

LILIANE ANDRADE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM ATIVIDADE
ANTI-*Listeria* A PARTIR DE LEITE DE CABRA CRU**

**JOÃO PESSOA
2014**

LILIANE ANDRADE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM ATIVIDADE
ANTI-*Listeria* A PARTIR DE LEITE DE CABRA CRU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Haíssa Roberta Cardarelli

**JOÃO PESSOA
2014**

S586s Silva, Liliane Andrade da.

Seleção de bactérias láticas com atividade anti-Listeria a partir de leite de cabra cru / Liliane Andrade da Silva.-- João Pessoa, 2014.

53f.

Orientadora: Haíssa Roberta Cardarelli

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de alimentos. 2. Bacteriocinas. 3. Bioconservação. 4. Bactérias láticas.

LILIANE ANDRADE DA SILVA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM ATIVIDADE ANTI-*Listeria* A PARTIR
DE LEITE DE CABRA CRU**

Dissertação _____ em _____ / _____ / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Haíssa Roberta Cardarelli
Coordenador da Banca Examinadora

Prof.^a. Dr.^a. Marciane Magnani
Examinador Interno

Prof.^a. Dr.^a. Fabíola Fonseca Ângelo
Examinador Externo

Ao meu Deus Maravilhoso,
Fonte de amor e graças em meu viver.

Aos meus pais, Luzia e José Ramos,
em especial a minha mãe, pelo exemplo de
mulher, determinação e por tudo que representa
em minha vida.

Ao meu marido Anderson David,
Por sua compreensão, carinho e respeito.

A minha tia Nina,
Por toda dedicação e carinho que sempre teve
comigo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS, pelo dom da vida, por me amar e por ter colocado pessoas tão especiais ao meu lado sempre, sem as quais certamente não estaria aqui!

A meus pais, José Ramos e Luzia, meu amado e infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me ensinaram a ser uma pessoa honesta e digna. Apesar de todas as dificuldades e problemas que passamos, sei que ambos me amam e querem sempre o melhor para mim. Obrigada pelo amor incondicional, por terem me dado vida e por tudo que me ensinaram e me ensinam até hoje! Amo vocês!

A meu querido esposo, Anderson David, por ser tão importante e especial na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que sou capaz. Sempre estive ao meu lado nos momentos felizes e tristes, me dando força inclusive nos finais de semana e feriados quando precisava estar no laboratório. Obrigada por seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor. Obrigada por me fazer feliz! Te amo!

A minha tia amada, minha segunda mãe, Nina. Por toda dedicação e carinho, por sempre acreditar na minha capacidade e sempre orar por mim. Serei eternamente grata pelo cuidado, amor e presença em minha vida!

A minha irmã, Janiery, e a minha prima-irmã, Thaís, que são pessoas muito especiais, que também sempre me apoiaram, me fizeram rir com bobagens e que amo demais.

À pequena Melrinha, minha cadelinha, tão presente na minha vida e que me faz sentir muito amada e que adora ficar em meu colo quando tenho que estudar no computador. Obrigada por seu amor e carinho em todos os momentos, principalmente pela festa que sempre fez quando eu chegava da universidade supercansada e você demonstrava todo o carinho. Obrigada por existir em minha vida!

Aos meus sobrinhos Pedro Henrique, Gabrielle, Dandara (cadelinha linda) e meu afilhado Nicolás. Agradeço pelo carinho e por serem crianças tão especiais que me fazem sentir amada e que também contribuíram com seu amor, cada um a seu modo, para chegar onde estou. Obrigada meus amores!

A minhas tias, tios, primos e primas, especialmente tia Santa, Lia, Rita, Fátima, Socorro e Vera que vibraram comigo, desde a aprovação na prova, que sempre estão na torcida e orando por mim. Obrigada pela força!

A minhas avós, Rosa, Maria e Josefa, que sempre demonstraram amor e oraram por mim, como também, fizeram “propaganda” positiva a meu respeito. Obrigada por tudo!

Agradeço também as “minhas sogras”, as “Josefas” por todo apoio e por acreditarem em mim e também por me acolherem como família. Obrigada pelo carinho e confiança!

Agradeço a meus cunhados, Alysson, Adenilson e Philipe e minhas cunhadas Geovana e Vaninha, pelo incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho!

A minha companheira de todas as horas, minha querida Annie, a quem tenho muito carinho e que me ajudou aos sábados, domingos, feriados e dias santos. Sem você tudo seria mais difícil. Muitíssimo obrigada!

Às minhas amigas de sempre que tanto amo, Lô-Ruama, Sibelle, Elizama, por me incentivarem, só quererem o meu bem e me valorizar tanto como pessoa. Amigas mais que irmãs que sempre guardarei em meu coração. Obrigada pela amizade!

Às amigas que fiz à poucos anos no mestrado, Vilma e Ericka, mas que parece que foi de uma vida toda e que são tão especiais e que tanto me ajudaram neste mestrado, estando juntas em todas as situações. Serei eternamente grata a vocês e espero que nossa amizade seja para toda a vida. Obrigada pelo carinho meninas! Amo vocês!

A todos os amigos do mestrado em especial aqueles que sempre foram mais próximos, Claudiane, Daniel, José Evangelista, Marília e Adassa. Desejo sucesso a todos e agradeço pelo apoio direto ou indireto de cada um!

Agradeço a uma pessoa que considero incrível e que sempre me faz rir muito, José Honório. Obrigada pelos momentos de descontração!

Agradeço aos meus amigos de longas datas que sempre fizeram parte de momentos especiais de minha vida e que sempre torceram por mim, Sirleide, Yndrews, Erivanna, Carlinha, David, Douglas, Ozimar, Rinaldo, Verônica, Cristiane, Trajano, D. Cileide, Sr. Afonso, Wedjane, Josineide, César e Dioclécio. Obrigada pelo carinho e amizade de todos!

Aos colegas Francisco Cesino, Humberto e aos produtores de leite de cabra do Cariri, especialmente da região de Monteiro, Gurjão, Santo André e São João do Cariri. Como também ao Cleverlan e seus colegas produtores, S. Flávio. Todos foram fundamentais e de grande importância para o desenvolvimento de minha pesquisa. Obrigada por me ajudarem nas coletas!

A Candice, Rosana, Kleber e os professores Celso, Eleonidas e Octávio, que se disponibilizaram no que precisei e me ajudaram com a biologia molecular. Obrigada pelo apoio e disponibilidade!

Agradeço a todos os professores do PPGCTA em especial às professoras Marta e Marciane que apoiaram no que puderam. Também aos professores Evandro que disponibilizou o laboratório no CCS para que pudesse desenvolver minha pesquisa e professor Carlos Alberto que sempre me atendeu quando precisei. Obrigada a todos por passar seus conhecimentos e por me apoiar!

A professora Lúcia, do laboratório de microbiologia do CCS, pelo amor de pessoa que és e a atenção que sempre dedicou a quem precisa, e também a secretária do programa, Lindalva que sempre se mostrou disponível e atenciosa. Obrigada pela atenção!

Ao CNPQ pela oportunidade de realizar a pesquisa com bolsa.

As professoras Fabíola e Marciane pela contribuição na banca de qualificação e defesa. Muito obrigada!

Deixei para fazer um agradecimento especial por fim, propositalmente, a minha querida orientadora, Prof.a. Dra. Haíssa Roberta Cardarelli. Chamo de querida e é de todo o coração. Pois a professora Haíssa é uma mulher muito especial além de ser uma profissional exemplar, que honra e ama o que faz e que acima de tudo é humana, simples, respeita e tem carinho por seus alunos. Digo a todos que não poderia ter melhor orientadora. Não só por toda carga de conhecimento que tem, mas, pelo caráter. Pois, não pisa em ninguém simplesmente por que tem títulos. Muito pelo contrário, incentiva seus alunos mesmo que esteja em situação desagradável e me fez acreditar que é possível conseguir o que se almeja, mesmo que tudo não esteja ao nosso favor. Profissional entre poucos, que sai de sua casa, em pleno domingo debaixo de chuva, para auxiliar uma simples mestrandia em um laboratório deserto na universidade e que passa horas no telefone para solucionar um problema ou dúvida. Tenho muito orgulho e satisfação em ter sido sua primeira orientanda de mestrado e um prazer enorme de ter conhecido uma profissional e amiga com qualidades em que quero me espelhar. Tenho muito que agradecer, por não desistir de mim, por todos os conhecimentos que me passou, por enfrentar todas as dificuldades que encontramos para a execução do projeto, pela sua simplicidade, amizade, paciência, respeito, perseverança, disponibilidade, compreensão e dedicação. Muito obrigada por tudo!

SILVA, Liliane Andrade da. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM ATIVIDADE ANTI-*Listeria* A PARTIR DE LEITE DE CABRA CRU

RESUMO

Bactérias láticas podem produzir bacteriocinas e têm sido exploradas em aplicações como conservadores naturais nos alimentos. Bacteriocinas são peptídeos e proteínas com atividade antimicrobiana e podem inibir a multiplicação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes* e micro-organismos deterioradores. *L. monocytogenes* pode estar presente em diversos tipos de alimentos, devido à sua capacidade de sobreviver em ampla faixa de temperatura e causar a listeriose através da ingestão de alimentos contaminados. Este estudo objetivou o isolamento e identificação de bactérias láticas (BAL) com potencial anti-*Listeria* de leite de cabra cru, a caracterização dos sobrenadantes livres de células (SLC) quanto: à atividade antimicrobiana; ao espectro de ação; à estabilidade térmica e em diferentes valores de pH; à resistência a agentes químicos e a diferentes concentrações de NaCl; ao modo de ação; à capacidade de adsorção à *listeria* em diferentes condições de temperatura, pH e na presença de agentes químicos. Também visou realizar a identificação molecular dos isolados a fim de aplicar as BAL ou as bacteriocinas por elas produzidas como estratégia de bioconservação de alimentos. Foram isoladas três culturas (LS1, LS2 e LS3) bacteriocinogênicas de leite de cabra cru com atividade anti-*listeria*. Em particular *Lactococcus lactis* (LS2), que produziu bacteriocina bacteriostática, ativa em pH baixo e em temperatura de 4 °C a 80 °C, que pode ser uma alternativa para o controle de *listeria* em produtos lácteos fermentados.

Palavras chaves: Bacteriocinas, bioconservação, bactérias láticas

ABSTRACT

Lactic acid bacteria can produce bacteriocins and have been explored for applications as natural preservatives in foods. Bacteriocins are peptides and proteins with antimicrobial activity and can inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* and other spoilage microorganisms. *L. monocytogenes* can be present in many types of food due to its ability to survive in a wide temperature range, and causes listeriosis by ingestion of contaminated food. This study aimed at the isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) with bacteriocinogenic potential, the characterization of the cell-free supernatants (CFS) regarding: the antimicrobial activity; the spectrum of action; thermal stability and at different pHs; resistance to chemicals and NaCl concentrations; the mode of action of the bacteriocins produced; the adsorption capacity to the target cells in different temperatures, pH and concentrations of chemicals and NaCl; perform the molecular identification of the LAB. Three strains (LS1, LS2 and LS3) bacteriocinogenic of raw goat's milk with anti-*listeria* activity were isolated. In particular *Lactococcus lactis* (LS2), which produced bacteriostatic, active bacteriocin at low pH and 4 ° C to 80 ° C, which can be an alternative for the control of *Listeria* in fermented dairy products.

