite.

O gênero *Pseudomonas* é o mais frequentemente encontrado dentre as bactérias produtoras de enzimas proteolíticas em amostras de leite cru. Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que bactérias do gênero *Serratia* possuem alto potencial deteriorador e já foram isoladas de amostras de leite cru estocadas sob refrigeração, corroborando sua importância e predominância neste ambiente em condições de baixa temperatura. Embora haja vários estudos que relatam proteases de outras espécies de *Serratia*, existem poucos relatos sobre as proteases de *S. liquefaciens*, que produz dois tipos de metaloproteases, uma termossensível e outra termorresistente.

Nisina é uma bacteriocina com função antimicrobiana empregada como bioconservante em queijos pasteurizados e processados e seu mecanismo de ação,

demonstrado principalmente contra bactérias gram-positivas, se caracteriza pela inibição da síntese da parede celular, além de formar poros na membrana citoplasmática, o que favorece o efluxo de metabólitos da célula. A ação desses peptídeos é limitada sobre bactérias gram-negativas, pois a membrana externa, composta por uma bicamada de fosfolípidos e lipopolissacarídeos, atua como uma barreira. Este obstáculo é uma valiosa ferramenta fisiológica, uma vez que impede a entrada de macromoléculas, como bacteriocinas.

Bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas, como nisina, têm atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias do mesmo grupo. Os relatos da ação de nisina sobre bactérias gram-negativas são relacionados à sua combinação com fatores ambientais, como temperatura, alta pressão e variações do pH ou associada a agentes químicos, como o ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) que desestabilizam a membrana externa e facilitam a passagem de nisina até a membrana plasmática, seu sítio de ação. Em estudos prévios do nosso laboratório foi demonstrado que em baixa temperatura, nisina reduziu o número de células viáveis de *Salmonella*. Como vários estudos têm relatado a deterioração em leite causada por psicrotóxicos nestas condições de baixa temperatura, objetivou-se avaliar o efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica de *S. liquefaciens*. Além disso, foi avaliado o efeito de diferentes meios de cultura, suplementados com cálcio e leite desnatado e o efeito da temperatura na atividade proteolítica de *S. liquefaciens*.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Bactérias psicotróficas contaminantes do leite cru**

Uma grande variedade de bactérias pode crescer e reduzir a qualidade final de produtos alimentares, resultando em contaminações microbianas inaceitáveis ou em deterioração causada pela atividade de enzimas produzidas pelas mesmas (TEH, 2011). Esta gama de micro-organismos está associada com a matéria prima, a manipulação e o processamento, além dos micro-organismos que resistem ao processamento e a estocagem do produto. Desse modo, por ser um processo complexo, a deterioração de alimentos causa perdas excessivas, mesmo quando modernas técnicas de conservação são utilizadas (GRAM, 2002; PINTO et al., 2006).

O leite cru oferece condições ideais para o crescimento de muitos micro-organismos, principalmente pela riqueza de nutrientes e pH neutro (VON NEUBECK, 2015). A microbiota que chega neste ambiente é oriunda de diversas fontes, como equipamentos de ordenha, alimentos, ar, solo, água, fezes e grama (COOREVITS et al., 2008; LEJEUNE e RAJALA-SCHULTZ, 2009).

Desde a adoção de práticas de resfriamento reduziram-se as perdas do leite cru, e houve uma substancial melhora da qualidade deste produto (BRASIL, 2011). No Brasil, a partir de 2001, por meio da Instrução Normativa (IN) nº 51, que trata dos regulamentos técnicos para a produção, a identidade e a qualidade do leite, foram estabelecidas novas exigências para o leite cru como a imediata refrigeração após a ordenha e a coleta realizada em caminhões com tanques isotérmicos (BRASIL, 2002). Além disso, na IN nº 62/2011 ficou instituída a temperatura máxima de 7 °C para a conservação do leite cru na propriedade rural (BRASIL, 2011). Com isso, a acidificação do leite cru causada, principalmente, por bactérias ácido-láticas e, ou outras bactérias mesofílicas foi quase completamente interrompida (SAMARŽIJA, 2012). Como, em geral, o leite não é processado imediatamente após a ordenha, podendo ficar armazenado e em transporte por até quatro dias (PERIN et al., 2012),

mudanças na comunidade microbiana vão ocorrer (RASOLOFO et al., 2010; RAATS et al., 2011; VON NEUBECK et al., 2015).

Embora o armazenamento em baixa temperatura minimize a população de mesófilos, esta condição não impede o crescimento de outro grupo de micro-organismos, o de bactérias psicotróficas, selecionadas por este ambiente. Esta microbiota é capaz de crescer em temperaturas de 7 °C ou inferior (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; PINTO et al., 2006; HANTIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007) e representa apenas 10 % da contagem total de mesófilos aeróbios imediatamente após a ordenha realizada sob condições higiênicas, mas pode chegar a cerca de 90 % após a estocagem em baixa temperatura (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; CATANIO et al., 2012).

Bactérias psicotróficas são micro-organismos frequentemente encontrados no leite e em seus derivados. Algumas espécies são capazes de deteriorá-los em razão da capacidade de produzir enzimas resistentes ao tratamento em temperatura de pasteurização e ultra elevada (*Ultra High Temperature* – UHT) na indústria de laticínios (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; BAGLINIÈRE et al. 2013; BAUR et al., 2015; PINTO et al., 2015). Embora durante o processo de pasteurização e tratamento UHT ocorra a inativação da maioria das bactérias no leite cru (TEH et al., 2011), a permanência de proteases que hidrolisam a caseína, diminui o rendimento, a qualidade sensorial e a vida útil de produtos lácteos processados durante a estocagem. Além da gelificação e da coagulação do leite, a hidrólise da caseína pode desencadear um sabor amargo (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; DOGAN e BOOR, 2003; BAGLINIÈRE et al., 2012).

Na literatura há um consenso sobre o fato de que *Pseudomonas* é o gênero predominante relacionado à deterioração do leite cru refrigerado, e destaque dentre as bactérias produtoras de enzimas proteolíticas em amostras de leite cru (DOGAN e BOOR, 2003; MARCHAND et al., 2009; RAATS et al., 2011; BAUR et al., 2015). No entanto, outros gêneros de bactérias deterioradoras têm sido descritos mais recentemente e, bactérias do gênero *Serratia* são importantes neste ambiente, pela detecção e predominância em amostras de leite cru durante a estocagem em condições de baixa temperatura, como em tanques de caminhões para transporte, além da capacidade de formar biofilmes (TEH et al., 2011; DECIMO et al., 2014; MACHADO et al., 2015) e de produzir proteases termorresistentes (MACHADO et al., 2015).

Baglinière et al. (dados não publicados) ressaltaram o impacto das proteases termorresistentes de estirpes de *S. liquefaciens* isoladas de leite cru em leite UHT durante o tempo de prateleira. *S. liquefaciens* destaca-se como uma das bactérias psicrotróficas mais prevalentes capazes de produzir enzimas proteolíticas termoresistentes. Assim, este gênero deve ser considerado como uma alternativa para desenvolvimento de métodos de monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado (MACHADO et al., 2015).

## **2.2 *Serratia liquefaciens***

Bactérias do gênero *Serratia* são gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae e estão amplamente distribuídas no ambiente. Já foram isoladas de animais pequenos, como roedores, além de solos, plantas, peixes, água e humanos (GRIMONT e GRIMONT, 2006). Este gênero é conhecido por secretar enzimas hidrolíticas, como nucleases, lipases, proteases e quitinases no meio de crescimento (GIVSKOV et al., 1988). Quando cresce em meio de cultura líquido, a produção destas enzimas extracelulares são dependentes da fase de crescimento com forte aumento na transição entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária (GIVSKOV et al., 1997).

A vasta distribuição deste gênero permite que essas bactérias sejam detectadas, inclusive, em unidades de processamento de leite, em que se destacam pela alta capacidade de adesão e por formarem biofilmes com matriz abundante (CLETO et al., 2012). Decimo et al. (2014) relataram que, dentre as Enterobacteriaceae, *Serratia marcescens* foi a mais frequentemente encontrada em amostras de leite não processado.

Como a maioria das espécies de *Serratia*, *S. liquefaciens* secreta amplo espectro de enzimas hidrolíticas (HINES et al., 1988; GIVSKOV et al., 1997). Algumas destas enzimas podem estar sob regulação da densidade populacional. O sistema de regulação por *quorum-sensing*, amplamente usado por bactérias gram-negativas por meio de sinais de comunicação difusíveis que permite a bactéria perceber e expressar genes alvos em relação a densidade da cultura, já foi verificado em *S. liquefaciens* por Givskov et al. (1996). Esses autores identificaram duas moléculas sinais N-butanoil-L-homoserina lactona (BHL) e N-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL) no sobrenadante de células livres de *S. liquefaciens* que

têm a síntese direcionada pelo gene *swrl*. Ao obterem um mutante deste gene relacionado à motilidade, perceberam que a atividade proteolítica extracelular foi reduzida comparada ao tipo selvagem. Ainda ressaltaram que duas enzimas proteolíticas foram reguladas negativamente no mutante de *S. liquefaciens*.

A espécie *S. liquefaciens* também foi relatada em leite cru (PINTO et al., 2015). Outros autores têm descrito a presença de *S. liquefaciens* como a espécie mais abundante encontrada em leite (TORNADIJO et al., 1993; MACHADO et al., 2015) e queijo (MARTIN-PLATERO et al., 2009). Wolf et al. (1991) relataram que 72 de 80 isolados de *S. liquefaciens* foram capazes de hidrolisar a caseína em ágar contendo leite desnatado.

Embora haja estudos que relatam proteases de outras espécies de *Serratia*, existem poucos dados sobre as proteases de *S. liquefaciens*, como o trabalho de Kaibara et al. (2012), no qual foi demonstrado que *S. liquefaciens* FK01 produz dois tipos de metaloproteases, Ser1 e Ser2. Ser1 é termossensível e, portanto, Ser2 a protease termorresistente, é responsável pela atividade proteolítica residual após tratamento térmico (MACHADO et al., 2016).

