



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA POLITECNICA

Dipartimento in Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale

DOTTORATO IN INGEGNERIA CIVILE, CHIMICA E AMBIENTALE

Convenzione Accademica Internazionale stipulata fra l'Università degli Studi di Genova e l'Università di São Paulo per il Rilascio del Doppio Titolo di Dottore di Ricerca

Coltivazione di *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* in mezzo a base di estratto di soia: studio della cinetica di acidificazione, della crescita cellulare, dell'attività antimicrobica e dello stress gastrointestinale *in vitro*

GABRIEL MORETTI DE ALMEIDA

Supervisor UNIGE: Proff. Patrizia Perego e Attilio Converti
Supervisore USP: Prof. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

GENOVA

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Cultivo de *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* em meio contendo extrato de soja: estudo da cinética de acidificação, do crescimento celular, da atividade antimicrobiana e do estresse gastrointestinal *in vitro*

Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências, junto ao programa de Pós-Graduação de tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Tecnologia de Fermentações da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e ingegneria chimica, dei materiali e di processo, Università degli Studi di Genova (programa de dupla titulação).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (USP).

Orientadores (externos): Prof. Patrizia Perego e Attilio Converti (UNIGE).

SÃO PAULO

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Almeida, Gabriel Moretti de
A447c Cultivo de *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* em meio contendo extrato de soja: estudo da cinética de acidificação, do crescimento celular, da atividade antimicrobiana e do estresse gastrointestinal *in vitro*. / Gabriel Moretti de Almeida. -- São Paulo, 2019.
170p.

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

1. Tecnologia de alimentos 2. Fermentação, soja. 3. Cultivo. 4. Probióticos. 5. Microencapsulação. I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador. III. Orientador (externo): Perego, Patrizia (UNIGE)

664 CDD

Gabriel Moretti de Almeida

Cultivo de *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* em meio contendo extrato de soja: estudo da cinética de acidificação, do crescimento celular, da atividade antimicrobiana e do estresse gastrointestinal *in vitro*

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do Grau de DOUTOR em Ciências

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

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

5º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

Dedicatória

**Agradeço a minha mãe
“Liana Maria Moretti” pelo
apoio incondicional em
todos os momentos difíceis
da minha trajetória
acadêmica sempre trazendo
luz ao meu conhecimento.**

Agradecimentos

À minha família que, com muita compreensão e compaixão, sempre me apoiou todos esses anos em que me dediquei à Ciência. Aos meus dois irmãos, Lucas e Julia, que me apoiaram desde o primeiro dia, há dez anos atrás, quando iniciei minha jornada, e minha mãe, Liana, que sempre teve dedicação imensa para que eu sempre mantivesse entusiasmo e felicidade.

Ao meu tio Zezé (José Luiz Rodrigues de Almeida), que sempre me ajudou em momentos difíceis, proporcionando-me alegria com sua visão única sobre a vida e sobre como devemos levá-la de forma leve e descontraída.

Ao professor Ricardo Oliveira, orientador magnífico do qual pude trabalhar esses quatro anos do meu doutorado. Sempre otimista e companheiro, responsável pelo meu crescimento científico e profissional, contribuiu muito para que eu realizasse este duplo-doutorado em Gênova, onde vivi uma experiência impar em minha vida. Muito obrigado pela paciência e dedicação.

À Professora Patrícia Perego e o Professor Attilio Converti pela atenção e apoio dados a mim desde o primeiro dia que cheguei em Gênova, permitindo realizar este trabalho de duplo doutorado, permitindo que eu conseguisse imenso crescimento. Muito obrigado por cada segundo de conversa que, para mim, equivale a anos de conhecimento.

Agradeço a todos meus colegas do laboratório (Laboratório de Biomoléculas Microbianas) – Thamires Simões, Ana Piazzentin, Carlos Nobrega, Well Santos, Amanda ramalho, Thaís Kuniyoshi, Ronaldo Santos, Sabrina Sabo – que sempre me ajudaram com a parte experimental e incontáveis xícaras de cafés.

A Douglas Xavier pelo apoio e sabedoria em momentos difíceis.

À professora Cristina Bogsan pelo apoio nesses anos de amizade, auxiliando-me na extração de ácidos graxos, tendo a oportunidade de publicar dois capítulos de livros e dando apoio nos momentos difíceis.