Keywords: bacteriocins, biopreservation, lactic acid bacteria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	LEITE DE CABRA: Aspectos gerais.....	13
2.2	BACTÉRIAS LÁTICAS: Produção de Bacteriocinas.....	14
2.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	MATÉRIA – PRIMA E COLETA DAS AMOSTRAS.....	19
3.2	CULTURAS BACTERIANAS.....	19
3.3	ISOLAMENTO DAS BAL ATIVAS CONTRA <i>L. monocytogenes</i>	19
3.4	VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADEANTAGONÍSTA DOS SOBRENADANTES.....	20
3.5	NATUREZA PROTEICA DA SUBSTÂNCIA ATIVA NOS SOBRENADANTES.....	21
3.6	INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DOS SOBRENADANTES.....	21
3.7	RESISTÊNCIA DOS SOBRENADANTES A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl E AGENTES QUÍMICOS.....	22
3.8	MODO DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS.....	23
3.9	AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DAS BACTERIOCINAS À <i>L. monocytogenes</i> 711.....	23
3.10	IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS COM ATIVIDADE ANTI- <i>Listeria</i>	24
	REFERÊNCIAS.....	26
4	RESULTADOS.....	30

1 INTRODUÇÃO

O leite constitui um excelente meio de multiplicação de microrganismos devido a sua composição química e alta atividade de água. O leite de cabra é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, além do conteúdo mineral e vitamínico. As bactérias lácticas encontradas no leite de cabra também podem produzir bacteriocinas, sendo sua produção espontânea ou induzida e o estudo destas tem se tornado ferramenta valiosa para a compreensão e aplicação como ingrediente funcional devido a sua importância como conservantes naturais e possíveis substituições de conservantes químicos.

A produção de bacteriocinas por meio das bactérias lácticas faz com que estas bactérias tenham um importante papel biológico e têm concentrado atenção considerável por parte dos pesquisadores e da indústria, decorrente da ação inibitória sobre patógenos e deterioradores de alimentos, e também como potencial de aplicação na terapêutica, podendo inibir a multiplicação de micro-organismos tais como *Listeria monocytogenes*.

L. monocytogenes possui resistência a vários fatores ambientais, em valores de pH próximos de 4,5 e atividade de água 0,92, torna este micro-organismo difícil de controlar nos alimentos. Além disso, esse patógeno pode sobreviver dentro de um amplo intervalo de temperatura (entre 2 °C e 42 °C). Devido à capacidade de sobreviver em baixas temperaturas, geralmente é encontrado em produtos lácteos e alimentos refrigerados. Uma vasta variedade de bactérias lácticas (BAL) possuem a capacidade de inibir crescimento deste patógeno. Entre as substâncias anti-*Listeria* produzidos por LAB, bacteriocinas têm demonstrado uma atividade anti- *Listeria* particularmente forte.

As bacteriocinas oferecem uma série de propriedades desejáveis que tornam adequadas para o uso como conservante de alimentos, sendo definidas como peptídeos e proteínas com atividade antimicrobiana que podem ser utilizadas como alternativa tecnológica para aumentar a vida útil dos alimentos e a segurança alimentar. Podem ser incorporadas nos alimentos de diferentes formas: pelo uso de uma preparação purificada (ou semi-purificada) como ingrediente, pelo uso de ingredientes preparados através de fermentação com bactérias produtoras de bacteriocinas, ou pela utilização de bactérias capazes de produzir bacteriocinas diretamente no alimento. Também podem ser empregadas como antimicrobianos específicos, sendo direcionadas contra patógenos específicos, sem que haja prejuízos, ou seja, sem prejudicar os benefícios da microbiota desejável.

Diante disso, a presente pesquisa objetivou o isolamento e a identificação de bactérias láticas potencialmente produtoras de bacteriocinas com atividade contra *Listeria monocytogenes* a partir de leite de cabra cru e a caracterização das substâncias antimicrobianas envolvidas com a perspectiva de aplicação para a bioconservação de alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE DE CABRA: Aspectos Gerais

O Nordeste brasileiro apresenta um baixo aproveitamento de seu potencial de produção de leite de cabra e derivados apesar do tamanho do rebanho existente e do potencial de exploração, havendo necessidade de mais programas e incentivos para se alcançar um grande desenvolvimento do setor. Dentre os estados brasileiros, a Paraíba possui um rebanho caprino leiteiro na ordem de 653.730 animais e desponta como o maior produtor de leite de cabra do país, com uma produção média de meio milhão de litros por mês, em sua maior parte produzidos por criadores agregados em 22 associações de produtores, na região dos Cariris Paraibanos. Como características comuns à região dos Cariris, além dos baixos índices pluviométricos, da vegetação Caatinga e das limitações pertencentes ao solo predominam cidades pequenas com baixa densidade demográfica e economia baseada na agropecuária, principalmente na criação de caprinos. Nesse contexto a caprinocultura se destaca como atividade eficiente para o desenvolvimento sócio-econômico da região, pela facilidade de adaptação desses animais que produzem proteína animal a baixo custo nas formas de leite e carne para as populações de média e baixa renda (SILVA et al., 2013).

O leite de cabra é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar vários nutrientes importantes para a nutrição humana, apresenta uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, além, de um conteúdo mineral e vitamínico que o qualifica como um alimento de elevado valor nutricional e de grande importância na alimentação infantil devido às suas características de hipoalergenicidade e digestibilidade resultante de glóbulos de gordura diminuídos (COSTA et al., 2008).

Ressalta-se, também, que o leite de cabra possui múltiplas utilizações, e por isto tão difundido e consumido sob as mais diversas formas, seja para subsistência, como matéria prima dos melhores queijos do continente europeu, ou em uso terapêutico e até em cosméticos (CORDEIRO et al., 2009). Sua constituição é excelente meio para a multiplicação de micro-organismos devido a sua composição química e alta atividade de água. As espécies que compõem a microbiota são provenientes de fontes de contaminação como teto e pele do animal durante a ordenha, equipamentos utilizados no processo, embalagens utilizadas no acondicionamento, água e o próprio ambiente (SAMELIS et al., 2009).

Assim como o leite de cabra, o queijo de coalho, como outros tipos de queijos e alimentos podem conter uma série de micro-organismos patogênicos, com destaque para *L.*

monocytogenes e *Staphylococcus aureus*, que são micro-organismos de difícil controle em queijarias, já que *L. monocytogenes* é um contaminante natural de elevada resistência fisiológica, multiplicando-se em temperaturas de refrigeração (MORGAN et al., 2001).

Uma alternativa para prevenir a multiplicação de micro-organismos indesejáveis no queijo, já que a conservação em refrigeração tem pouco efeito sobre os psicotróficos, é o emprego de bactérias láticas produtoras de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, através do processo da bioconservação (DE MARTINIS; FREITAS, 2003). Alguns estudos evidenciam que cepas de várias espécies de bactérias láticas utilizadas como culturas *starters* na produção de queijos são capazes de produzir bacteriocinas *in situ* e podem ser utilizadas no controle de *L. monocytogenes*, assim como de outros patógenos (GARDE et al., 2006; LOESSNER et al., 2003).

2.2 BACTÉRIAS LÁTICAS: Produção de Bacteriocinas

As bactérias láticas formam um grupo de micro-organismos com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. No entanto, não existe uma definição única do termo “bactéria lática”. A definição mais comumente encontrada descreve este grupo como bactérias Gram positivas, não esporuladas, catalase negativas, desprovidas de citocromos, anaeróbias, aerotolerantes, fastidiosas, ácido tolerantes, e com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido lático o principal produto da fermentação de carboidratos (AXELSSON, 2004; CARR, CHILL, MAIDA, 2002; PFEILER, KLAENHAMMER, 2007).

Os principais representantes desse grupo incluem os gêneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconoctoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Desemzia*, *Isobacillum*, *Paralactobacillus*, *Trichococcus* e *Weissella* (MOHANIA et al., 2008). A classificação em diferentes gêneros é baseada na morfologia, modo de fermentação da glicose, multiplicação em diferentes temperaturas, configuração do ácido lático produzido, capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas e tolerância a condições ácidas e básicas (AXELSSON, 2004; HOLZAPFEL, 2001).

Os grupos de diversos micro-organismos que as bactérias láticas representam estão presentes em *habitats* ricos em nutrientes como alimentos, particularmente em produtos lácteos, carnes e vegetais, sendo também constituintes normais da microbiota da boca, intestino e vagina de mamíferos. Devido a sua capacidade de produzir compostos aromáticos, as bactérias láticas são bastante utilizadas na fabricação de vários alimentos e bebidas, com aplicação como culturas *starters* nos derivados de leite, como queijos de diversos tipos,

iogurtes, manteiga e leite fermentado, entre outros produtos, conferindo a esses produtos características sensoriais únicas (CARR, CHILL, MAIDA, 2002; PFEILER, KLAENHAMMER, 2007; SCHROETER, KLAENHAMMER, 2009).

As bactérias láticas são capazes de produzir uma série de substâncias antimicrobianas como ácido lático, peróxido de hidrogênio, diacetil, e outros ácidos orgânicos. Além desses produtos finais resultantes do metabolismo, algumas cepas são também capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de natureza proteica, denominados bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2008). A capacidade das bactérias láticas produzirem bacteriocinas faz com que estas bactérias tenham um importante papel biológico (DEEGAN et al., 2006). De maneira geral, as bacteriocinas são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, sintetizados nos ribossomos das bactérias, que possuem atividade antimicrobiana, e que não possuem atividade contra as bactérias que as produziram. As bacteriocinas variam consideravelmente em peso molecular, propriedades bioquímicas, espectro e mecanismo de ação (DE MARTINIS et al., 2002; GÁLVEZ et al., 2008).

As bacteriocinas de bactérias láticas oferecem uma série de propriedades desejáveis que as tornam adequadas para o uso como conservantes de alimentos: são produzidas por bactérias GRAS; não são ativas e não são tóxicas às células eucarióticas; são inativadas por enzimas digestivas e têm pequena influência na microbiota intestinal; são normalmente tolerantes a ampla faixa de pH e temperatura; podem ter amplo espectro de ação; têm ação bactericida; e seus determinantes genéticos estão normalmente codificados em plasmídeos, facilitando a manipulação genética (GÁLVEZ et al., 2007).

Na natureza, a produção de bacteriocinas pode ser detectada tanto em micro-organismos Gram-positivos quanto em Gram-negativos, porém os Gram-positivos estão relacionados com uma maior diversidade e abundância de produção que as bactérias Gram-negativas. Contudo, as bacteriocinas produzidas por bactérias láticas (BAL) têm concentrado atenção considerável por parte dos pesquisadores e da indústria devido ao seu potencial como bioconservante em alimentos, decorrente da ação inibitória sobre patógenos e deterioradores de alimentos, podendo trazer uma série de benefícios, tais como extensão de vida de prateleira, proteção extra durante condições de abuso de temperatura, diminuição de risco de transmissão de micro-organismos patogênicos na cadeia de alimentos, redução da necessidade de aplicação de conservantes químicos e possibilidade de uso de tratamentos térmicos mais brandos (GÁLVEZ et al., 2007; KAUR et al., 2011).