Machado et al. (2016) analisaram o potencial proteolítico deteriorador de *S. liquefaciens* no leite após o tratamento térmico e demonstraram que a metaloprotease secretada, de 52 kDa é codificada pelo gene *ser2* e é similar a metaloprotease codificada por *aprX* em *Pseudomonas*. Além de pertencerem à família das serralisinas, nas sequências de proteínas deduzidas do gene *ser2* foram detectados motivos de ligação para  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e do exportador ABC (KAIBARA et al., 2012; MACHADO et al., 2016). Além disso, o gene *ser2* foi encontrado em 17 isolados de *S. liquefaciens* testados (MACHADO et al., 2016).

### **2.3 Uso de bacteriocinas em alimentos**

Tem sido cada vez mais frequente a demanda de consumidores por alimentos naturais e minimamente processados, frescos, saborosos e seguros. Com isso, para assegurar as qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos sem reduzir a segurança alimentar, pesquisas tem desenvolvido novos produtos que possam substituir tratamentos térmicos e conservantes tradicionais (SOBRINO-LÓPEZ e MARÍN-BELLOSO, 2008). Algumas alternativas como campo elétrico pulsado de alta intensidade (HIPEF), alta pressão (HP) e adição de substâncias antimicrobianas

naturais tem sido utilizadas (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2013; BARBA et al., 2015; BOCKELMANN et al., 2017).

Há diversas substâncias com efeito antimicrobiano produzidas por animais, insetos, plantas, e bactérias, como peróxido de hidrogênio, ácidos graxos, etanol, ácidos orgânicos, antibióticos e bacteriocinas (YANG et al., 2014). As bacteriocinas são utilizadas como ferramenta biológica para, além de aumentar a segurança alimentar, minimizar a ocorrência de doenças relacionadas ao consumo de alimentos contaminados (DEEGAN et al., 2006). Sua utilização se destaca por serem consideradas substâncias naturais nos alimentos (ALLENDE et al., 2007). Além de não serem tóxicas contra células eucarióticas, podem ser digeridas por proteases, tendo assim, pouco ou nenhum efeito sobre a microbiota intestinal (WORAPRAYOTE et al., 2016).

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente, tanto por bactérias gram-positivas quanto por gram-negativas e possuem efeito bacteriostático ou bactericida sobre outras bactérias proximamente relacionadas. A escassez nutricional no ambiente é o que desencadeia a produção de uma grande variedade de bacteriocinas para competição por espaço e recursos (MEGHROUS et al., 1999; HÉCHARD e SAHL, 2002; YANG et al., 2014; WORAPRAYOTE et al., 2016). Comumente, estes peptídeos são resistentes ao aquecimento e a baixo pH, o que favorece sua aplicação industrial (MARTIN-VISSCHER et al., 2011).

Além do fato de serem degradados pelo sistema digestivo podendo servir como fonte de aminoácidos, existem várias outras razões pelas quais peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente são objetos de estudo tão atrativos. Outro motivo é o fato de que esses peptídeos são sintetizados por processos de transcrição e tradução, o que implica que sua sequência de aminoácidos e, com isso, suas propriedades e estruturas são prescritas por sequências gênicas. Isto permite que as estruturas dos peptídeos sejam manipuladas, e possibilita que poderosas ferramentas de engenharia genética possam ser usadas potencialmente para construir uma variedade ilimitada de análogos estruturais de peptídeos naturais (HANSEN e SANDINE, 1994).

Algumas das formas de utilização das bacteriocinas estão relacionadas à aplicação em animais, na medicina e em alimentos (YANG et al., 2014). Na utilização em alimentos, pode ocorrer a produção *in situ*, em que culturas produtoras de bacteriocinas são adicionadas diretamente ao alimento, ou utilização *ex situ*, em

que bacteriocinas são adicionadas na forma de concentrados purificados (DEEGAN et al., 2006). Os peptídeos produzidos por bactérias gram-positivas, como as ácido-láticas demonstram grande potencial para uso em alimentos para inibir o crescimento de bactérias envolvidas em doenças de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e de micro-organismos deterioradores, como *Alicyclobacillus acidoterrestris* e *Clostridium tyrobutiricum* (DEEGAN et al., 2006; ALLENDE et al., 2007; de CARVALHO et al., 2007; de CARVALHO et al., 2008; SOBRINO-LÓPEZ e MARÍN-BELLOSO, 2008; MARTIN-VISSCHER et al., 2011; PIMENTEL-FILHO et al., 2014; WORAPRAYOTE et al., 2015).

As bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas podem ser divididas em três classes principais, a dos lantibióticos (classe I), a classe II e classe III (BALCIUNAS et al., 2013; YANG et al., 2014). Os lantibióticos são peptídeos pequenos (<5kDa), modificados pós-tradução resultando na formação de peptídeos lineares ou globulares com lantionina,  $\beta$ -metil lantionina e aminoácidos desidratados. Exercem atividade antimicrobiana, principalmente, contra bactérias gram-positivas (ZACHAROF e LOVITT, 2012; BALCIUNAS et al., 2013; DISCHINGER et al., 2014; YANG et al., 2014). O principal representante dos lantibióticos é a nisina, reconhecida como segura (status GRAS – *Generally recognized as safe*) para aplicações em alimentos pela *Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization* (FAO/WHO) em mais de 50 países, incluindo o Brasil (ELLIOTT et al., 2012; BALCIUNAS et al., 2013; GYAWALI e IBRAHIN, 2014; ZHAO et al., 2016).

A nisina (234) é comercialmente utilizada como conservante biológico em diversos alimentos, como produtos lácteos processados, frutas, legumes, tapioca e carnes (DISCHINGER et al., 2014; LÓPEZ-CUELLAR, 2016). Além disso, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) autorizou o uso de nisina em produtos como cremes lácteos e pudins (EFSA, 2006). No Brasil, o uso de nisina é limitado a queijos (BRASIL, 1996) e requeijão (BRASIL, 1997).

A nisina age pela ligação a um precursor da parede celular, o lipídeo II, o que inibe a síntese da parede celular, além de formar poros na membrana citoplasmática, favorecendo o efluxo de metabólitos da célula (DISCHINGER et al., 2014; CAVERA et al., 2015), levando a perda ou dissipação do potencial de membrana bacteriano. A atividade antimicrobiana deste lantibiótico tem sido amplamente demonstrada contra bactérias gram-positivas (RILLA, 2003; PINTO et al., 2011;

WIJNKER et al., 2011; ABDOLLAHZADEH et al., 2014; ÁVILA et al., 2014; GADOTTI et al., 2014; PIMENTEL-FILHO et al., 2014; SADIQ et al., 2016; ZHAO et al., 2016; SHI et al., 2017).

Uma das maiores limitações da maioria das bacteriocinas de micro-organismos gram-positivos é a resistência natural dos micro-organismos gram-negativos e, por esta razão a atividade antimicrobiana de nisina tem sido menos demonstrada em bactérias gram-negativas do que em micro-organismos gram-positivos (DEEGAN et al., 2006; MARTIN-VISSCHER et al., 2011; ZACHAROF e LOVITT, 2012; GYAWALI e IBRAHIN, 2014; GABRIEL e ESTILO, 2015; PRUDÊNCIO et al., 2015; PRUDÊNCIO et al., 2016). Em vista disso, em várias pesquisas tem-se avaliado a ação combinada de nisina com fatores ambientais, como pH e temperatura, ou com agentes quelantes, como EDTA, a fim de aumentar a eficiência desta bacteriocina em bactérias gram-negativas (KHAN et al., 2015; PRUDÊNCIO et al., 2015a; PRUDÊNCIO et al., 2015b). A presença da membrana externa composta por uma bicamada de fosfolipídeos e por uma malha de lipídeos e polissacarídeos, chamada lipolissacarídeos, confere proteção a essas bactérias, pois age como barreira, que impede a difusão das moléculas da bacteriocina até a membrana plasmática, sendo esta a causa relacionada à resistência deste grupo de bactérias a estes peptídeos (GYAWALI e IBRAHIM, 2014).

Prudêncio et al. (2015a) demonstraram que, sob condições de baixo pH e baixa temperatura, nisina promoveu uma redução significativa na viabilidade de *Salmonella* Typhimurim. Considerando este resultado, pode-se propor que, bactérias gram-negativas, psicrotólicas produtoras de proteases termorresistentes que são grande problema na indústria de laticínios em condições de baixa temperatura poderiam estar sujeitas a mesma sensibilidade apresentada por *Salmonella*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

#### 3.1 Micro-organismos e condições de manutenção dos estoques

Dezessete isolados de *S. liquefaciens*, produtores de enzimas proteolíticas termorresistentes, provenientes de amostras de leite cru refrigerado isolados por Machado et al. (2015) foram avaliados (Tabela 1). As culturas foram mantidas congeladas em freezer, a -20 °C, em tubos de microcentrífuga contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) adicionado de 20 % de glicerol.

Os isolados de *S. liquefaciens* foram testados quanto ao número de células viáveis e atividade proteolítica total (Ser1 e Ser2) e de Ser2 a 7 °C e a 30 °C. Aqueles isolados que apresentaram maior atividade proteolítica total foram selecionados para avaliação do efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica total e de Ser2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 foi cultivado em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a  $37 \pm 1$  °C para determinação da atividade antimicrobiana de nisina, que foi avaliada pelo método de difusão em ágar (TAGG et al., 1976).

**Tabela 1** - Isolados psicrotróficos proteolíticos de *S. liquefaciens* utilizados no estudo e agrupados em diferentes *clusters* de *fingerprint\**.

Padrões de <i>Fingerprint*</i>	Isolados de <i>S. liquefaciens</i>
<i>Cluster 1 - S. liquefaciens</i>	L53, L61, L64, L95, L128, L130, L132 L135, L136, L137, L140, L146, L153
<i>Cluster 2 - S. liquefaciens</i>	L98
<i>Cluster 3 - Pseudomonas fluorescens</i>	L113
Não se encaixaram em nenhum <i>cluster</i>	L79, L104

\*Machado et al. (2015)

### 3.2 Atividade proteolítica de *S. liquefaciens* em diferentes meios de cultivo

Os isolados com alta e baixa atividade proteolítica de Ser2, respectivamente *S. liquefaciens* L53 e *S. liquefaciens* L153 em avaliação realizada por Machado et al. (2015), foram utilizados, inicialmente, para o estabelecimento das condições de produção de proteases. Ambos os isolados foram ativados em caldo Luria Bertani (LB), pH 6,8, por 24 h a 30 °C. Para se estabelecer condições de cultivo que favorecessem a atividade proteolítica, foram avaliados três diferentes meios de cultura: caldo LB (triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 1 %) (SANTOS et al., 2013), caldo TYEP (triptona 1 %, extrato de levedura 0,25 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 %) (PINTO et al., 2010) e caldo BHI (BAGLINIÈRE et al., 2012). Os três meios de cultivo também foram avaliados com duas suplementações: cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,25 % e leite desnatado reconstituído (LDR) 10 %.