Aos companheiros de laboratório na *università degli Studi di Genova* (UNIGE), Alessandro Alberto Casazza, Bahar Aliakbarian, Pier Francesco, Marguerita Bartowski, Giulia Fossa, Elena Zattera, Caroline e Kamille (irmãs de consideração) por sua amizade.

E à Viviane Gericke, minha namorada de tanto tempo – só dez anos –, que participa desde o início desta loucura que é a ciência, sempre compreendendo e apoiando.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente...

Meus singelos agradecimentos.

“Não marche a não ser que tenha vantagem; não use suas tropas, a menos que haja alguma coisa a ser ganha; não lute, a menos que a posição seja crítica. Um sábio usa o contra-ataque e iscas para conquistar a vitória”

Sun Tzu
A arte da Guerra

MORETTI-ALMEIDA, G. Cultivo de *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* em meio contendo extrato de soja: estudo da cinética de acidificação, do crescimento celular, da atividade antimicrobiana e do estresse gastrointestinal *in vitro*. 2019. 170p. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil, 2019.

RESUMO

Atualmente, a ideia de redução dos componentes lácteos como veículos para agentes probióticos tem sido promovida em razão da alta proporção de indivíduos que apresentam intolerância à lactose e alergia aos componentes protéicos do leite. Pesquisadores sugerem que a intolerância à lactose ocorre na mucosa intestinal sensibilizada, causando cólicas abdominais, vômitos, obstipação intestinal, perda de sangue oculto nas fezes, e em casos mais severos, obstrução intestinal e enteropatia perdedora de proteínas. Levando-se em consideração as patologias relacionadas à intolerância alimentar, novas alternativas como as bebidas fermentadas probióticas a base de soja em substituição aos produtos lácteos vêm sendo enfatizadas na alimentação, pois além de proporcionarem uma modulação benéfica da microbiota intestinal, podem atuar na diminuição do estresse imunológico. Foi realizado a cinética de acidificação com o sistema CINAC das diferentes formulações a 42°C a co cultura ternária composta por *Lactococcus lactis* (LL), *Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (ST) foi a maior taxa de acidificação (V_{max} 11.40 x 10⁻³ unidades pH/min) 10.12 horas para atingir o pH 4.5 (P<0.05), na pos acidificação a linhagem *Lactococcus lactis* (LL) apresentou a menor taxa de acidificação significativa em relação ao demais a 37°C p<0.05 e a co cultura ternária *Lactobacillus plantarum* (LP), *Lactobacillus bulgaricus* (LB) e *Streptococcus thermophilus* (ST) foi que apresentou a maior taxa de acidificação em relação aos demais p<0.05, a 42°C a com maior taxa de acidificação foi *Lactococcus lactis* (LL) junto do *Lactobacillus plantarum* (LP). Na contagem microbiológica todos os micro-organismos nas diferentes temperaturas e formulações mantiveram viabilidade acima de 10⁶ após os 28 dias de armazenamento a 4°C. Os parâmetros termodinâmicos estimados para a inativação térmica irreversível da nisina foram energia, entalpia e energia livre de Gibbs de ativação de 155,1, 152,1-152,3 e 86,2-90,4 kJ / mol, respectivamente, e uma entropia de ativação de 177,9-186,2 J mol⁻¹ K⁻¹ .

Palavras-chave: Fermentação, bactérias lácticas, extrato de soja, probióticos, compostos bioativos, bacteriocinas.

MORETTI-ALMEIDA, G. *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* cultivation in soybean extract medium: study of acidification kinetics, cell growth, antimicrobial activity and gastrointestinal stress *in vitro*. 2019. 170p. PhD thesis. Pharmaceutical Sciences Faculty at University of São Paulo, Brazil, 2019.