Diversas classificações foram propostas para bacteriocinas, sendo a mais recente a proposta por Heng et al. (2007). As bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram positivas são agrupadas em quatro classes, de acordo com sua estrutura química e função biológica:

- Classe I - peptídeos lanbióticos (que possuem o aminoácido lantionina (Lan) em sua estrutura), subdivididos em três grupos: a – bacteriocinas com estrutura linear; b – bacteriocinas com estrutura globular; c – bacteriocinas formadas por mais de um componente;

- Classe II - peptídeos não modificados (não-lantibióticos e não cíclicos), de peso molecular inferior a 10 kDa, também subdivididos em três grupos: a – bacteriocinas ativas contra *L. monocytogenes*; b – bacteriocinas multi-componentes, que precisam de dois ou mais peptídeos para ser ativas; c – bacteriocinas variadas, de baixo peso molecular e que não se enquadram em a e b;

- Classe III: peptídeos de peso molecular superior a 10 kDa, subdivididos em dois grupos: a – peptídeos que agem causando a lise celular; b – bacteriocinas de alto peso molecular que inibem o desenvolvimento das células alvo por outros meios que não a lise celular; e

- Classe IV: proteínas cíclicas

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, sendo mais dependente dos fatores relacionados à espécie bacteriana e de suas condições de crescimento do que uma característica relacionada à sua própria molécula. A ação pode promover um efeito letal bactericida, sem lise ou com lise celular, ou ainda inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (SCHULZ et al., 2005).

Aparentemente a maioria das bacteriocinas de BAL já caracterizadas tem um mecanismo de ação comum, no qual se ligam a receptores na membrana celular da bactéria-alvo. Em seguida ocorre inserção das bacteriocinas na membrana causando dissipação da força próton-motriz e agregação de monômeros, com modificações no potencial de membrana e no gradiente de concentração de íons de hidrogênio. Tais efeitos, em micro-organismos vivos, levam à formação de poros na membrana citoplasmática provocando a saída de compostos pequenos ou alteram a força próton-motora necessária para a produção de energia e síntese de proteínas, o que pode acarretar na perda de viabilidade da célula-alvo (MARTINS et al., 2006; DELBONI, 2008).

A nisina foi a primeira bacteriocina a ser comercializada na Inglaterra em 1953 e, desde então, o uso está aprovado em 48 países, inclusive o Brasil (DEGAN et al., 2006). Ela foi reconhecida como aditivo alimentar pela Food and Agriculture Organization / World Health Organization (FAO/WHO) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades

Internacionais por quilograma de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite e derivados lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (DE MARTINIS, ALVES, FRANCO, 2002). Porém, algumas das maiores desvantagens do uso da nisina revelam-se: a inibição de muitas bactérias lácticas; a existência de culturas resistentes; a enorme variação de sensibilidade apresentada pelas culturas sensíveis e as limitações com relação ao seu espectro de ação e também sua baixa solubilidade em pH básico (NOGUEIRA, 2010; SANT'ANNA, 2010). Além da nisina, a pediocina PA-1 é a mais recente bacteriocina que está licenciada como conservante de alimentos (BALCINAS et al., 2013).

Para que as bacteriocinas possam ser aplicadas em alimentos, seu potencial deve ser previsto por meio de avaliação de suas propriedades. Dentre essas propriedades destacam-se estabilidade a temperatura, pH e espectro de ação. Dessa forma, visando obter bacteriocinas úteis para a comercialização, se faz necessária a avaliação das bacteriocinas em condições comuns em alimentos, bem como os fatores que devem proporcionar uma produção otimizada de bacteriocina. A eficiência das bacteriocinas no alimento pode ser afetada pela ligação das bacteriocinas aos componentes do alimento ou na inativação das bacteriocinas por proteases. Outros fatores além de afetar a eficiência das bacteriocinas, podem influenciar na difusão das bacteriocinas em alimentos, tais como concentração de sal, pH, nitrito e nitrato, fase aquosa disponível para difusão, conteúdo lipídico e superfície lipídica disponível para solubilização (VAUGHAN et al., 1994; NAVARRO et al., 2000).

2.3 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é vastamente distribuído na natureza e pode ser encontrado no solo, fezes de animais, vegetação e água entre outros. Esse gênero é composto por micro-organismos Gram positivos formadores de esporos, catalase positivos e produtores do ácido láctico a partir de glicose e outros açúcares. As espécies mais conhecidas são: *L. grayi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. inananis*.

A espécie de maior importância na microbiologia de alimentos é *Listeria monocytogenes*, por ser patogênica, e o seu principal fator de virulência é a listeriosina O, responsável pela lise de eritrócitos e destruição de células fagocíticas (JAY et al., 2005). O período de incubação da listeriose é de 1 a 7 dias, o que dificulta a identificação do alimento causador. Os principais sintomas são parecidos com os de uma gripe, podendo ocorrer dores abdominais e diarreia, porém a taxa de letalidade de pessoas que desenvolvem a doença é

muito alta, de 20 a 30 % (WARRINER; NAMVAR, 2009; NEWELL et al. 2010; TODD; NOTERMANS, 2011).

A listeriose humana pode ser causada pela ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*, sendo particularmente perigosa em gestantes, recém-nascidos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, cirrose, carcinoma e outras doenças que provocam o comprometimento do sistema imunológico. A dose infectante depende da patogenicidade e da virulência da cepa de *L. monocytogenes* envolvida na infecção, bem como o estado de saúde e fatores de risco do hospedeiro (SWANINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Os níveis de *L. monocytogenes* em alimentos que causaram a listeriose em adultos têm variado entre 10^5 e 10^9 UFC / g. *L. monocytogenes* possui resistência a vários fatores ambientais, em valores de pH próximos de 4,5 e atividade de água 0,92, torna este micro-organismo difícil de controlar nos alimentos. Além disso, esse patógeno pode sobreviver dentro de um amplo intervalo de temperatura (entre 2 °C e 42 °C). Devido à capacidade de sobreviver em baixas temperaturas, geralmente é encontrado em produtos lácteos, vegetais, carne, cachorros-quentes e alimentos refrigerados (WANG et al., 2013).

Uma vasta variedade de bactérias lácticas (BAL) possuem a capacidade de inibir crescimento deste patógeno. Mesmo em laboratório, podem produzir substâncias inibidoras ativa contra *L. monocytogenes*. Entre as substâncias anti-*Listeria* produzidos pela LAB, bacteriocinas têm demonstrado uma atividade anti-*Listeria* particularmente forte (PINGITORE et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA – PRIMA E COLETA DAS AMOSTRAS

Dezoito amostras de leite de cabra cru foram coletadas na primeira ordenha manual diária, de produtores da região do Cariri Paraibano (dez amostras de Monteiro, seis amostras de Santo André e duas amostras de Gurjão). As amostras não tratadas termicamente (crus) foram coletadas de forma asséptica em recipientes esterilizados, com acondicionamento em refrigeração (4-7 °C) e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Nutrição no campus I da Universidade Federal da Paraíba e processadas até 24 h após a coleta.

3.2 CULTURAS BACTERIANAS

As culturas utilizadas para determinar a atividade antagonística dos sobrenadantes dos isolados, foram obtidas a partir de culturas cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP e Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, como segue: *Listeria monocytogenes* (Scott A, ATCC 7644, L506, L620, L302, L211, L409, 711), *Enterococcus faecium* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 29214, *Salmonella spp* 29, *Lactobacillus casei* BGP 93, *Bifidobacterium lactis* BLC1, *Bifidobacterium lactis* Bb12®, *Lactobacillus acidophilus* LA3, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (YF L812), *Streptococcus termophilus* (YF-L812), *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (R-704).

3.3 ISOLAMENTO DAS BAL ATIVAS CONTRA *L. monocytogenes*

Alíquotas de 10 mL das amostras de leite de cabra foram diluídas em 90 mL de água peptonada a 0,1 % estéril e homogeneizadas em vórtex Mixer por alguns segundos. Diluições decimais seriadas até diluição 10^{-4} foram semeadas em ágar MRS (de Man, Rogosa e Sharpe, Himedia, India). Para as amostras coletadas na cidade de Monteiro, o isolamento das bactérias lácticas com potencial bacteriocinogênico foi realizado com os plaqueamentos de 0,1 mL de cada diluição em superfície e incubadas a 30 °C e 37 °C/ 48-72 h tanto em anaerobiose (Permutation, Paraná; Probac do Brasil, São Paulo) quanto aerobiose. Já as diluições das amostras das cidades de Santo André e Gurjão foram semeadas em superfície e incubadas a

25 °C, 30 °C e 35 °C/ 48-72 h em anaerobiose e também 1 mL de cada diluição em profundidade nas mesmas condições de temperatura e tempo. A metodologia empregada foi a mesma adotada por Moraes et al. (2010), com adaptações. Após a incubação foi verificada a coloração e morfologia das colônias formadas, escolhendo-se um número representativo nas placas que apresentaram até 50 colônias. Em seguida, as escolhidas foram transferidas para caldo MRS, incubando-se nas mesmas condições de isolamento e fez-se sua purificação estriando em placas contendo meio MRS. As culturas puras foram classificadas de acordo com a coloração de Gram e o teste de produção de catalase, e armazenadas sob congelamento em caldo MRS contendo glicerol a 30% v/v.

3.4 VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DOS SOBRENADANTES

Para verificar o espectro de ação dos sobrenadantes dos isolados, dezenove culturas Gram positivas e catalase negativa isoladas em MRS, foram testadas quanto à atividade antagonística frente aos micro-organismos apresentados no item 3.2 usando a técnica descrita por Rosa et al. (2002) em conjunto com o método *spot on the lawn* descrito por Van Reenen et al. (1998), com modificações. Para isso, as culturas isoladas foram transferidas para tubos contendo caldo MRS e incubadas a 35 °C por 24 h. Uma alíquota de 1 mL dessas culturas foi coletada e centrifugada a 14000 rpm por 10 min a 4 °C (MPW-351R, Biosystems, Brasil). Os sobrenadantes das culturas foram aquecidos a 80 °C durante 10 min em banho de água (Nova Técnica, São Paulo, Brasil). O pH dos sobrenadantes foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M estéril e 10 µL adicionados na superfície de placas de Petri contendo 20 mL de BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8 % de ágar) e contendo 10^5 - 10^6 UFC/mL dos micro-organismos. Procedeu-se da mesma forma para os micro-organismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, substituindo-se o meio BHI por meio MRS semi-sólido. As placas foram incubadas por 18-24 h a 37 °C e observou-se a formação do halo de inibição. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias por mililitro de sobrenadante livre de células (UA/mL) (ROSA et al., 2002) e o micro-organismo mais sensível, isto é, que apresentou maior inibição, foi selecionado como o indicador para os testes posteriores.