O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 6,8, o pH do leite. Frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de cada meio de cultura foram inoculados com uma concentração inicial de, aproximadamente, 6 log do número de unidades formadoras de colônias (log<sub>10</sub> UFC/mL) e incubados por 24 h a 30 ± 1 °C, sob agitação em plataforma de agitação orbital - *shaker* (B-DCU B-Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany) a 150 RPM. Após 24 h de incubação, foram coletadas alíquotas para a determinação do número de células viáveis, pela técnica de microgotas (MORTON, 2001), com três réplicas, em ágar para contagem

padrão (PCA-Himedia, Índia). Amostras de 1 mL foram armazenadas congeladas a – 20 °C para a determinação da atividade proteolítica total. Cada ensaio foi repetido duas vezes e a análise estatística foi realizada por meio do programa Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009). O teste Tukey foi utilizado para determinar se existe diferença entre os tratamentos ao nível de significância de 0,05. A atividade da protease Ser2 não foi avaliada nesta etapa.

### **3.3 Atividade proteolítica de *S. liquefaciens* sob diferentes temperaturas**

Após a seleção do meio de cultura que favorecesse a atividade proteolítica, os isolados de *S. liquefaciens* listados na Tabela 1 foram previamente ativados e centrifugados a 5.590 *g* por 10 min (Hsiangtai MCD-2000, Taiwan), lavados e ressuspensos em solução salina (NaCl) 0,85 %. Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de BHI + LDR 10 % foram inoculados com uma concentração inicial de, aproximadamente, 6 log<sub>10</sub> UFC/mL e incubados a 7 °C e a 30 ± 1 °C, que correspondem, respectivamente, à temperatura recomendada para refrigeração de amostras de leite por imersão em fazendas (BRASIL, 2011) e à temperatura ótima de crescimento de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae. Os frascos foram agitados em agitador rotatório (Variomag Multipoint HP6, Alemanha) a 150 RPM.

O tempo selecionado para determinação da população bacteriana e coleta do sobrenadante destinado à quantificação da atividade proteolítica foi de 48 h sob cultivo a 7 °C e de 24 h para cultivo a 30 °C. As alíquotas destinadas à determinação do número de células viáveis foram plaqueadas utilizando-se a técnica de microgotas (MORTON, 2001), com três réplicas, em PCA (Himedia, Índia). Cada ensaio foi repetido duas vezes. A análise estatística foi realizada por meio do programa Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009). O teste Tukey foi utilizado para verificar a existência de diferença entre os tratamentos ao nível de significância de 0,05.

Nos sobrenadantes coletados em diferentes intervalos de tempo foram determinadas as atividades proteolíticas total e de Ser2, conforme descrito no item 3.4.

### **3.4 Ensaio da atividade proteolítica**

Todas as amostras coletadas para os ensaios de atividade proteolítica foram

centrifugadas a 5.590 g por 10 min. Aliquotas do sobrenadante foram utilizadas para análise usando azocaseína como substrato, de acordo com o protocolo estabelecido por Dufour et al. (2008) modificado. As alterações foram feitas para ajustar a leitura da absorvância à faixa de linearidade do equipamento. Tais modificações ocorreram em quatro etapas: redução do volume do sobrenadante da cultura para 50 µL, redução do tempo de incubação em banho-maria para 30 min e não adição de NaOH 5 M na etapa final. A absorvância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan GO, Japão) a 366 nm. A atividade proteolítica foi definida pela diferença entre a absorvância do ensaio a 366 nm e o meio de cultura utilizado como branco (NICODÈME et al., 2005).

Para avaliação da atividade da protease termorresistente pela ação de Ser2 (MACHADO et al., 2016), o sobrenadante do cultivo foi aquecido a 95 °C por 8,45 min. Este binômio tempo-temperatura é suficiente para inativação da protease termossensível, Ser1, permanecendo no meio 75 % de Ser2 (MARCHAND et al., 2008). Após o tratamento térmico, a atividade proteolítica foi determinada como descrito anteriormente.

A atividade proteolítica termolábil foi obtida pela diferença entre a atividade proteolítica total e a de Ser2. A porcentagem da atividade proteolítica de Ser2 foi obtida conforme Equação 1. Cada ensaio foi repetido duas vezes. A análise estatística foi realizada por meio programa Assistat, com uso do teste de Tukey ao nível de significância de 0,05.

Equação 1:

$$\text{Atividade Proteolítica (AP) Ser2} = ((\text{AP. Ser2}/\pi_{s2}) / \text{AP. total})$$

Sendo:

AP. = atividade proteolítica

$\pi_{s2}$  = 0,66 (constante de atividade proteolítica de Ser2) (BAGLINIÈRE et al. – comunicação pessoal).

### **3.5 Efeito de nisina sobre o crescimento e a atividade proteolítica total e de Ser2 de *S. liquefaciens***

Uma solução estoque de nisina foi preparada pela dissolução de 1 g de nisina comercial (Christian Hansen, Dinamarca) 2,5 % em 10 mL de solução fosfato de

sódio, 0,005 M, pH 2,0 (PBS). A solução estoque foi mantida a 4 °C. Para obter a concentração desejada de nisina, a solução estoque foi diluída em PBS.

Os três isolados que demonstraram maior atividade proteolítica total antes do tratamento térmico, em ambas as temperaturas, foram selecionados para a continuidade dos experimentos. O cultivo foi realizado em caldo BHI suplementado com LDR 10 %, acrescido ou não de nisina (200 AU/mL), a 7 °C e a 30 °C. O efeito da bacteriocina foi avaliado ao longo do crescimento. A determinação do número de células viáveis pela técnica de microgotas e da atividade proteolítica total e de Ser2 foi realizada conforme descrito anteriormente.

O efeito de nisina (200 AU/mL) também foi avaliado no sobrenadante das culturas de *S. liquefaciens* L53, L95 e L98 cultivadas na ausência de nisina. A atividade proteolítica total foi avaliada imediatamente após a adição da bacteriocina no sobrenadante, conforme estabelecido no item 3.4.

### **3.6 Avaliação do efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular**

Para averiguar de que forma nisina poderia atuar nas células de *S. liquefaciens* foi avaliada a atividade proteolítica intracelular de células cultivadas na presença e ausência da bacteriocina. Para obter as proteases presentes no meio intracelular, as células de *S. liquefaciens* foram rompidas em prensa francesa tipo “French press” (SLM Aminco, FA-078, Estados Unidos). Para isso, foram utilizados os isolados que apresentaram maior atividade proteolítica.

O cultivo foi realizado em meio BHI acrescido de LDR 10 % sob agitação a 150 RPM, por 12 h a 30 °C. As células foram centrifugadas (5.590 g, 10 min), lavadas duas vezes e ressuspensas em solução salina 0,85 %. Sob a concentração de 10 g/100 mL as células de *S. liquefaciens* foram submetidas por duas vezes consecutivas a 1.000 psig (18.000 psi), pressão necessária para lisar células bacterianas. A atividade proteolítica foi avaliada imediatamente depois da lise das células, antes e após a centrifugação (10.000 g, 10 min) para remover restos celulares.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Influência dos meios de cultura sobre a atividade proteolítica de *S.*

#### *liquefaciens*

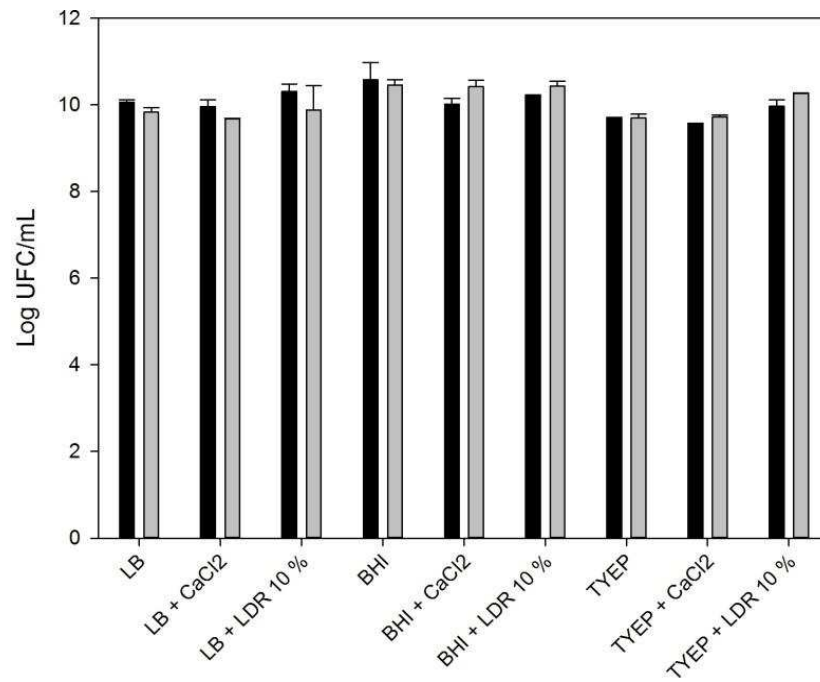
O número de células viáveis de *S. liquefaciens* L53 e L153 não variou nos meios de cultura utilizados, mesmo com suplementações de cálcio e do LDR 10 % (Figura 1A). Contrariamente, a atividade proteolítica foi influenciada pela composição do meio de cultivo (Figura 1B). O efeito estimulador da atividade proteolítica resultante da suplementação dos meios de cultura com cálcio variou com os isolados estudados, enquanto a suplementação com LDR 10 % promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade proteolítica de ambos os isolados quando os meios LB e TYEP foram utilizados (Figura 1B).