ABSTRACT

Currently, the idea of reducing dairy components as vehicles for probiotic agents has been promoted because of the high proportion of individuals who present lactose intolerance and allergy to milk protein components. Researchers suggest that lactose intolerance occurs in the sensitized intestinal mucosa, causing abdominal cramps, vomiting, intestinal constipation, fecal occult blood loss, and in more severe cases, intestinal obstruction and protein-losing enteropathy. Considering the pathologies related to food intolerance, new alternatives such as soy-based probiotic fermented beverages instead of dairy products have been emphasized in the diet, as they provide a beneficial modulation of the intestinal microbiota. The acidification kinetics was performed with the CINAC system of the different formulations at 42°C. The ternary co-culture composed of *Lactococcus lactis* (LL), *Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (ST) was the highest acidification rate (V_{max} 11.40×10^{-3} units pH / min) 10.12 hours to reach pH 4.5 ($P < 0.05$), post acidification the *Lactococcus lactis* (LL) strain had the lowest significant acidification rate when compared to the others at 37°C $p < 0.05$. And the ternary co-culture *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus bulgaricus* (LB) and *Streptococcus thermophilus* (ST) showed the highest acidification rate when compared to the other $p < 0.05$, at 42°C, and the highest acidification rate was *Lactococcus lactis* (LL) with *Lactobacillus plantarum* (LP). In the microbiological count, all microorganisms at different temperatures and formulations maintained viability above 10^6 after 28 days of storage at 4°C. The thermodynamic parameters estimated for nisin irreversible thermal inactivation were energy, enthalpy and Gibbs free energy of activation of 155.1, 152.1-152.3 and 86.2-90.4 kJ/mol, respectively, and an activation entropy of 177.9-186.2 J mol⁻¹ K⁻¹.

Keywords: Fermentation, lactic acid bacteria, soymilk, probiotic, bioactive compounds, bacteriocins.

MORETTI-ALMEIDA, G. Coltivazione di *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis* in mezzo a base di estratto di soia: studio della cinetica di acidificazione, della crescita cellulare, dell'attività antimicrobica e dello stress gastrointestinale *in vitro*. 2019. 170p. (Tesi di dottorato). Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Università di São Paulo, Brasile, 2019

RIASSUNTO

Attualmente, l'idea di ridurre i componenti del latte come veicoli per agenti probiotici è stata promossa a causa dell'alta percentuale di persone con intolleranza al lattosio e allergia ai componenti delle proteine del latte. I ricercatori suggeriscono che l'intolleranza al lattosio si verifica nella mucosa intestinale sensibilizzata, causando crampi addominali, vomito, costipazione, perdita di sangue occulto nelle feci e, in casi più gravi, ostruzione intestinale e enteropatia con perdita di proteine. Prendendo in considerazione le patologie legate all'intolleranza alimentare, sono state enfatizzate nella dieta nuove alternative come le bevande fermentate probiotiche a base di soia anziché i latticini, poiché oltre a fornire una modulazione benefica del microbiota intestinale, può agire per ridurre lo stress immunitario. La cinetica dell'acidificazione fatto con il "Sistema CINAC" delle diverse formulazioni a 42 °C sono stati ottenuti dalla co-cultura ternaria di *Lactococcus lactis* (LL), *Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (ST) era il più alto tasso di acidificazione (V_{max} 11.40×10^{-3} units pH / min) 10.12 ore da raggiungere pH 4.5 ($P < 0.05$), post acidificazione il *Lactococcus lactis* (LL) il ceppo aveva significativamente il tasso di acidificazione più basso rispetto agli altri 37°C $p < 0.05$ e la co-cultura ternaria *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus bulgaricus* (LB) and *Streptococcus thermophilus* (ST) ha mostrato il più alto tasso di acidificazione rispetto all'altro $p < 0.05$, at 42°C e al più alto tasso di acidificazione era *Lactococcus lactis* (LL) with *Lactobacillus plantarum* (LP). Nel conteggio microbiologico tutti i microrganismi a diverse temperature e formulazioni hanno mantenuto una vitalità superiore a 10^6 dopo 28 giorni di conservazione a 4 °C. I parametri termodinamici stimati per l'inattivazione termica irreversibile della nisina erano energia, entalpia ed energia libera di Gibbs di attivazione di 155.1, 152.1-152.3 and 86.2-90.4 kJ/mol, rispettivamente, e un'entropia di attivazione di 177.9-186.2 J mol⁻¹ K⁻¹.