3.5 NATUREZA DA SUBSTÂNCIA ATIVA NOS SOBRENADANTES

Os sobrenadantes dos isolados que apresentaram atividade anti-*Listeria* no teste de antagonismo *spot on the lawn*, denominados LS1, LS2 e LS3, foram submetidos ao teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas produzidas frente a proteases (De Martinis e Franco (1998), sendo tratados com as enzimas pepsina, α - quimiotripsina de pâncreas bovino tipo II e protease tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), todas na concentração de 1,0 mg/mL, pesando-as e transferindo para os tubos contendo os sobrenadantes filtrados em membranas (Millex GV 0,22 μ m, Merck Millipore, Estados Unidos). Após a adição da enzima ao sobrenadante, os tubos foram mantidos a 37 °C por 1 h e em seguida a 97 °C por 3 min para inativação enzimática. As misturas foram resfriadas até a temperatura ambiente e submetidas ao teste de antagonismo conforme descrito no item 3.4. Os Controles testados foram os sobrenadantes sem tratamento enzimático mas aquecidos a 97°C por 3min; sobrenadantes sem tratamento enzimático e sem aquecimento; e água destilada estéril.

Os isolados cujos sobrenadantes perderam atividade sobre o micro-organismo indicador *L. monocytogenes* 711 (micro-organismo patogênico que apresentou maior inibição pelos isolados) após o tratamento com as enzimas foram considerados produtores de bacteriocinas.

3.6 INFLUÊNCIA DO pH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ANTAGONÍSTICA DOS SOBRENADANTES

A influência do pH e temperatura na atividade antagonística dos sobrenadantes dos isolados selecionados (LS1, LS2 e LS3) foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Todorov e Dicks (2006). Para avaliar a influência do pH, os sobrenadantes dos isolados tiveram os valores de pH ajustados de 2,0 a 12,0 (com acréscimos de uma unidade) com solução de NaOH 1 M ou HCl 1 M estéreis. Os sobrenadantes foram mantidos nestas condições a 25 °C por 30 min, 1 h e 2 h; os valores de pH corrigidos para pH 6,0 com adição de HCl ou NaOH 1M, e, então, foram diluídos em placas de microtitulação, nas proporções 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 em água ultra-purificada esterilizada e 10 μ L de cada diluição foram transferidos para placas contendo a cultura indicadora de *L. monocytogenes* 711 (10^5 - 10^6 UFC/mL) As placas foram incubadas a 37 °C por 18-20 h e os resultados

expressos em UA/mL, correspondentes à máxima diluição com formação de halo de inibição (ROSA et al., 2002).

Para avaliar a influência da temperatura, os sobrenadantes dos isolados selecionados foram submetidos ao teste de estabilidade térmica, realizado conforme descrito em Albano et al. (2007), sendo 1 mL do sobrenadante de cada isolado transferido para um microtubo e mantido por 1 h e 2 h a 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C e por 15 min a 121 °C. Para os ensaios a 4 °C, 45 °C e 100 °C utilizou-se o banho seco (VHD, Biosystems, Pinhais, Paraná); para os ensaios de 25 °C, 30 °C e 37 °C utilizaram-se as estufas com controle de temperatura; para os ensaios a 60 °C e 80 °C utilizou-se o Banho-Maria ultratermostático (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo). O experimento a 121 °C foi realizado em autoclave. Para avaliação da atividade antagonística residual dos sobrenadantes após o tratamento térmico, estes foram submetidos às mesmas diluições e metodologia.

3.7 RESISTÊNCIA DOS SOBRENADANTES A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl E AGENTES QUÍMICOS

Os sobrenadantes dos isolados selecionados também foram testados quanto à resistência a diferentes concentrações de NaCl e agentes químicos. Os testes foram realizados de acordo com Todorov e Dicks (2006).

Para testar a influência de agentes químicos, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para um microtubo ao qual se adicionou Tween 20 1 % (p/v) (Synth, São Paulo, Brasil) ou Tween 80 1 % (p/v) (Synth, São Paulo, Brasil) e submeteu-se ao teste de atividade antagonística descrito no item 3.4.

Quanto à resistência ao NaCl, 1 mL do sobrenadante de cada isolado foi transferido para microtubos ao qual se adicionou NaCl de forma a atingir as concentrações de 1 %, 2 %, 3 %, 4 % e 5 %. Os microtubos foram mantidos a 7 °C por 1 h, e em seguida, a atividade antagonística do sobrenadante foi determinada conforme descrito no item 3.4 e empregando diluição até 1:128.

Controles foram incluídos para todas as condições testadas, correspondendo à não adição dos sobrenadantes dos isolados em avaliação e incluindo água destilada estéril.

3.8 MODO DE AÇÃO DAS BACTERIOCINAS

Os isolados que apresentaram atividade antagonística nos testes de influência do pH, temperatura e resistência a diferentes concentrações de NaCl e agentes químicos, tiveram seus sobrenadantes testados quanto ao modo de ação frente ao micro-organismo indicador (Todorov e Dicks, 2004). Para os testes, 20 mL dos sobrenadantes livres de células das culturas tiveram seu pH ajustado para 6,0 e foram esterilizados por filtração em membrana (Millex GV 0,22 µm, Merck Millipore, Estados Unidos) e adicionados à 100 mL de uma cultura de *L. monocytogenes* 711 obtida em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Índia) incubado a 37 °C por 3 h, e com densidade óptica 0,1 – 0,2 em 600 nm. A mistura foi incubada a 37 °C, efetuando-se leituras da densidade óptica em 600 nm a cada hora, durante 12 h. Em paralelo, os sobrenadantes também foram adicionados à cultura de *L. monocytogenes* 711 obtida em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Índia) incubado a 37 °C por 18 h. E neste caso, a leitura foi realizada só após as 18 h de tratamento. Pois esta foi à condição inicialmente adotada em todos os testes anteriores de avaliação do potencial antimicrobiano dos isolados. O sobrenadante que apresentou atividade bacteriostática foi utilizado para avaliação da adsorção das bacteriocinas.

3.9 AVALIAÇÃO DA ADSORÇÃO DAS BACTERIOCINAS À *L. monocytogenes* 711

A adsorção das bacteriocinas produzidas às células-alvo foi avaliada em diferentes condições de pH e temperatura (YILDIRIM; AVŞAR E YILDIRIM, 2002), utilizado-se o isolado que apresentou modo de ação frente ao microrganismo indicador e uma cultura *L. monocytogenes* 711 obtida em caldo BHI a 37 °C por 24 h e centrifugada a 5200 rpm por 15 min (MPW-351R, Biosystems, Brasil). As células foram lavadas duas vezes em solução salina estéril com pH 6,5 (NaCl 0,85 %) e ressuspensas de forma a obter uma suspensão com densidade óptica fixa a 600 nm. A suspensão foi fracionada em alíquotas de 5 mL e o pH ajustado para 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 com HCl 1 M ou NaOH 1 M estéril. Em seguida, cada suspensão celular foi misturada com o mesmo volume de sobrenadante do isolado bacteriocinogênico esterilizado por filtração em membrana (Millex GV 0,22 µm, Merck Millipore, Estados Unidos) e incubada a 37 °C durante 1 h. O teste de antagonismo conforme item 3.4 foi realizado com diluição até 1:128, antes e após o período de incubação.

Para avaliar a influência da temperatura na adsorção das bacteriocinas seguiu-se o mesmo procedimento citado para a obtenção da suspensão celular de *L. monocytogenes* 711. Em seguida, o pH da suspensão celular foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M estéril e

alíquotas de 5 mL foram adicionadas a tubos contendo o mesmo volume de sobrenadante do produtor de bacteriocinas. Os tubos foram incubados por 1 h a 4, 25, 30 e 37 °C e o teste de antagonismo conforme item 3.4 foi realizado antes e após o período de incubação.

A adsorção das bacteriocinas produzidas pelos sobrenadantes às células-alvo foi avaliada também quanto à influência de agentes de acordo com o método descrito por Albano et al. (2007). Uma cultura de *L. monocytogenes* 711, obtida em caldo BHI a 37 °C por 24 h, foi centrifugada 5200 rpm por 15 min (MPW-351R, Biosystems, Brasil). As células foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 5 mM estéril (pH 6,5) e ressuspensas no mesmo tampão, de forma a obter uma suspensão com densidade óptica igual a 600 nm. Alíquotas de 1 mL da suspensão celular foram tratadas com 1 % (p/v) de Tween 80 e NaCl. O pH de todas as suspensões foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 M ou HCl 1 M. Em seguida, o sobrenadante produtor de bacteriocinas foi adicionado às células tratadas e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 h. Após incubação, as suspensões foram centrifugadas (5200 rpm por 15 min, 4 °C) e a atividade dos sobrenadantes foi determinada através do teste descrito no item 3.4, realizado antes e após o período de incubação.

3.10 IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS COM ATIVIDADE ANTI-*Listeria*

Os isolados LS1, LS2 e LS3 foram identificados através do sequenciamento do gene da fração 16S do rRNA. A extração do DNA utilizando CTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio) foi realizada segundo OLIVEIRA (2002). Ao microtubo que continha 250 µL de cada uma das amostras, foram adicionados 100 µL de cloreto de sódio (NaCl) 5 M e 100 µL de CTAB pré-aquecido a 65 °C. A suspensão foi agitada por dez segundos até obter-se aspecto leitoso, com posterior incubação a 65 °C por dez min. Após esse período adicionaram-se 750 µL de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), agitando-se por dez segundos com movimentos leves e, em seguida, centrifugando-se em temperatura ambiente por 5 min a 16.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionaram-se 450 µL de etanol absoluto a -20 °C, incubando-se durante 10 min a -20 °C, centrifugando-se durante 20 min a 16.000 rpm, a 4 °C, eliminando-se o álcool e acrescentando-se 500 µL de etanol a 70 % em temperatura ambiente, seguindo-se o mesmo procedimento de centrifugação anteriormente citado. O álcool foi eliminado novamente e o microtubo contendo o *pellet* foi submetido à secagem a 56 °C em banho seco (Termolyne Type 16500, Dri Bath). Após a completa secagem do *pellet*, adicionaram-se 50 µL de tampão de diluição (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) pH 8,0 previamente aquecido a 56 °C. As

amostras de DNA foram mantidas em temperatura ambiente por 20 min e posteriormente armazenadas à temperatura de -20 °C até sua utilização na PCR.

As amostras foram inseridas em termociclador Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), com o programa de amplificação com desnaturação inicial de 3 min a 95 °C seguida da repetição de 25 ciclos com permanência de 30 s a 94 °C para a desnaturação, 30 s a 52 °C para hibridação dos iniciadores e 1 min e 40 s a 72 °C para extensão e subsequente extensão final a 72°C por 7 min e redução da temperatura para 4 °C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 0,9 %. Os primers utilizados para o sequenciamento e PCR foram 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (LANE et al., 1991) e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (TURNER et al., 1999).