Quando cultivados em BHI, os dois isolados apresentaram alta atividade proteolítica, independente da suplementação com cálcio e LDR 10 % (Figura 1B). Considerando que o caldo BHI foi o meio de cultivo que favoreceu a atividade proteolítica de ambos os isolados, este meio suplementado com LDR 10 % foi o escolhido para a continuidade dos experimentos.

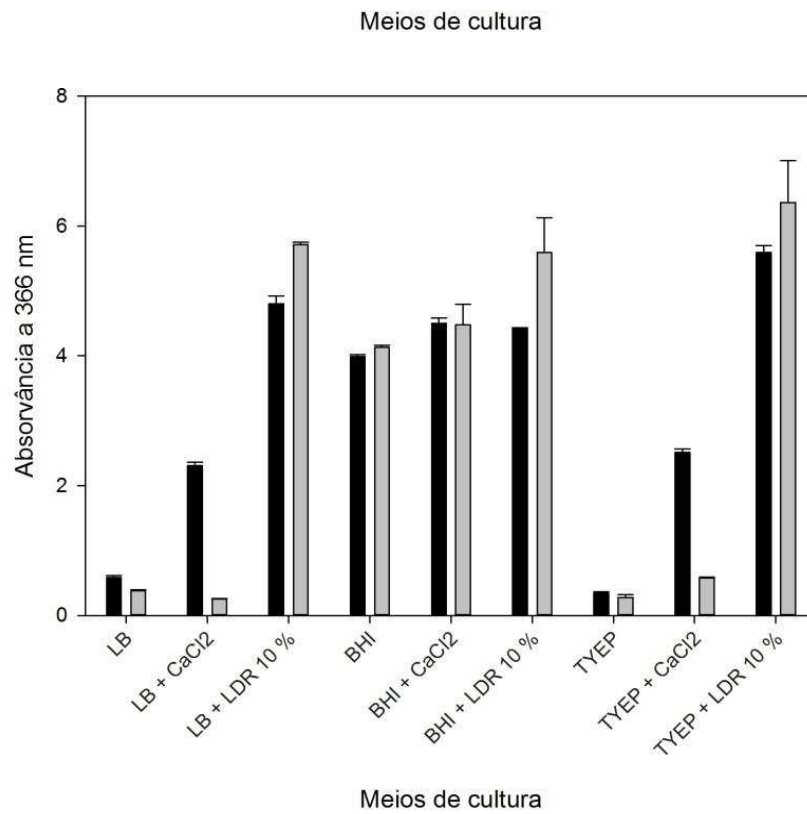
### 4.2 Atividade proteolítica de 17 isolados de *S. liquefaciens* em diferentes temperaturas

O número de células viáveis dos 17 isolados de *S. liquefaciens* avaliados variou ( $p < 0,01$ ) após 48 h de incubação, a 7 °C (Figura 2A), enquanto o cultivo a 30 °C por 24 h resultou em população final semelhante ( $p > 0,05$ ) (Figura 3A). Na temperatura de 7 °C, a atividade proteolítica foi observada apenas em cinco dos 17 isolados (29,4 %) (Figura 2B). Em condições de temperatura ótima de crescimento, ou seja, a 30 °C, 12 isolados (70,6 %) foram caracterizados como proteolíticos e, maiores valores de atividade proteolítica total também foram observados nesta temperatura (Figura 3B).

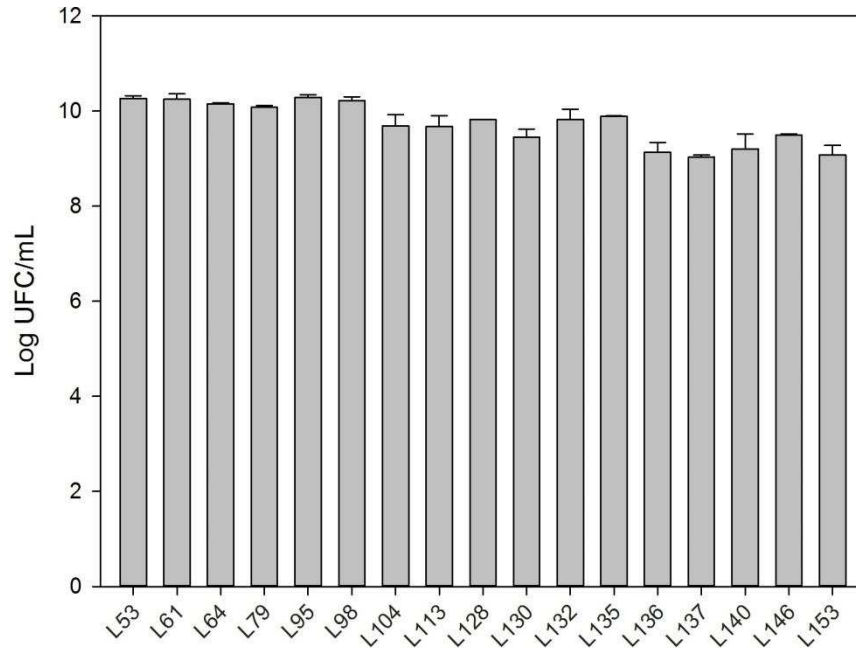
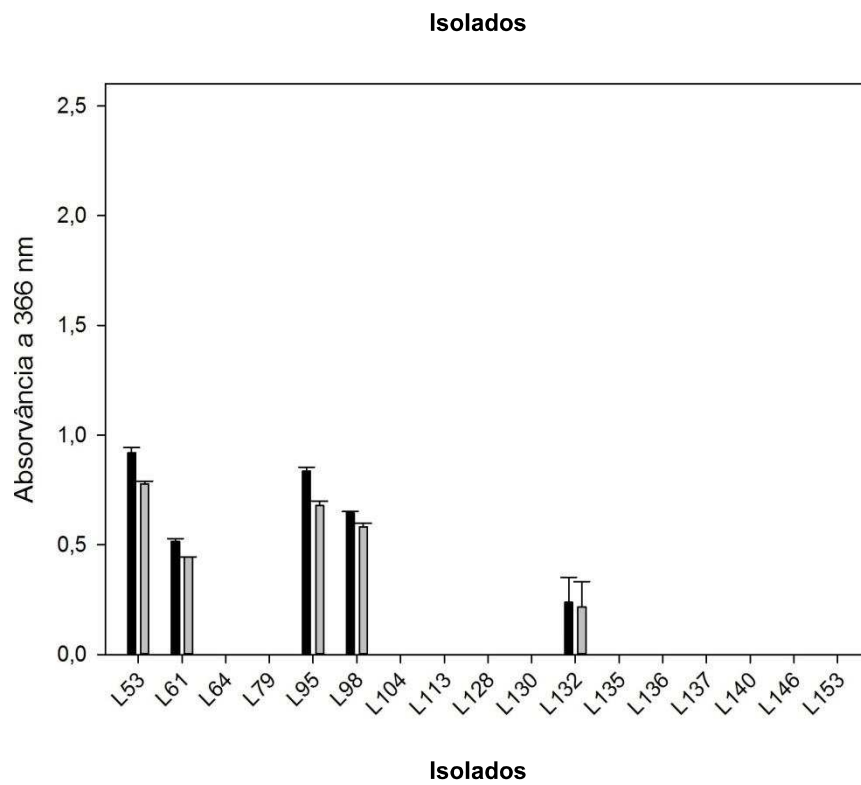
A



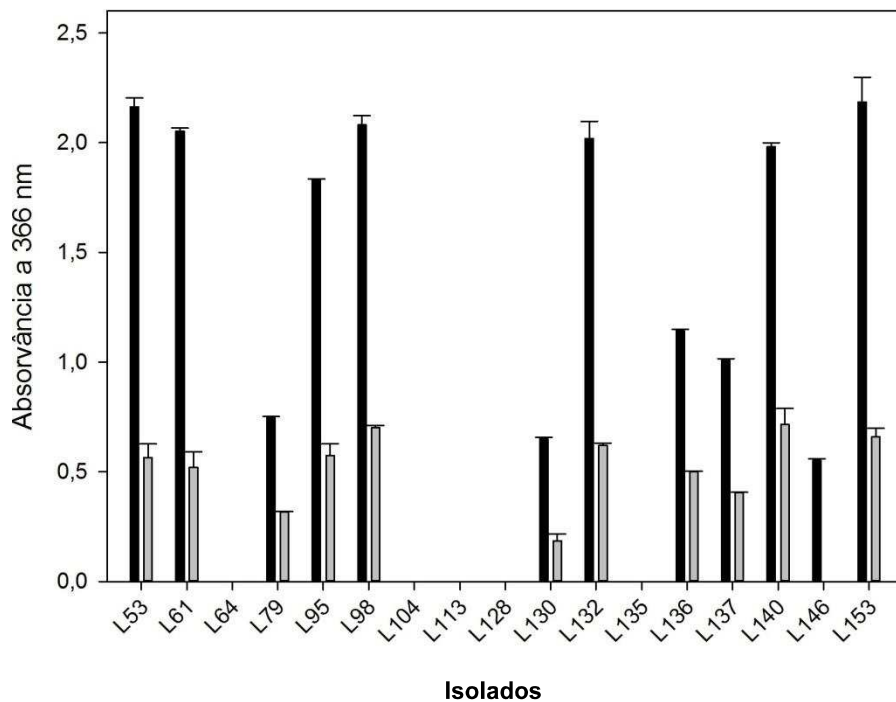
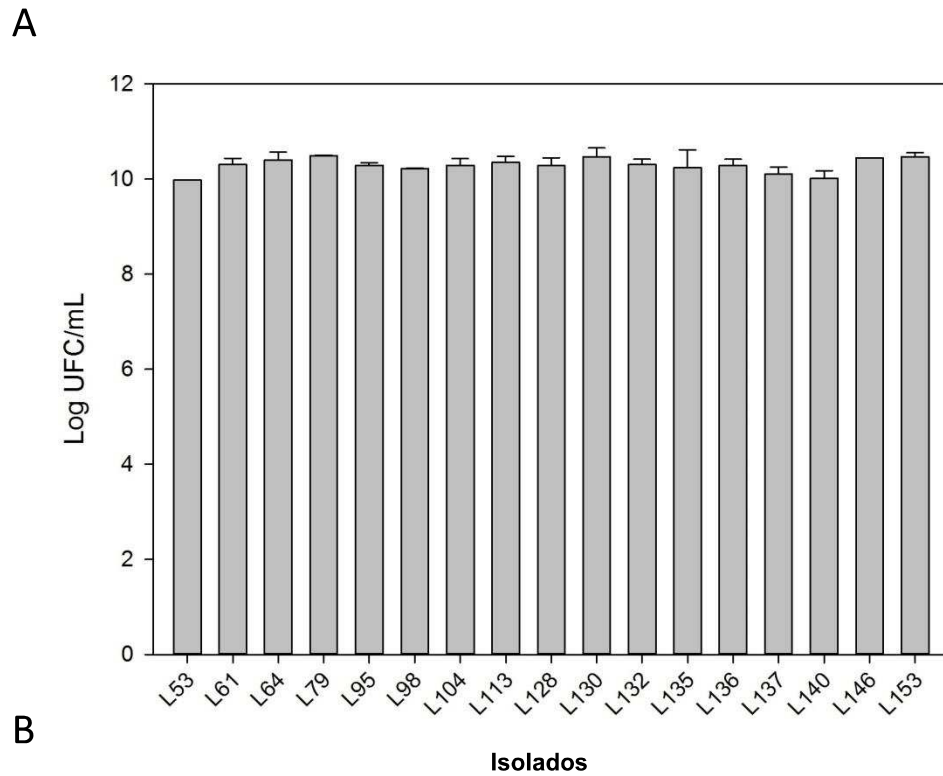
B



**Figura 1** - Número de células viáveis (UFC/mL) (A) e atividade proteolítica total (Abs a 366 nm) (B) de *S. liquefaciens* ■ L53 e ■ L153 em diferentes meios de cultivo.

**A****B**

**Figura 2** - Número de células viáveis (Log UFC/mL) (A) e atividade proteolítica (Abs a 366 nm) total ■ e de Ser2 ■ (B) de 17 isolados de *S. liquefaciens*, cultivados em caldo BHI com LDR 10 % a 7 °C, sob agitação a 150 RPM.



**Figura 3** - Número de células viáveis (Log UFC/mL) (A) e atividade proteolítica (Abs a 366 nm) total ■ e de Ser2 ■ (B) de 17 isolados de *S. liquefaciens*, cultivados em caldo BHI com LDR 10 % a 30 °C, sob agitação a 150 RPM.

É possível observar que alguns isolados, tais como *S. liquefaciens* L132 e L153, foram altamente proteolíticos a 30 °C e apresentaram baixa ou nenhuma atividade proteolítica a 7 °C (Figuras 2B e 3B, respectivamente). Foi observado que os isolados de *S. liquefaciens* L64, L104, L113, L128, L135 que não foram proteolíticos a 30 °C (Figura 2B) não o foram também a 7 °C (Figura 3B).

Todos os isolados que apresentaram atividade proteolítica total a 7 °C e a 30 °C demonstraram atividade da protease termorresistente com exceção do isolado L146. Entretanto, a proporção da atividade de Ser2 em relação a atividade proteolítica total foi influenciada pela temperatura e tempo de incubação, pois após 48 h sob refrigeração, a atividade de Ser2 representou entre 81,2 e 91,1 % da atividade proteolítica total (Tabela 2). Entretanto, após 24 h a 30 °C, a atividade de Ser2 correspondeu de 25,4 a 42,5 %, da atividade proteolítica total (Tabela 2).

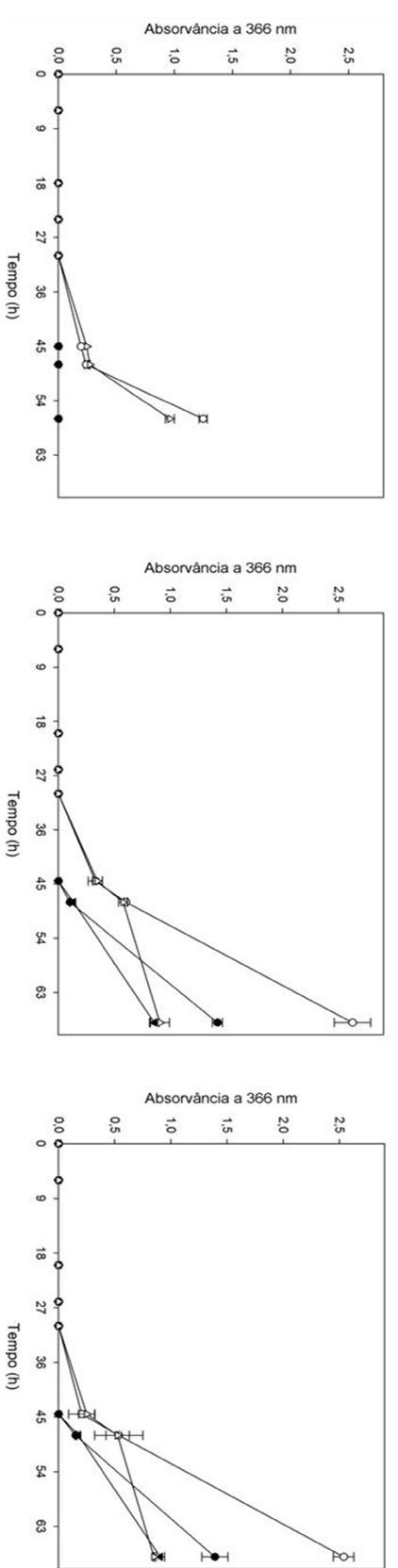
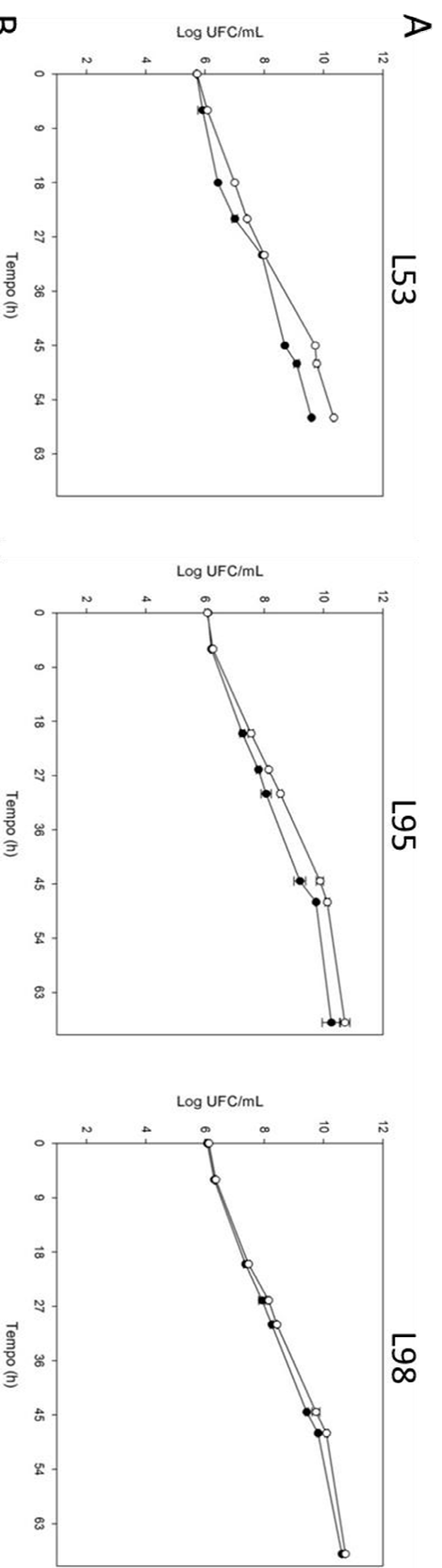
#### **4.3 Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica *S. liquefaciens***

Dentre os 17 isolados de *S. liquefaciens* avaliados, os de código L53, L95 e L98 estiveram dentre os de maior atividade proteolítica, a 7 °C e a 30 °C. Assim, foram escolhidos para estudo do efeito de nisina sobre o crescimento e a atividade proteolítica de *S. liquefaciens*. A presença de nisina na concentração de 200 AU/mL afetou ( $p < 0,05$ ) o crescimento dos isolados L53 e L95 de *S. liquefaciens* quando incubados a 7 °C, com redução de até 0,75 ciclo log entre o tratamento com nisina e o controle (Figura 4A). Por outro lado, esta diferença não foi encontrada no crescimento dos isolados avaliados em condições de temperatura ótima de crescimento (Figura 5A).

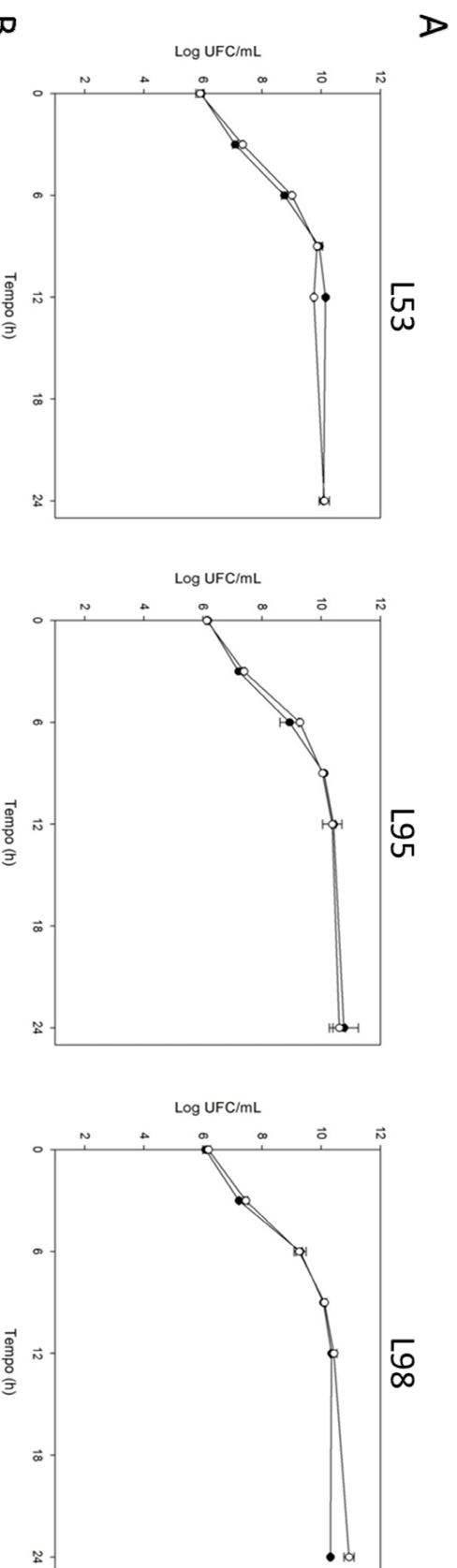
A atividade proteolítica total dos isolados L53, L95 e L98 de *S. liquefaciens* foi detectada entre o final da fase exponencial e o início da fase estacionária, que correspondeu a 45 h de incubação a 7 °C e 9 h de incubação a 30 °C (Figuras 4B e 5B). Os resultados demonstraram que há diferenças no tempo de secreção das enzimas Ser1 e Ser2. Nos isolados L95 e L98, a atividade proteolítica de Ser2, que alcançou 100 e 84,4 % da atividade total no início da fase estacionária dos isolados cultivados a 7 °C e a 30 °C, respectivamente, foi reduzida ao longo do tempo de forma que, com o prolongamento da incubação, a proporção de Ser2 ficou entre 30 e 54 % da atividade proteolítica total nas duas temperaturas (Figuras 4B e 5B).