Os produtos de amplificação foram purificados (*Cycle pure kit*, E.Z.N.A, Georgia, United States) em mini-colunas (*Hibind DNA mini colum*, Georgia, United States), e sequenciados em sequenciador automático (Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer – Hitachi, Tokio, Japão). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *Big Dye terminator V3.1 kit for Applied Biosystems* (Carlsbad, California, EUA). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa BioEdit (*BioEdit Sequence Aligment Editor*, Carlsbad, California), e comparadas com as sequências de genes de micro-organismos depositadas na base de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.gov/Genbank) e do RBD (*Ribossomal database Project*, East Lansing, EUA) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

REFERÊNCIAS

- ALBANO, H.; TODOROV, S.D.; REENEN, C.A.; HOGG, T.; DICKS, L.M.T; TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p.239-247, 2007.
- AXELSSON, L.T.L. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (eds.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, p. 1-66, 2004.
- BALCINAS, E. M.; MARTINEZ F. A. C.; TODOROV S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. DE S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review, **Food Control**, v.32, p.134-142, 2013.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p.281-370, 2002.
- CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. **A produção de leite de cabra no Brasil e seu mercado**. In: Encontro de Caprinocultores de Minas e média Mogiana, 10, Espírito Santo do Pinhal, maio 2009. p.1-7.
- COSTA, R. G.; MESQUITA, Í. V. U. ; QUEIROGA, R. C. R. E. ; MEDEIROS A. N. de, Carvalho, F. F. R. de; FILHO, E. M. B. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.694-702, 2008.
- DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sake* strain. **International Journal Food Microbiology**, v 42, p. 119-126, 1998.
- 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 e 3, p. 191-208, 2002.
- DE MARTINIS, E.C.P.; FREITAS, F.Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control**, v. 14, n. 3, p. 197-200, 2003.
- DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.; Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf life extension, **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006.
- DELBONI, R. R. **Dinâmica populacional de microrganismos e a conservação de alimentos**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação de mestrado.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu. p. 46-50, 2008.

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

GÁLVEZ, A.; LOPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B.; Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125–152, 2008.

GARDE, S.; AVILA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 840-849, 2006.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. In: Riley, M.A., Chavan, M.A. (Eds.), Bacteriocins: Ecology and Evolution. **Springer-Verlag**, p. 45- 92, 2007.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S-373S, 2001.

JAY, J.M.; LOESSNER, M., GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology** 7th Edition, Springer, New York, NY, USA, p. 790, 2005.

KAUR, G.; MALIK, R. K.; MISHRA, S. K.; SINGH, T. P.; BHARDWAJ, A.; SINGROHA, G.; VIJ, S.; KUMAR, N. Nisin and class II bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Microbial Drug Resistance**. Vol 00, n. 00, 2011.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M., eds. Nucleic acid techniques in bacterial systematic. John Wiley and Sons, New York, NY, p. 115-175, 1991.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S., STEFFAN, S.; SCHERER, S. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.3, 1854-1857, 2003.

MARTINS, A. D. O.; MENDONÇA, R.C.S.; SILVA, D. L.; RAMOS, M. S.; MARTINS, M. C.; DONZELE, J. L.; ANDRADE, N. J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, n.1, p. 53-59, 2006.

MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive Diseases**, v.9, n.4, p. 190-198, 2008.

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 potential. **Food Science and Technology**, v.43, p. 1320-1324, 2010.

MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M-P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal Food Microbiology**, v 64, p. 217-221, 2001.

NAVARRO, L.; ZARAZAGA, M.; SAENZ, J.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **Journal Applied Microbiology**, v.88, n.1, p. 44-51, Jan. 2000.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139 p. S3–S15, 2010.

NOGUEIRA, V. C. **Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservante**. Piracicaba, 2010. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, D. E. **Infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) e vírus do papiloma humano (HPV), expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe**. 2002. 117 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. Disponível em: http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064056P5/2002/oliveira_de_dr_bo_tfm_prot.pdf.

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

PINGITORE, E. V.; TODOROV, S. D.; SESMA, F.; FRANCO, B. D. G. M. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v.32, p.38-47, 2012.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M.; MONTVILLE, T. J., CHIKINDAS, M. L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.

SANT'ANNA, V. **Modelagem cinética de inativação térmica do peptídeo antimicrobiano P34 em sistemas alimentares**. Porto Alegre, 2010. 98f. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do rio Grande do Sul.

SAMELIS, J.; LIANOU, A.; KAKOURI, A.; DELBÈS, C.; ROGELJ, I.; BOGOVIC-MATIJASIĆ, B.; MONTEL, M.C. Changes in the microbial composition of raw milk induced by thermization treatments applied prior to traditional Greek hard cheese processing. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 4, p.783 -790, 2009.

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.292, p.1–6, 2009.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.4, p.403-411, 2005.

SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; SILVA, G. A.; AZEVEDO, S. S.; GOMES, T. L. S. Caracterização dos Sistemas Produtivos de Leite de Cabra nos Cariris Paraibano. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 1, p. 63-71, jan.-mar., 2013.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n.10, p. 1236-43, 2007.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22 p. 1484-1490, 2011.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. **Folia Microbiologica**, v.49, p.406–10, 2004.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria, Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, v.41, p.11–19, 2006.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. **Anaerobe**, v.15, n.3, p.65-73, 2010.

TURNER, S., PRYER, K.M., MIAO, V. P. W., PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, p.327–338, 1999.

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

VAUGHAN, E. E.; CAPLICE, E., LOONEY, R.; O'ROURKE', N.; COVENEYL, H.; DALY, C.; FITZGERALD, G. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 118-123, Feb.1994.

WANG, G.; NING, J.; ZHAO, J.; HANG, F.; TIAN, F.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, W. Partial characterisation of an anti-listeria substance produced by *Pediococcus acidilactici* P9. **International Dairy Journal**, p. 1-5, 2013.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with *Listeria*? **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 245-254, 2009.

YILDIRIM, Z.; AVŞAR, Y.K.; Yildirim, M. Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. **Microbiological Research**, v.157, p. 103-107, 2002.

4. RESULTADOS

Os resultados da pesquisa estão em forma de artigo científico que foi submetido em março de 2014, à revista científica Food Control, com Qualis A1 e Fator de impacto 3.006.

Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria strains isolated from goat milk of Brazilian semi-arid region

Liliane Andrade da Silva^a, Annie Evelyn Solto Raposo^b, Kleber de Sousa Oliveira^c
Evandro Leite de Souza^d, Marciane Magnani^e, Octávio Luiz Franco^c, Haíssa Roberta
Cardarelli^{b,*}.

^aPostgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Engineering,
Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

^bDepartment of Food Technology, Center of Technology and Regional Development, Federal
University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

^cLaboratory of Genome Sciences and Biotechnology, Center of Proteomic and Biochemical
Analyses, Catholic University of Brasília, Distrito Federal, Brazil.

^dLaboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Center of Health Sciences,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

^eLaboratory of Food Biochemistry, Department of Food Engineering, Center of Technology,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

* Corresponding author: Department of Food Technology, Center of Technology and
Regional Development, Federal University of Paraíba, Avenida dos Escoteiros, s/n,
Mangabeira VII, Distrito de Mangabeira, João Pessoa, Paraíba, 58055-000, Brazil
Tel: +55 83 32167947, E-mail: hrcarda@gmail.com

Abstract

Lactic acid bacteria have been used as natural biopreservatives in foods and can produce bacteriocins, which are peptides or small proteins with antimicrobial activity against spoilage micro-organisms and food borne pathogens as *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* is widespread in foods because it survives in a large range of temperature and can cause listeriosis in humans by contaminated food ingestion. The aim of the study was isolate lactic acid bacteria (LAB) with anti-*Listeria monocytogenes* activity from raw goat milk and characterize their inhibitory cell free supernatant. A total of 19 isolated were obtained and three presented production of bacteriocins against *L. monocytogenes*, identified by 16S rDNA as *Weissella cibaria* (LS1) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LS2) and (LS3). The cell-free supernatants (CFS) of LS2 showed the highest anti-*Listeria* activity after 2 h of treatment at pH 6.0 together with CFS of LS3 after 1 h at pH 7.0 (activity of 1600 AU/mL). CFS of LS3 maintained the anti-*Listeria* activity of 1600 AU/mL in the temperature range from 4 °C to 80 °C after 1 h of exposure. The CFS of LS1, LS2 and LS3 showed a bacteriostatic mode of action. The highest adsorption (100%) of anti-*Listeria* bacteriocins produced by LS2 to *L. monocytogenes* cells occurred at 30 °C and 37 °C as well as in pH values 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0. Results demonstrated that *Lactococcus lactis* (LS2) has potential for future application as source of bacteriocins and biopreservative culture against *L. monocytogenes* in foods.

Keywords: raw goat milk, lactic acid bacteria, bacteriocins, biopreservation, inhibitory activity, *Listeria monocytogenes*

1. Introduction

Goat milk is one of the most complete foods, its chemical composition is constituted by high biological value proteins and essential fatty acids, in addition to mineral and vitamin content (Costa et al., 2008). Goat milk is also an important component of human nutrition in semi-arid regions of Brazil, and its production is partially supported by Brazilian government to improve the nutritional status of the population in underdeveloped areas (Oliveira et al., 2011). Lactic acid bacteria (LAB) are naturally found in raw goat milk, and to survive in this milk, LAB can produce compounds with activity against other bacteria, named bacteriocins. The selection of new strains of lactic acid bacteria for biotechnological interest and the exploitation of their potentialities is related to their ability to compete with other

microorganisms. In this context, the study of bacteriocin production by LAB is a valuable tool for understanding and applying them as functional food ingredients due to their importance as natural preservatives (Gálvez et al., 2008).

Bacteriocins are generally small cationic and thermo stable peptides, which possess antimicrobial activity. These molecules showed variations regarding their molecular weight, biochemical properties, spectrum and mechanism of action (De Martinis et al, 2002; Gálvez et al., 2008). Bacteriocins produced by LAB can inhibit growth and survival of pathogenic and spoilage microorganisms in foods (Kaur et al., 2011). Assayed in food-based systems, bacteriocins from LAB inhibit *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tyrobutyricum* and *Listeria monocytogenes* (Bizani et al., 2008; Nielsen et al., 2010). However, important aspects must be considered for the use of bacteriocins in preservation of foods products. The inhibitory activity of the bacteriocin should be maintained in a range of pH values, have stability at high temperature or salts concentration, as well as be active in the presence of some chemical additives (Batdorj et al., 2006; Albano et al., 2007).

The *Listeria* genus is widely distributed in nature and *L. monocytogenes* species have great importance to food industry due listeriosis occurrence after intake of foods contaminated with cells of these bacteria. *L. monocytogenes* can survive at low temperatures and has ability to form biofilms in processing plants, affecting the dairy industry, and is usually found in dairy products, as reported in previous studies (Kousta et al., 2010; Barbuddhe et al., 2012; Wang et al, 2013).

Considering the importance of microbiological safety of dairy products regarding contamination with *Listeria* genus and the economic impact of goat milk in the Brazilian semi-arid region, the aim of this study was to isolate and identify LAB from raw goat milk with activity against *L. monocytogenes* as well as partially characterize the active cell-free supernatants for future application as anti-*Listeria* biopreservative in dairy products.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Collection and Bacterial Strains

Samples of raw goat milk were directly obtained from producers of small farms of Cariri, Paraíba, Brazil, after manual milking, under sterile conditions, and refrigerated (4-7 °C) until arrival at the Laboratory of Microbiology (Department of Nutrition, Federal

University of Paraíba) where they were processed within 24 h for the isolation of lactic acid bacteria with possible anti-*Listeria* activity.

The bacterial strains used as indicators to determine the inhibitory activity of the cell-free supernatants (CFS) were obtained from two Collections of Microorganisms belonging to the Laboratory of Food Microbiology, Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo and also to the Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba. The pathogenic and non-pathogenic microorganisms are listed in Table 1.