**Tabela 2** - Porcentagem da atividade proteolítica de Ser2 a 7 °C e a 30 °C.

<b>Temperatura</b>	<b>Isolados</b>	<b>Proteólise por Ser2</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Proteólise total</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>% Ser2</b>
7 °C	L53	0,778	0,012	0,918	0,025	84,7
	L61	0,443	0,003	0,516	0,012	85,8
	L95	0,678	0,021	0,836	0,018	81,2
	L98	0,582	0,015	0,645	0,006	90,2
	L132	0,216	0,116	0,237	0,114	91,1
30 °C	L53	0,565	0,061	2,164	0,039	26,1
	L61	0,520	0,070	2,052	0,015	25,4
	L79	0,318	0,002	0,748	0,003	42,4
	L95	0,573	0,055	1,885	0,055	30,4
	L98	0,700	0,011	2,081	0,042	33,7
	L130	0,185	0,032	0,649	0,008	28,6
	L132	0,620	0,011	2,019	0,079	30,7
	L136	0,501	0,002	1,178	0,029	42,5
	L137	0,404	0,003	1,011	0,004	40,0
	L140	0,715	0,073	1,982	0,017	36,1
	L146	0,000	0	0,551	0,008	0,0
	L153	0,659	0,038	2,186	0,112	30,2



**Figura 4** - Crescimento (log UFC/mL) e atividade proteolítica (Abs a 366 nm) dos isolados L53, L95 e L98 a 7 °C. A - Curva de crescimento, ●- com nisina (200 AU/mL) e -○- sem nisina; B - Atividade proteolítica total, ●- com nisina e -○- sem nisina; e Atividade proteolítica de Ser2, com nisina -▼- e sem nisina -△-.



**Figura 5** - Crescimento (log UFC/mL) e atividade proteolítica (Abs a 366 nm) dos isolados L53, L95 e L98 a 30 °C. A - Curva de crescimento, -●- com nisina (200 AU/mL) e -○- sem nisina; B - Atividade proteolítica total, -●- com nisina e -○- sem nisina; e atividade proteolítica de Ser2, com nisina -▼- e sem nisina -△-.

A adição de nisina (200 AU/mL) ao meio de cultivo promoveu redução significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade proteolítica dos três isolados de *S. liquefaciens* tanto a 7 °C como a 30 °C, sendo este efeito inibidor mais pronunciado sob refrigeração (Figura 4B e 5B). Na condição de refrigeração, a atividade enzimática do isolado *S. liquefaciens* L53 não foi detectada na presença de nisina, porém o efeito da bacteriocina na atividade proteolítica dos isolados L95 e L98 reduziu-se ao longo do período de incubação (Figura 4B). Sob temperatura ótima de crescimento de 30 °C, a redução da atividade proteolítica total dos três isolados que é de, aproximadamente, 80 % no início da fase estacionária, alcança valores de 24 %, ao final de 24 h de incubação (Figura 5B). Ao longo do tempo de incubação, observou-se menor efeito inibidor da bacteriocina sobre a atividade proteolítica total e de Ser2, em ambas as condições de temperatura.

A avaliação da atividade proteolítica no sobrenadante das culturas dos três isolados cultivados a 7 °C e a 30 °C foi feita na presença e na ausência de nisina. Observou-se que a atividade proteolítica total não foi afetada pela adição de nisina ao sobrenadante, o que indicou que nisina não age sobre a atividade das proteases depois de secretadas por *S. liquefaciens*.

#### **4.4 Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular de *S. liquefaciens***

Valores semelhantes de absorvância a 366 nm foram registrados na análise do lisado das células cultivadas na presença ou na ausência de nisina. Este resultado indica que não houve diferença da atividade proteolítica total intracelular dos isolados cultivados na presença ou na ausência de nisina.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Influência dos meios de cultura sobre o número de células viáveis e atividade proteolítica de *S. liquefaciens*

Os meios de cultura LB, BHI e TYEP utilizados não interferiram no número final de células viáveis de *S. liquefaciens*. Segundo Grimont e Grimont (2006), espécies do gênero *Serratia*, em geral não requerem adição de fatores de crescimento em meio mínimo. Entretanto, a suplementação com LDR 10 % foi eficiente em induzir a atividade proteolítica, o que reforçou os resultados encontrados por Nicodème et al. (2005), que afirmaram que outros componentes presentes no leite, além do cálcio, podem favorecer o aumento da atividade proteolítica. O efeito estimulador da atividade proteolítica resultante da adição de 0,25 % de CaCl<sub>2</sub> foi também constatado em *Pseudomonas* (PINTO et al., 2007). Estes autores constataram que a incorporação de LDR 12 % e 0,25 % de CaCl<sub>2</sub> em meio TYEP não afetou o crescimento de *P. fluorescens*, mas a adição da CaCl<sub>2</sub> aumentou em até 100 % a atividade proteolítica.

A busca no banco de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB) pela palavra “AprX” mostrou que estão depositadas informações desta serina protease secretada por vários gêneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Streptomyces*, entre outros (UNIPROTKB, 2016). Em muitos estudos tem-se ressaltado a relação entre o aumento da atividade proteolítica de enzimas de *Pseudomonas* na presença de Ca<sup>2+</sup>, inclusive que estes íons são necessários para atividade ótima desta enzima (LIAO e McCALLUS, 1998; RAJMOHAN et al., 2002; NICODÈME et al., 2005; PINTO et al., 2007; BAGLINIÈRE et al., 2013; MATÉOS et al., 2015).

O efeito estimulador do Ca<sup>2+</sup> na atividade proteolítica de *S. liquefaciens* pode ser explicado pela observação de Kaibara et al. (2012) de que as sequências de aminoácidos das proteases Ser1 e Ser2 de *S. liquefaciens* Kuo1-1 apresentaram motivos de ligação de Ca<sup>2+</sup>. Machado et al. (2016) encontraram resultado similar em

análise *in silico* de 17 isolados de *S. liquefaciens*, sugerindo a importância do cálcio para a atividade destas enzimas. Neste estudo, foi observado que o efeito do cálcio sobre a atividade proteolítica de *S. liquefaciens* pode ser dependente do isolado.

A riqueza e a complexidade de nutrientes do meio BHI pode ser a razão da atividade proteolítica mais homogênea de *S. liquefaciens* em relação aos meios LB e TYEP avaliados. Além disso, mesmo com a adição de  $\text{CaCl}_2$  e, ou LDR 10 %, o grau de proteólise foi similar entre os dois isolados. Portanto, o caldo BHI suplementado com LDR 10 % (v/v) foi escolhido para a continuidade dos experimentos objetivando a obtenção de valores altos de atividade proteolítica com os demais isolados de *S. liquefaciens*.

## **5.2 Viabilidade e atividade proteolítica de 17 isolados de *S. liquefaciens* em diferentes temperaturas**

O fato de se ter observado número final de células viáveis mais aproximado após 1 dia de incubação a 30 °C do que após 2 dias de incubação a 7 °C pode ser atribuído a variações entre os isolados quanto ao metabolismo celular e esta diferença foi refletida mais nitidamente no crescimento a 7 °C. Contudo, a alta densidade populacional de todos os isolados em ambas as temperaturas, demonstrou a capacidade de se adaptarem quando submetidos a temperaturas fora do ideal. Berry e Foegeding (1997) destacaram esta capacidade de adaptação de bactérias psicrófilas.

Provavelmente, as diferenças encontradas com relação à atividade proteolítica nas temperaturas de 7 °C e 30 °C estejam ligadas aos diferentes estados fisiológicos das células no momento da coleta das amostras. Isto pode ser confirmado observando-se as curvas de crescimento de *S. liquefaciens* L53, L95 e L98 nessas temperaturas (Figuras 4A e 5A). Além disso, a temperatura também exerce importante efeito na atividade proteolítica. Wolf et al. (1991), ao estudarem alguns isolados de *S. liquefaciens*, verificaram que os isolados que cresceram a 25 °C produziram de quatro a oito vezes mais proteases do que quando cultivados a 35 °C. O fato de a detecção da atividade proteolítica total ocorrer comumente no final da fase exponencial foi também observado por Givskov e Molin (1992) com outra enzima de *S. liquefaciens*, uma fosfolipase, cuja expressão ocorria principalmente, neste mesmo período. Givskov et al. (1997) também destacaram que a produção

destas enzimas extracelulares por *S. liquefaciens* em meio líquido é dependente da fase de crescimento, com aumento acentuado na transição entre a fase exponencial de crescimento e a fase estacionária.

Os 17 isolados de *S. liquefaciens* selecionados neste estudo foram isolados de leite cru por Machado et al. (2015) por apresentarem características de serem psicrotróficos e proteolíticos. No presente estudo, 12 isolados não demonstraram atividade proteolítica, principalmente a 7 °C. Destaca-se, no entanto, que o período de incubação utilizado foi de 2 dias a 7 °C, e o BHI suplementado com LDR 10 % foi utilizado como meio de cultivo. Machado et al. (2016) não conseguiram detectar atividade proteolítica de *S. liquefaciens* L79, cultivado pelo mesmo período de 2 dias a 7 °C, mesmo com a utilização da zimografia de caseína, técnica bastante sensível. Contudo, a proteólise por *S. liquefaciens* L79 foi detectada após 4 dias de incubação sob refrigeração e, além disso, todos os isolados foram inoculados em leite cru. O tempo insuficiente de incubação dos isolados pode ser a causa da não detecção da atividade proteolítica total de alguns isolados e de Ser2, no caso *S. liquefaciens* L146. Embora em *clusters* de *fingerprint* separados (Tabela 1), o alto potencial deteriorador de *S. liquefaciens* L53 e L98, similarmente ao encontrado no presente trabalho, também foi registrado por Machado et al. (2016).

### **5.3 Efeito de nisina sobre o crescimento e atividade proteolítica total e de Ser2 de *S. liquefaciens***

A presença da membrana externa em bactérias gram-negativas, como *S. liquefaciens* impede que nisina atue diretamente sobre a membrana plasmática e exerça efeito inibidor no crescimento bacteriano. Entretanto, outros estudos evidenciam que fatores ambientais, como baixas temperaturas ou agentes químicos têm sido utilizados para desestabilizar a membrana externa de bactérias gram-negativas e permitir a passagem de nisina até a membrana plasmática, onde ocorre a atuação desta bacteriocina pela formação de poros e inibição da síntese da parede celular (SIVAROOBAN, 2008; KHAN et al., 2015; PRUDÊNCIO et al., 2016). Isto indica que a passagem pela membrana externa é crucial para a atividade de nisina sobre o crescimento (ZHOU et al., 2016).

Embora o efeito inibidor de nisina sobre o crescimento de *S. liquefaciens* a 7 °C tenha sido observado no presente trabalho e, semelhantemente, por Prudêncio et

al. (2015a) em que constataram que nisina associada à baixa temperatura reduziu o número de células viáveis de *Salmonella*, não há na literatura consultada, relatos de que a nisina possa interferir na atividade proteolítica de bactérias gram-negativas. Poranto, este é o primeiro trabalho a relatar a redução da atividade proteolítica de *S. liquefaciens* por bacteriocinas. Este resultado pode sinalizar para a exploração de uma estratégia potencial para a abordagem de um dos grandes problemas na indústria do leite, que é a presença indesejável de enzimas proteolíticas na matéria-prima. Contudo, aliado a isso, formas de controle da contaminação inicial por microorganismos são essenciais para alcançar a boa qualidade dos produtos lácteos.

A proporção da atividade de Ser2 em relação à atividade proteolítica total parece ser mantida independente da temperatura de 7 °C ou 30 °C de incubação e, que varia em função do estado fisiológico de *S. liquefaciens*. Ressalta-se que a termorresistência de Ser2 compromete a qualidade de leite e derivados após os tratamentos térmicos adotados na indústria de laticínios

A redução da atividade proteolítica observada principalmente entre o fim da fase exponencial e o início da fase estacionária de crescimento dos três isolados de *S. liquefaciens* (Figuras 4B e 5B) permitiu constatar que a porcentagem de redução da atividade proteolítica decresceu ao longo do tempo. Talvez a concentração de nisina utilizada seja capaz de reduzir, mais eficientemente, a proteólise quando a concentração de proteases é baixa e, ou a interação de nisina livre com as células de *S. liquefaciens* possa diminuir ao longo do tempo, uma vez a população bacteriana e, principalmente a concentração de proteases, se elevam consideravelmente com o aumento do período de incubação.

Embora nisina tenha reduzido a proteólise causada pelos três isolados de *S. liquefaciens*, não foi possível identificar o modo de ação desta bacteriocina. Entretanto, a não redução da atividade proteolítica após a adição de nisina ao sobrenadante de cultivo dos isolados de *S. liquefaciens* testados indica que a bacteriocina não atua diretamente sobre a atividade das proteases já sintetizadas. Isto sugere que nisina atue em outras etapas como na síntese e, ou na secreção das proteases.

Como bactéria gram-negativa, *S. liquefaciens* é detentora de uma membrana externa que atua como barreira à passagem de nisina até o seu sítio de ação. Sendo assim, nisina poderia interagir com proteínas presentes na membrana externa, como proteínas transportadoras, de forma a reduzir a secreção das proteases. Zhao et al.

(2016) demonstraram que nisina foi capaz de regular diferencialmente, 601 genes em *Staphylococcus aureus* e, dentre eles, 22 genes putativos de transporte foram diferencialmente regulados, sendo a maioria deles envolvidos com a superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Machado et al. (2016) verificaram que todos os 17 isolados de *S. liquefaciens* apresentam motivos do exportador ABC. No presente estudo, a atividade proteolítica intracelular semelhante nas células cultivadas na presença ou na ausência de nisina não indica a possível ação de nisina sobre a secreção destas proteases. Deve-se considerar que o acúmulo destas no meio intracelular em razão da interferência da nisina no mecanismo de secreção, poderia desencadear a autólise (BAGLINIÈRE et al. – dados não publicados) e, ou o controle negativo sobre a expressão das proteases. Possivelmente, em períodos iniciais de cultivo, ainda com baixa concentração de proteases, a chance de detectar alguma diferença entre o controle e tratamento com nisina seja maior.

Os relatos sobre a regulação do metabolismo de bactérias gram-positivas pela nisina são diversos. O sistema de expressão gênica controlado por nisina (sistema NICE) é um sistema eficiente fundamentado no mecanismo de autoregulação da biossíntese de nisina e permite a superprodução regulada de uma variedade de proteínas de interesse (ZHOU et al., 2006). Zhou et al. (2008) demonstraram em *L. lactis* a produção heteróloga de apidaecina, peptídeos antimicrobianos produzidos por insetos, por meio do sistema NICE, no qual o promotor *nisA* e o peptídeo sinal Usp45 promoveram a eficiente secreção de apidaecina. Estes estudos demonstram que nisina pode regular a expressão gênica.

Uma alternativa a ser proposta seria a atuação da nisina na regulação da síntese das proteases de *S. liquefaciens*, por exemplo, por um sistema de dois componentes. Esse modelo de regulação foi demonstrado em uma bactéria gram-positiva, *L. lactis* na biossíntese de nisina A (GE et al., 2016). A fim de verificar a ação de nisina na regulação da síntese das proteases de *S. liquefaciens*, ensaios de RT-PCR e microarranjos de DNA podem ser conduzidos.

Considerando que nisina reduziu a atividade proteolítica de *S. liquefaciens* em BHI suplementado com LDR 10 %, pode-se avaliar este efeito em leite, para aplicação da nisina na redução dos danos causados por bactérias psicrotóxicas em leite cru. O uso da bacteriocina pode aumentar o rendimento e a vida útil de produtos lácteos.

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo demonstrativo sobre a ação da nisina na redução da atividade proteolítica de *S. liquefaciens*. A ação de nisina na redução da atividade proteolítica causada por Ser2 pode ser explorada como alternativa para a redução da deterioração do leite após os tratamentos térmicos.

O entendimento do mecanismo de ação de nisina na redução da atividade proteolítica é importante e há indicações de que esta bacteriocina pode atuar sobre a síntese e, ou secreção de proteases em *S. liquefaciens*. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o efeito inibidor de nisina sobre a atividade proteolítica e para a aplicação desta bacteriocina na redução da proteólise em leite.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35 (1), 177-183.
- Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (1996). PORTARIA DETEN/MS Nº. 29.
- Allende, A., Martinez, B., Selma, V., Gil, M. I., Suarez, J. E., Rodriguez, A. (2007). Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, 24 (7-8), 759-766.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M.; Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 70-75.
- Baglinière, F., Tanguy, G., Jardin, J., Briard, V., Matéos, A., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Gaillard, J. L., Amiel, C., Humbert, G., Dary, A., Gaucheron, F. (2012). Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. *Food Chemistry*, 31, 65-61.
- Baglinière, F., Matéos, A., Tanguy, G., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Gaillard, J. L., Amiel, C., Humbert, G., Dary, A., Gaucheron, F. (2013). Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. *International Dairy Journal*, 135, 2593-603.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., Dora, B., Franco, B. D. G. M., Converti, A., Oliveira, R. P. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32 (1), 134-142.
- Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., Orlie, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International*, 77, 725-742.
- Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Stoeckel, M., Hinrichs, J., Stressler, T., Fischer, L. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23-29.

- Berry, E. D., Foegeding, P. M. (1997). Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60 (12), 1583-1594.
- Brasil. (1996). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos queijos. DOU, Brasília, DF, 11 de março de 1996. Seção 1, 3977-3986.
- Brasil. (1997). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 359, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Requeijão. DOU, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997. Seção 1.
- Brasil. (2002). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 172, 8-13.
- Brasil. (2011). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. Regulamento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 6-37.
- Bockelmann, W., Koslowsky, M., Goerges, S., Scherer, S., Franz, C. M. A. P., Heller, K. J. (2017). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Staphylococcus equorum* SE3 in cheese models. *Food Control*, 71, 50-56.
- Catania, F. S., Inay, O. M., Silva, O. S., Pereira, J. R., Tamanini, R., Beloti, V., Costa, M. R., Souza, C. H. B., Aragon-Alegro, L. C., Santana, E. H. W. (2012). Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 3171-3180.
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., Chikindas, M. L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46 (5), 494-501.
- Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., Vieira, M. J. (2012). Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS One*, 7 (6): e40189.
- Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31 (2), 126-140.
- De Carvalho, A. A. T., Vanetti, M. C. D., Mantovani, H. C. (2007). Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 68-74.