2.2 Isolation of LAB from Raw Goat Milk

The isolation of LAB from Raw Goat Milk was performed according to Moraes et al. (2010) with adaptations. Briefly, aliquots of 10 mL of goat milk were added of 90 mL of 1 g/L peptone water. Serially dilutions were prepared, 0.1 mL was inoculated on de ManRogosa and Sharpe (MRS - Himedia, India) surface and incubated at 30 °C and 37 °C for 48-72 h under aerobic conditions and anaerobically at 25 °C, 30 °C and 35-37 °C for 48-72 h. An aliquot of 1 mL from all dilutions were also assayed pour plating at the same incubation and time conditions. Representative number of colonies with different morphologies and colors were picked from plates presenting 50 colonies maximum. The selected colonies were re-cultivated in MRS broth and spread-plated onto MRS agar under the same time-temperature conditions of the isolation step. The pure cultures were Gram stained and catalase production tested (Chapaval et al. 2009) before storage at -20 °C in 30 % glycerol MRS broth.

2.3 Inhibitory activity of the cell-free supernatants (CFS)

In order to verify the inhibitory spectrum of action of the CFS, nineteen isolates classified as LAB were tested for inhibitory activity against microorganisms listed in Table 1, according to Rosa et al. (2002) and Van Reenen et al. (1998) with modifications. Briefly, 10 µL of CFS (adjusted to pH 6.0) and sterilized by membrane filtration (Millex GV 0,22 µm, Merck Millipore, USA) were spotted onto the surface of plates inoculated with 10^5 to 10^6 CFU/mL of each microorganism in selective medium, under ideal conditions of temperature for 24 h. The results were expressed in arbitrary units per mL of cell-free supernatant (AU/mL) where one AU is defined as the highest dilution showing a clear zone of growth

inhibition. The most sensitive *Listeria* strain was selected as the indicator for the subsequent experiments.

2.4 Effect of enzymes, pH, temperature, chemicals and NaCl on the inhibitory activity of CFS

The LAB which CFS presented anti-*Listeria* activity, named LS1, LS2 and LS3, were subjected to sensitivity tests by treating the CFS with the proteases pepsin, Type II alfa - chymotrypsin from bovine pancreas and protease type XIV from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at the concentration of 1.0 mg/mL. Tubes containing filtered CFS (Millex GV 0,22 µm membrane, Merck Millipore, USA) received the enzymes and were incubated at 37 °C for 1 h and, then heated at 97 °C for 3 min (De Martinis and Franco, 1998).

The effect of pH on the active CFS was measured by adjusting pH to 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 with 1M HCl or 1 M NaOH and incubating at 25 °C for 1 h and 2 h (Todorov and Dicks, 2006). In a separate assay, CFS were incubated at 4, 25, 30, 37, 45, 60, 80 and 100 °C for 1 h and 2 h, and at 121 °C for 15 min (Albano et al., 2007).

Other batches of CFS were treated either with 10g/L Tween 20 or 10g/L Tween 80 and (Synth, Sao Paulo, Brazil) and incubated for 2 h at 25 °C, or with NaCl (10, 20, 30, 40 and 50 g/L) and incubated for 1 h at 7 °C (Todorov and Dicks, 2006). Controls were included for each component tested.

All CFS were adjusted to pH 6.0 after the experiments and subjected to the inhibitory activity test described in Section 2.3 using *L. monocytogenes* 711 as indicator, two-fold dilution of the CFS until 1:128 and incubation at 37 °C for 18-20 h.

2.5 Mode of action of the anti-*Listeria* CFS

Aliquots of 20 mL of anti-*Listeria* CFS were adjusted to pH 6.0, membrane filtered and added to 100 mL of *L. monocytogenes* 711 culture in early exponential phase (OD₆₀₀ of 0.1 to 0.2). Optical density was measured every h for 12 h of incubation at 37 °C (Todorov and Dicks, 2004).

2.6 Adsorption of the bacteriocins present in the CFS of LS2 to indicator cells

Listeria monocytogenes 711 was incubated in BHI broth at 37 °C for 24 hours, centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4 °C, washed twice with sterile saline solution (8.5 g/L NaCl), resuspended to OD₆₀₀ of 0.1 to 0.2 and pH adjusted (4.0, 6.0, 8.0 and 10.0). The suspension was mixed with equal volume of filter sterilized CFS, incubated at 37 °C for 1 h, centrifuged and subjected to the inhibitory activity test described in Section 2.3. Different temperatures (4, 25, 30 and 37 °C) were also used to incubate the mixed suspension (in pH 6.5) (Yildirim; Avşar and Yildirim, 2002).

Another batch of *L. monocytogenes* cells was washed and resuspended, in this case, with 5 mmol sterile phosphate buffer, treated with 10g/L Tween 80 or 10g/L NaCl and, then, mixed with equal volume of filter sterilized CFS following the same steps above mentioned (Albano et al., 2007).

2.7 Identification of LS1, LS2 and LS3 isolates with anti-*Listeria* activity

The LS1, LS2 and LS3 isolates were subjected to 16S rRNA gene sequencing after DNA extraction using CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, USB, Cleveland USA) according to Oliveira (2006). PCR reactions were performed using a thermocycler (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) with the following conditions: an initial denaturation step of 3 min at 95 °C, followed by 25 cycles of 30 s at 94 °C for denaturation, 30 s at 52 °C for hybridization of primers and 1 min 40 s at 72 °C for extension, and subsequent final extension at 72 °C for 7 min. The amplified products were visualized in a 9 g/L agarose gel. The primers used for amplification were 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane et al., 1991) and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al. 1999).

The amplification products were purified (Pure Cycle kit EZNA, Georgia, USA) in mini-columns (Hibind DNA mini colum, Georgia, USA) and sequenced in an automatic sequencer (Applied Biosystems 3130 xl Genetic Analyzer – Hitachi, Tokio, Japão) using Big Dye Terminator v3.1 kit for Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, California, USA.). Sequences were analyzed using BioEdit program (BioEdit Biological Sequence Alignment Editor, Carlsbad, California) and compared to the gene sequences deposited in Genbank database (www.ncbi.nlm.gov/Genbank) and RBD (*Ribosomal Database Project*, East Lansing, USA) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

3. RESULTS

3.1 Isolation of LAB from raw goat milk and determination of CFS inhibitory activity

A total of 19 Gram positive and catalase negative cultures were isolated from raw goat milk. Antimicrobial activity of CFS obtained from the isolates revealed no activity against Gram-negative bacteria tested (*Salmonella* spp., and *Escherichia coli* ATCC 29214). However, CFS of 3 isolates (LS1, LS2 and LS3) presented anti-*Listeria* activity. LS1 and LS3 were isolated in anaerobic conditions and LS2 in aerobic conditions at 25 °C. The anti-*Listeria* activity (*L. monocytogenes* ATCC 7644 and *L. monocytogenes* 711) observed for LS1, LS2 and LS3 were 400 AU/mL, 1600 AU/mL and 3200 AU/mL, respectively.

3.2 Effect of enzymes, pH, temperature, chemicals and NaCl on the inhibitory activity of CFS

The CFS from LS1, LS2 and LS3 did not maintain the anti-*Listeria* activity after treatment with proteases pepsin, type II alfa - chymotrypsin from bovine pancreas and protease type XIV from *Streptomyces griseus*, indicating that the isolates evaluated are bacteriocin producers.

Effect of pH on the inhibitory activity of active CFS tested is presented in Figure 1. The results showed that CFS from LS1 lost activity at all pH values after 2 h of treatment, with higher sensitive response to this parameter. CFS from LS2 showed some equivalent results to CFS from LS3, with activity of 800 AU/mL, in pH 4.0 and 5.0 with 1 h and 2 h of treatment, pH 10.0 with 1 h of treatment and pH 11.0 with 2 h of treatment, however LS2 showed the best anti-*Listeria* activity after 2 h of treatment at pH 6.0. The CFS of isolate LS3 showed better results at pH 7.0, with persistent activity of 1600 AU/mL.

The bacteriocins present in CFS obtained from LS3 were more thermostable compared to LS1 and LS2 after 1 h of exposure to 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C and for 15 min 121 °C (Figure 2). CFS from LS2 and LS3 maintained the antimicrobial activity of 800 AU/mL and 1600 AU/mL in the temperature range from 4 °C to 80 °C after 1 h of exposure, respectively. On the other hand, CFS from LS1 presented low but stable activity of 200 AU/mL even after hot treatment in autoclave for 15 min.

CFS showed anti-*Listeria* activity of 200 AU/mL after treatment with the Tween 20 (10 g/L) and Tween 80 (10 g/L), as well as in all different NaCl concentrations tested (10, 20, 30, 40 and 50 g/L) at 7 °C for 1h.

3.3 Mode of action of the anti-*Listeria* CFS

The CFS of LS2 was able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* 711 during 5 h . The addition of LS1 and LS3 supernatants to the indicator caused no inhibition, since the OD₆₀₀ of *L. monocytogenes* increased exponentially (Figure 3).

3.4 Adsorption of the bacteriocins present in the CFS of LS2 to *L. monocytogenes*

The highest adsorption (100%) of anti-*Listeria* bacteriocins produced by LS2 against cells of *L. monocytogenes* 711 occurred at 30 °C and 37 °C as well as in pH values 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0. Treatment with 10g/L NaCl and 10g/L Tween 80 resulted in the adsorption of 100 % and 50 %, respectively (Table 2).

3.5 Identification of LS1, LS2 and LS3 isolates with anti-*Listeria* activity

The electrophoresis gel showed 1465 bp fragments corresponding to 16S rRNA region for LS1, LS2 and LS3 (Figure 4). The amplicons of the three isolates were successfully sequenced and compared to the databases sequences revealed similarity of 97 % with *Weissella cibaria* for LS1 and of 99 % with *Lactococcus lactis subsp. lactis* for LS2 and LS3.

4. Discussion

LAB with antimicrobial and anti-*Listeria* activity have been isolated from milk of goats, camels and cows (Nikolic et al., 2008; Sip et al., 2012; Fatma et al., 2013). Considering the ubiquitous characteristic of *Listeria* species and their capacity to form biofilms in surface of processing dairy products, the synthesis of compounds with activity against this bacterium is one of the strategies of LAB to survive in food matrices such as milk (Guerrieri et al., 2009).

In the present study, none of the CFS was active against Gram-negative bacteria tested in agreement with previous reports (Todorov and Dicks, 2006 and Todorov et al., 2010). CFS

from LAB frequently present activity against *L. monocytogenes* and various bacteriocins have been isolated and characterized (Pinto et al., 2009 and Hartmann et al., 2011), reinforcing the hypothesis of environmental competition between these microorganisms, which was not observed in the present study, where only 15.8 % (n=3) isolates showed anti-*Listeria* activity attributed to bacteriocins.

The inhibitory activity of CFS from LS1, LS2 and LS3 was affected by the pH values. Bacteriocin stability in a large pH range is important since its activity can be affected specially in products with acid pH (Albano et al. 2007 and Settanni & Corsetti, 2008). Sip et al. (2012) reported CFS from *L. lactis* subsp. *lactis* 521 with stability of the antibacterial activity in a range of pH from 2.0 to 8.0, however anti-*Listeria* activity was reduced in some CFS when pH values were higher than 9.0. It is noticeable that many dairy products present pH values near to neutral, such as some cheese varieties and, therefore, can be targets to receive bacteriocins without large pH stability.