- De Carvalho, A. A. T., Vanetti, M. C. D., Mantovani, H. C. (2008). Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1685-1691.
- Decimo, M., Morandi, S., Silvetti, T., Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-Negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79 (10), M2081–M2090.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16 (9), 1058-1071.
- Dischinger, J., Chipalu, S. B., Bierbaum, G. (2014). Promising candidates for future applications in health care. *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (1), 51-62.
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J. -L., Dary, A. (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 188-196.
- Dogan, B., Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 130-138.
- Elliott, M., Kindrachuk, J., Nijnik, A., Magrangeas-janot, L., Pasupuleti, M., Thorson, L., Ma, S., Easton, D. M., Bains, M., Finlay, B., Breukink, E. J., Georg-Sahl, H., Hancock, R. E. W. (2012). Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: Lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate Immunity*, 19 (3), 315-327.
- EFSA. (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of nisin (E 234) as a food additive. *The EFSA Journal*, 314, 1-16.
- Gabriel, A. A., Estilo, E. E. C. (2015). Influences of malic acid and nisin supplementations on the decimal reduction times of *Escherichia coli* O157:H7 in mildly-heated young coconut liquid endosperm. *Food Control*, 50, 645-651.
- Gadotti, C., Nelson, L., Diez-Gonzalez, F. (2014). Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology*, 39, 1-6.
- Ge, X., Teng, K., Wang, J., Zhao, F., Wang, F., Zhang, J., Zhong, J. (2016). Ligand determinants of nisin for its induction activity. *Journal of Dairy Science*, 99 (7), 5022-5031.

- Givskov, M., Olsen, L., Molin, S. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens*. *Journal of Bacteriology*, 170, 5855-5862.
- Givskov, M., Molin, S. (1992). Expression of extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens* is growth-phase dependent, catabolite repressed and regulated by anaerobiosis. *Molecular Microbiology*, 6, 1363-1374.
- Givskov, M., Eberl, L., Molin, S. (1997). Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 148, 115-122.
- Gram, L.; Ravn, L.; Rasch, M.; Bruhn, J. B.; Christensen, A. B., Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal Food Microbiology*, 78, 79-97.
- Grimont, F., Grimont, P. A. D. (2006). The genus *Serratia*. En: M. Dworkin, editor, *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*. 3rd ed. Springer, New York, EEUU.
- Grisi, T. C. S. L., Gorlach-Lira, K. (2005). Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 151-156.
- Gyawali, R., Ibrahim, S. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Hansen, J. N., Sandine, W. E. (1994). Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34:1, 69-93.
- Hantsis-Zacharov, E., Halpen, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (22), 7162-7168.
- Hardjito, L., Huq, A., Colwell, R. R. (2012). The influence of environmental conditions on the production of pigment by *Serratia marcescens*. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 7, 100-104.
- Hécharde, Y., Sahl, H. G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84 (5-6), 545-557.
- Hines, D. A., Saurugger, P. N., Ihler, G. M., Benedik, M. J. (1988). Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *Journal Bacteriology*, 170, 4141-4146.
- Kaibara, F., Iiyama, K., Chieda, Y., Lee, J. M., Kusakabe, T., Yasunaga-aoki, C., Shimizu, S. (2012). Construction of serralysin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 61, 55-61.

- Khan, A., Vu, K. D., Riedl, B., Lacroix. (2015). Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 124-129.
- Lejeune, J. T., Rajala-Schultz, P. J. (2009). Unpasteurized milk: A continued public health threat. *Clinical Infectious Disease*; 48 (1), 93-100.
- Liao, C. H., McCallus, D. E. (1998). Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 914-921.
- López-Cuellar, M. R., Rodríguez-Hernández, A.-I., Chavarría-Hernández, N. (2016) LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:6, 1039-1050.
- Machado, S. G. (2014). Identificação da microbiota psicrotófica proteolítica predominante e detecção de enzimas proteolíticas em leite. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- Machado, S. G., da Silva, F. L., Bazzolli, D. M. S., Heyndrickx, M., Costa, P. M. D., Vanetti, M. C. D. (2015). *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. *Journal of Food Science*, 80 (8), M1842–M1849.
- Machado, S. G., Heyndrickx, M., De Block, J., Devreese, B., Vandenberghe, I., Vanetti, M. C. D., Coillie, E. V. (2016). Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 65-71.
- Marchand, S., Coudijzer, K., Heyndrickx, M., Dewettinck, K., De Block, J. (2008). Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. *International Dairy Journal*, 18 (5), 514-519.
- Marchand, S., Heylen, K., Messens, W., Coudijzer, K., DeVos, P., Dewettinck, K., Herman, L., De-Block, J., Heyndrickx, M. (2009). Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environmental Microbiology*, 11 (2), 467-482.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (1), 24-32.
- Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiology Letters*, 317 (2), 152-159.

- Matéos, A., Guyard-Nicodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G., Gaillard, J. -L. (2015). Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *International Dairy Journal*, 49, 78-88.
- Meghrou, J., Lacroix, C., Simard, R. E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16 (2), 105-114.
- Morton, R. D. (2001). Aerobic Plate Count. In: Downes, F. P., Ito, K., editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. Washington, D. C. APHA; 63-67.
- Nicodème, M., Grill, J. -P., Humbert, G., Gaillard, J. -L. (2005). Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 641-648.
- Odriozola-Serrano, I., Garde-Cerda, T., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2013). Differences in free amino acid profile of non-thermally treated tomato and strawberry juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32, 51-58.
- Perin, L. M., Moraes, P. M., Almeida, M. V., Nero, L. A. (2012). Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Semina-Ciências Agrárias*, 33, 333-342.
- Pimentel-Filho, N. J., Mantovani, H. C., Carvalho, A. F., Dias, R. S., Vanetti, M. C. D. (2014). Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 416-422.
- Pinto, C. L. O., Martins, M. L., Vanetti, M. C. D. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (3), 645-651.
- Pinto, U. M.; Viana, E. S.; Martins, M. L.; Vanetti, M. C. D. (2007). Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*, 18 (10), 1322-1327.
- Pinto, U. M.; Costa, E. D.; Mantovani, H. C., Vanetti, M. C. D. (2010). The proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* 07A isolated from milk is not regulated by quorum sensing signals. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41, 91-96.
- Pinto, M. S., Carvalho, A. F., Pires, A. C. S., Souza, A. A. C., Silva, P. H. F., Sobral, D., Paula, J. C. J., Santos, A. L. (2011). The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*, 21 (2), 90-96.

- Pinto, C. L. O., Machado, S. G., Martins, M. L., Vanetti, M. C. D. (2015). Identification of proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk and characterization of its spoilage potential. *Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 70, 2, 105-116.
- Prudêncio, C. V., Mantovani, H. C., Cecon, P. R., Vanetti, M. C. D. (2015a). Differences in the antibacterial activity of nisin and bovicin HC5 against *Salmonella* Typhimurium under different temperature and pH conditions. *Journal Applied Microbiology*, 118, 18-26.
- Prudêncio, C. V., Santos, M. T., Vanetti, M. C. D. (2015b). Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *Journal of Food Science and Technology*, 54 (9), 5408-5417.
- Prudêncio, C. V., Ferreira, S. O., Mantovani, H. C., Vanetti, M. C. D. (2016). Morphological changes in *Salmonella* Typhimurium caused by the lantibiotic bovicin HC5 in association with EDTA. *Annals of Microbiology*, 66, 373-379.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D., Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28 (3), 465-471.
- Rajmohan, S., Dodd, C. E., Waites, W. M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 205-213.
- Rasolofo, E. A., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 108-118.
- Rilla, N. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology*, 85 (1-2), 23-33.
- Sadiq, S., Imran, M., Habib, H., Shabbir, S., Ihsan, A., Zafar, Y., Hafeez, F. Y. (2016). Potential of monolaurin based food-grade nano-micelles loaded with nisin Z for synergistic antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 227-233.
- SAEG. (2007). SAEG: sistema para análises estatísticas, versão 9.1. Universidade Federal de Viçosa.
- Samarzija, D., Zamberlin, S., Pogacic, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk quality. *Mljekarstvo*, 62 (2), 77-95.
- Santos, A. F., Valle, R. S., Pacheco, C. A., Alvarez, V. M., Seldin, L., Santos, A. L. S. (2013). Extracellular proteases of *Halobacillus blutaparonensis* strain M9, a new moderately halophilic bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 4, 1299-1304.

- Shi, C., Zhang, X., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Chen, X., Guo, Na. (2017). Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control*, 71, 10-16.
- Silva, F. A. S., Azevedo, C. A. V. (2009). Principal components analysis in the Assistat-Statistical attendance. In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41, 781-785.
- Sobrinho-López, A., Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18, 329-343.
- Sørhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8 (2), 35-41.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 40, 722-756.
- Teh, K. H., Flint, S., Palmer, J., Lindsay, D., Andrewes, P., Bremer, P. (2011). Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, 21 (10), 742-747.
- The UniProt consortium. (2016). UniProt a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, V 43, n D1, D204-D212, 2016.
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martín-Sarmiento, R., Carballo, J. (1993). Study of Enterobacteriaceae throughout the manufacturing and ripening of hard goats' cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 240-246.
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 57-65.
- Wijnker, J. J., Weerts, E. A. W. S., Breukink, E. J., Houben, J. H., Lipman, L. J. A. (2011). Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. *Food Microbiology*, 28 (5), 974-979.
- Wolf, U., Bauer, D., Traub, W. H. (1991). Metalloproteases of *Serratia liquefaciens*: degradation of purified human serum proteins. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene. Serie B-Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Praventive Medizin*, 276, 16-26.
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2015). Two

- putatively novel bacteriocins active against Gram negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control*, 55, 176-184.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118-132.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 241.
- Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zhao, X., Meng, R., Shi, C., Liu, Z., Huang, Y., Zhao, Z. (2016). Analysis of the gene expression profile of *Staphylococcus aureus* treated with nisin. *Food Control*, 59, 499-506.
- Zhou, X. X., Li, W. F., Ma, G. X., Pan, Y. J. (2006). The nisin-controlled gene expression system: Construction, application and improvements. *Biotechnology Advances*, 24, 285-295.
- Zhou, X. X., Wang, Y. -B., Pan, Y. J., Li, W. F. (2008). Nisin-controlled extracellular production of apidaecin in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 78, 947-953.
- Zhou, L., van Heel, A. J., Montalban-Lopez, M., Kuipers, O. P. (2016). Potentiating the activity of nisin against *Escherichia coli*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 4, 7.