In the present study, bacteriocins produced by LS1 and LS2 showed a decrease of anti-*Listeria* activity as the temperature increased. However, LS3 had high thermo-stability. In this context, Wang et al. (2013) also reported anti-*Listeria* bacteriocin with stability in high temperatures, since even after heating the isolated supernatants at 121°C for 15 min they were still capable of inhibiting *L. monocytogenes* to some extent. Variations on thermo-stability of anti-*Listeria* bacteriocins produced by LAB, including from *L. lactis* subsp. *lactis* are common, with reports of activity after treatment at 60 °C/30 min, 100 °C/30 min and even at sterilization temperature (121 °C/ 15min) (Sip et al., 2012). Considering that addition of bacteriocinogenic strains have been studied in different food matrices, its application in foods processed under mild conditions counterbalance the effects of the temperature in the antibacterial activity.

Effects of chemicals largely used in food industry on activity of bacteriocins are related to chemical structures of these molecules (Todorov and Dicks, 2005). In this study, the treatment with Tween 20 and Tween 80 affected the anti-*Listeria* activity of CFS which was reduced to 200 AU/mL, suggesting the application of the bacteriocins produced in the presence of emulsifiers must be carefully evaluated. Additionally, the anti-*Listeria* activity was also reduced to 200 AU/mL in different NaCl concentrations, indicating that the use of these bacteriocins to inhibit *Listeria* in salted foods should be avoided.

The bacteriostatic action of the bacteriocin produced by LS2, since the *Listeria* grew after 5 h of inhibition, is in agreement with findings of previous study studies, which report

anti-*Listeria* bacteriocin with the same mode of action and active for 7 h. (Albano et al. (2007).

The adsorption of CFS of LS2 to *L. monocytogenes* was pH and temperature dependent, being the highest at 37 °C and pH 6.0, 8.0 and 10. Other authors have previously reported this influence (Yildirim; Avşar and Yildirim, 2002; Todorov, 2008), which may be due to specific interaction between bacteriocins and the target cells (Pingitore et al., 2012). The emulsifiers and NaCl are frequently present in foods and influence the adsorption of bacteriocins. The concentrations of NaCl and Tween 80 used in the adsorption assays with CFS of LS2 to *L. monocytogenes* showed results comparable to some previously reported, with variation between 50% to 100% (Yildirim, Avşar and Yildirim, 2002).

The three LS1, LS2 and LS3 isolates that produced bacteriocins against *L. monocytogenes* 711, were identified as *Weissella cibaria* (LS1) and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (LS2 and LS3) and are recognized as bactericin producers (Srionnual et al. 2007; Ortolani, 2010). *L. Lactis* subsp *lactis* is also a traditional *starter* culture of dairy products (Ortolani, 2010) and *Weissella* genus was used in production of new probiotic fermented milks (Viegas, 2010).

The results showed a successful isolation of three bacteriocinogenic strains from raw goat milk with anti-*Listeria* activity. Particularly the *Lactococcus lactis* strain (LS2), which produce a bacteriostatic bacteriocin active in low pH (minimum 4.0) and at temperatures from 4 to 80°C, could be an alternative for the control *Listeria* in fermented dairy products.

Acknowledgments

The author L. A. da Silva is grateful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for granting scholarship. The authors also acknowledge Dr. Maria T. Destro, Dr. Eb Chiarini and Dr. Bernadette D. G. M. Franco (Laboratory of Microbiology, Pharmaceutical Sciences Faculty, University of São Paulo) for some *L. monocytogenes* strains used as indicators in this study.

5. References

Albano, H., Todorov, S.D., Reenen, C.A.; Hogg, T., Dicks, L.M.T, Teixeira, P. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from

“Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 239-247.

Barbuddhe, S.B., Malik, S.V.S., Kumar, J.A., Kalorey, D.R., Chakraborty, T. (2012). Epidemiology and risk management of Listeriosis in India. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 113-118.

Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F.; Prévost, H, Chobert, J.M., Haertlé, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837–848.

Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M., Brandelli, A. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal Food Microbiology*, 121(2), 229-233.

Chapaval, L., Aguiar, V. M. P., De Sousa A. P. B., De Miranda, K. P., Mororó, A.M., Magalhães, D. C. T. (2009). Culture, Growth and Identification of Bacteria of the genus *Staphylococcus aureus* in Goat Milk. *Embrapa*, ISSN 1676-7667.

Costa, R. G., Mesquita, Í. V. U. , Queiroga, R. C. R. E., Medeiros A. N. de, Carvalho, F. F. R. de, Filho, E. M. B. (2008). Chemical and sensory characteristics of milk of goats fed silage Moxotó maniçoba. *Journal of Animal Science*, 37(4), 694-702.

De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products, *Food Reviews International*, 18, 191-208.

De Martinis, E.C.P., Franco, B.D.G.M. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sakei* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 119-126.

- Fatma, C.H., Benmechernene, Z. (2013). Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 7(23), 2961-2969. *Food Control*, 26, 117-124.
- Gálvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. B (2008). Application of Bacteriocins in the Control of Food borne Pathogenic and Spoilage Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28 (2), 125–152.
- Guerrieri, E., Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., Bondi, M. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20, 861–865.
- Hartmann, H. A., Wilke, T., Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 146 (2), 192–199.
- Kaur, G., Malik, R., Mishra, S. K., Singh, T. P., Bhardwaj, A., Singroha, G., Vij, S.Kumar, N. (2011). Nisin and Class IIa Bacteriocin Resistance Among *Listeria* and Other Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 197-205.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, E.H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21, 805-815.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*. John Wiley and Sons, New York, NY, 115-175.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., Nero L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food Science and Technology*, 43, 1320-1324.
- Nielsen, D. S., Cho, G., Hanak, A., Huch, M., Franz, C. M.A.P., Arneborg, N. (2010). The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of

sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S53–S59.

Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovicic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 162–170.

Oliveira, C.J.B., Hisrich, E.R., Moura, J.F.P., Givisiez, P.E.N., Costa, R.G., Gebreyes, W. A. (2011). On farm risk factors associated with goat milk quality in North-east Brazil. *Small Ruminant Research*, 98, 64-69.

Oliveira, D.E., Bacchi, M.M., Macarenco, R.S.S., Tagliarini, J.V., Cordeiro, R.C., Bacchi, C.E. (2006). Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 protein expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 126, 284-293.

Ortolani, M.B.T., Moraes, P.M., Perin, L.M., Viçosa, G.N., Carvalho, K.G., Silva Júnior, A., and Nero, L.A. (2010). Molecular identification of naturally occurring bacteriocinogenic and bacteriocinogenic-like lactic acid bacteria in raw milk and soft cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2880-2886.

Pinto, A. L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P.A. (2009). Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented sea food. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 50–58.

Pingitore, E.V., Todorov, S. D., Sesma, F., Franco, B. D. G. M. (2012). Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiology*, 32, 38-47.

Rosa, C.M., Franco, B.D.G.M., Montville, T.J., Chikindas, M.L. (2002). Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated *Lactobacillus sake* 2a. *Journal Food Safety*, 22, 39-54.

Settanni, L., Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.

Sip, A., Ckowicz, M.W., Olejnik-Schmidt, A., Grajek, W. (2012). Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, 26, 117-124.

Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2004). Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiologica*, 49, 406–10.

Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pedococcus pentosaceus* ST18 isolated boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40, 365-370.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria, Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11–19.

Todorov, S.D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 178-187.

Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. (2010). Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. *Anaerobe*, 15(3), p. 65-73.

Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 327–338.

Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1131-1137.

Viegas, R. P., Souza, M.R., Figueiredo, T.C., Resende, M.F.S., Penna, C.F.A.M., Cerqueira, M.M.O.P. (2010). Quality of fermented milks produced by the use of lactic acid bacteria isolated from coalho cheese. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 62(2), 460-467.

Wang, G., Ning, J., Zhao, J., Hang, F., Tian, F.; ZHAO, J., Chen, Y., Zhang, H., Chen, W. (2014). Partial characterisation of an anti-*listeria* substance produced by *Pediococcus acidilactici* P9. *International Dairy Journal*, 34, 275-279.

Yildirim, Z., Avşar, Y.K., Yildirim, M. (2002). Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by *Lactobacillus buchneri*. *Microbiological Research*, 157, 103-107.

Table 1

Indicator microorganisms and incubation conditions used for inhibitory activity assays of cell-free supernatants (CFS) of the isolated strains from raw goat milk.

Microorganism	Incubation Conditions
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> L506 (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> L620 (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> L302 (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> L211 (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> L409 (USP)	BHI/37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> 711 (USP)	BHI/37°C
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19433	BHI/37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	BHI/37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29214	BHI/37°C
<i>Salmonella</i> spp 29 (UFPB)	BHI/37°C
<i>Lactobacillus casei</i> BGP 93	MRS/30°C
<i>Bifidobacterium lactis</i> BLC1	MRS/30°C
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12®	MRS/30°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA3	MRS/30°C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MRS/30°C
<i>Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus</i> (YF L812)	MRS/30°C
<i>Streptococcus thermophilus</i> (YF- L812)	MRS/30°C
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> and <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> (R-704)	MRS/30°C

Table 2

Effect of temperature, pH and chemicals in adsorption assays of the LS2 cell-free supernatants (CFS) of to *L. monocytogenes*

Temperature (°C)	Adsorption (%)^a
4	50,0 ^b
25	50,0 ^b
30	83,3 ^b
37	100,0 ^b
pH	
4.0	50,0 ^b
6.0	100,0 ^b
8.0	100,0 ^b
10.0	100,0 ^b
Chemicals (10 g/L)	
Tween 80	50,0 ^b
NaCl	100,0 ^b

^a Expressed as percentage of adsorption (mean $\pm$ standard deviation)

^b Zero standard deviation

Figure captions

Fig. 1. Effect of pH on the cell-free supernatants of LS1, LS2 and LS3 with anti-*Listeria* activity expressed in arbitrary units per mL (AU/mL) (mean $\pm$ standard deviation).

Fig. 2. Effect of temperature on the cell-free supernatants of LS1, LS2 and LS3 with anti-*Listeria* activity (AU/mL) (mean $\pm$ standard deviation).

Fig. 3 Mode of action of the cell-free supernatants of LS1, LS2 and LS3 with anti-*Listeria* activity on *L. monocytogenes* 711 growth measured by the optical density at 600 nm (mean $\pm$ standard deviation).

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons generated using total DNA from LAB strains isolated from raw goat milk. M: molecular marker 1Kb plus (Invitrogen, CA, USA), lane 1: positive control, *Neisseria perflava*, lane 2: LS3, lane 3: LS1, lane 4: LS2, lane 5: negative control, water.

Figure 1

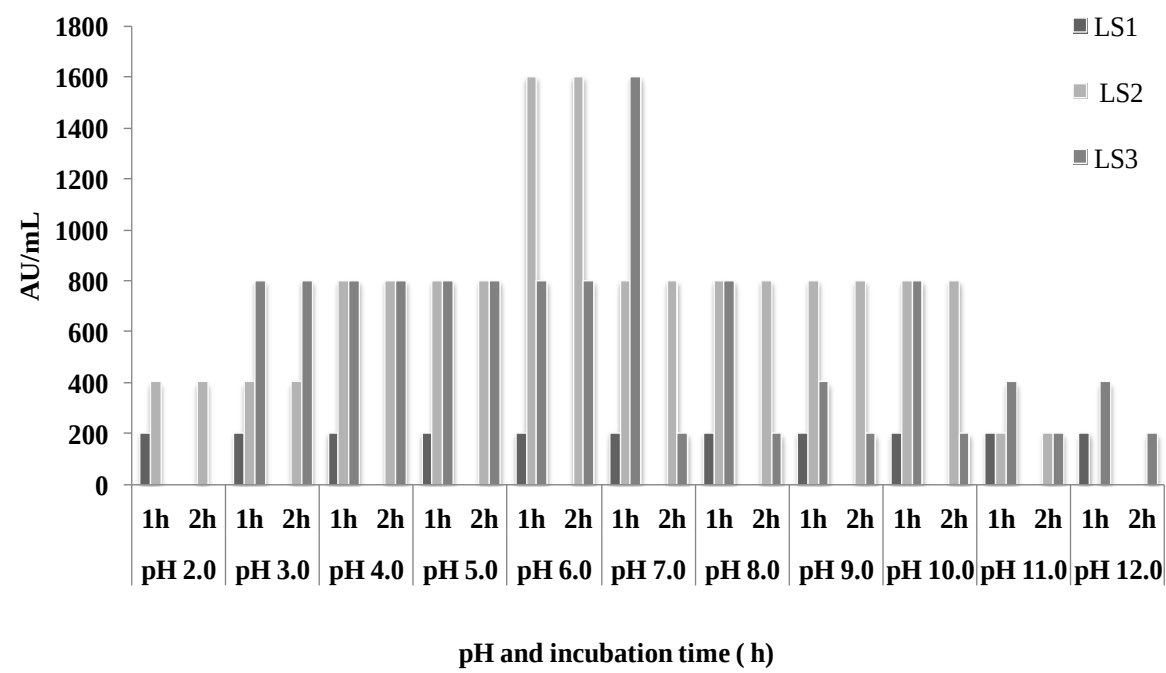


Figure 2

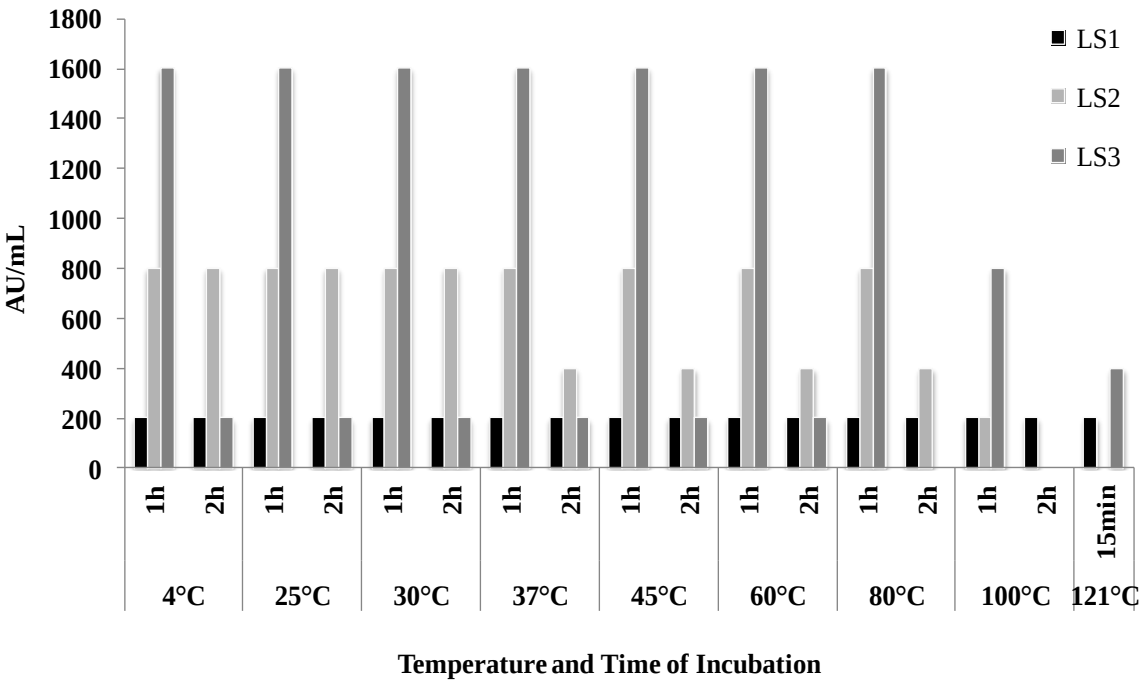
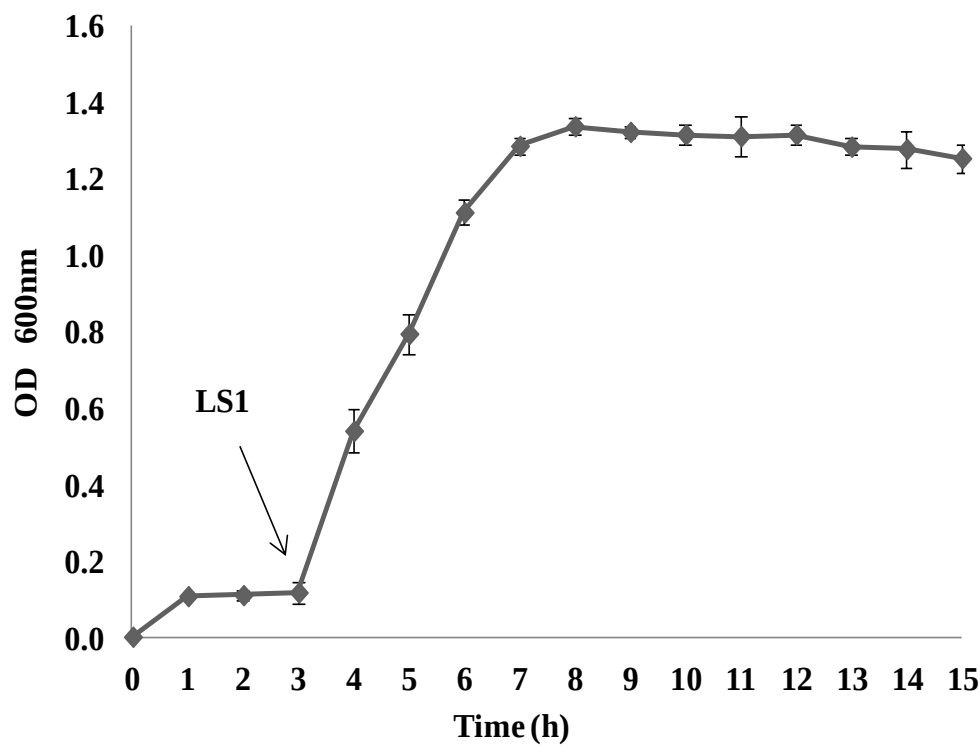
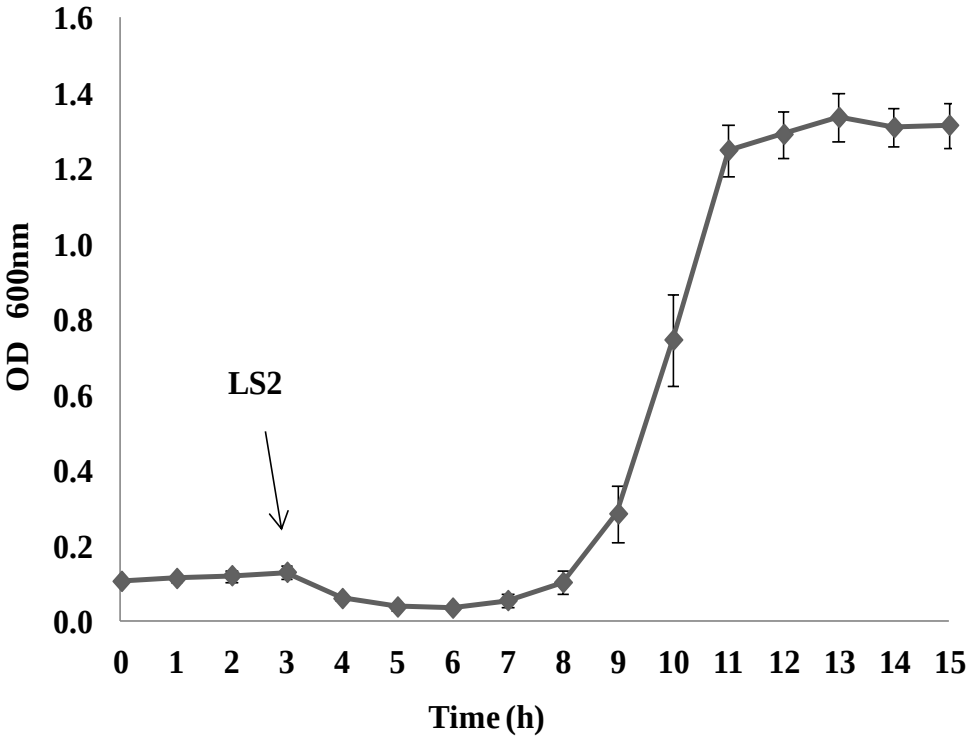


Figure 3

(a)



(b)



(c)

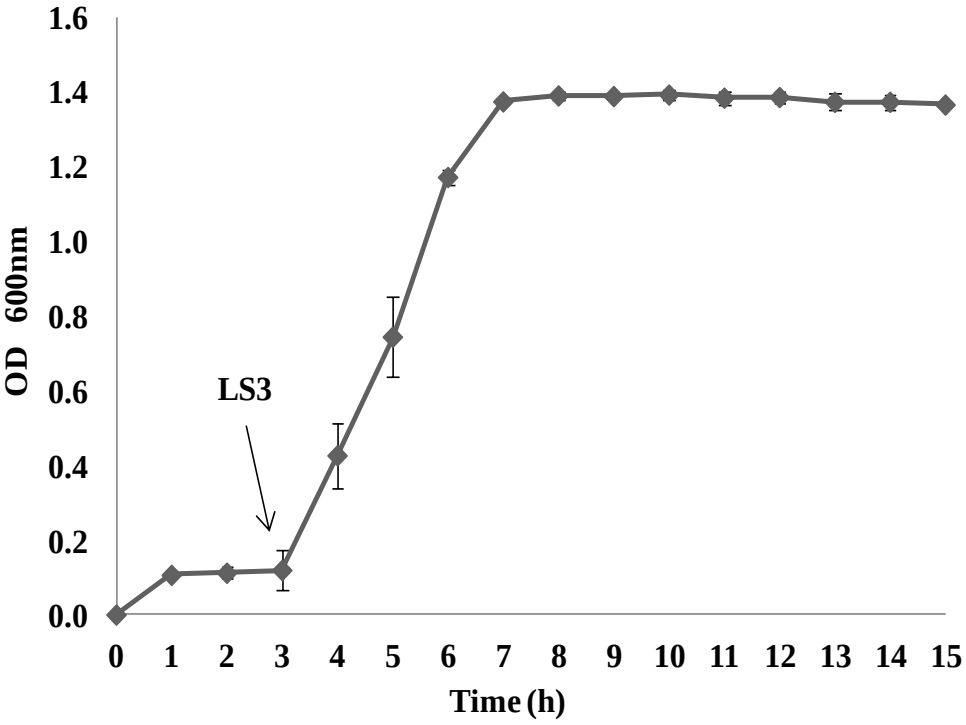


Figure 4