Keywords: Fermentazione, batteri lattici, estratto di soia, probiotici, composti bioattivi, batteriocine.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Rota metabólica homofermentativa e heterofermentativa de bactérias lácticas.	25
Figura 2: Esquema do equipamento do spray drying.	30
Figura 3: Microcápsula (A). Microesfera (B).	32
Figura 4: A estrutura química molecular da inulina é predominantemente do tipo GF _n , podendo apresentar também compostos do tipo F _n , correspondendo G à glucose, F à frutose e n ao número de unidades de frutose presentes, conforme indica a figura.	34
Figura 5: Ação dos probióticos no intestino.	40

CAPÍTULO II - “USE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOCOCCUS LACTIS* IN THE PREPARATION OF A FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (PROBIOTIC) AND ITS BENEFITS”

Figure 1: Pure cell culture growth LL (<i>Lactococcus Lacts</i>); At 30°C, 100rpm, values allowed by the media performed in triplicate, a linear regression, dry mass production with respect to optical dencidity was performed.	57
Figure 2: Pure cell culture growth LP (<i>Lactobacillus plantarum</i>); At 30°C, 100rpm, values allowed by the media performed in triplicate, a linear regression, dry mass production with respect to optical dencidity was performed.	58
Figure 3: Acidification curve of 42°C of <i>S. thermophilus</i> (St), <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. plantarum</i> (Lp) and <i>L.lacts</i> soybean microorganisms at 37°C and 42°C until pH 4.5. Legend: LL (■), LP (■), LL-LB-ST (■), LP-LB-ST (■), LP-LL-LB-ST (■)	59
Figure 4: Post-acidification profile of LP (<i>Lactobacillus plantarum</i>) and LL (<i>Lactococcus lactis</i>) pure cultures; ternary cultures LL LB ST (<i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i>) and LP LB ST (<i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i> and every all cultures mixed. Day 1, Day 14 and Day 28 representing shelf life at 4°C temperature. values resulting from the average realized triplicate. Legend: LP (■), LL (■), LL-LB-ST (■), LP-LB-ST (■), LL-LP-LB-ST (■)	61
Figure 5: Microbiological Count of <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (Lp), <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> (Lb), <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) in soybean extract fermented after 1 day (d1), 14 days (d14) and 28 days (d28) storage at 4°C. Legend: LP-LB-ST (■), LL-LB-ST (■), LL-LP-LB-ST (■), LP (■), LL (■)	62
Figure 6: Fatty acid profile (g 100 g ⁻¹ of total fatty acids) in soybean extract fermented by <i>L. lactis</i> (LL), <i>L. plantarum</i> (Lp), <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> (Lb),	

Streptococcus thermophilus (St) (42°C) on 1 day (d1), 14 days (d14) and 28 days (d28) storage at 4°C.....64

CAPÍTULO III – “THERMODYNAMIC INVESTIGATION ON BACTERIOCIN THERMOSTABILITY: THE CASE OF NISIN”

Figura 1: Profile of nisin thermal inactivation over time at different temperatures (°C): 70 (O), 75 (●, ■), 77 (Δ), 82 (), 86 ().....78

Figura 2: Arrhenius de taxas de inativação de nisina $y = -18659x + 49,423$ $R = 0,9612$81

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Espécies de <i>Lactobacillus</i> com status QPS (EC, 2007).	26
Tabela 2: Relação efeito/benéfico- Mecanismos de ação	30
Tabela 3: Características de fermentados de soja (probióticos).....	36

CAPÍTULO II - “USE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOCOCCUS LACTIS* IN THE PREPARATION OF A FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (PROBIOTIC) AND ITS BENEFITS”.

Table 1: Kinetic parameters of microorganisms <i>Streptococcus thermophilus</i> (St), <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (Lb), <i>Lactococcus lactis</i> (LL) and <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lp) in soybean base at 42°C until pH 4.5.....	60
--	----

CAPÍTULO III – “THERMODYNAMIC INVESTIGATION ON BACTERIOCIN THERMOSTABILITY: THE CASE OF NISIN”

Table 1: Thermodynamic parameters estimated for nisin thermoinactivation.....	79
Table 2: Exposition to simulated gastrointestinal conditions.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato
INU: inulina
ANOVA: Análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC: Associação Oficial de Química Analítica
ATP: adenosina trifosfato
ATR: Attenuated Total Reflectance
CFU: Colony Forming Unit
CMC: carboximetilcelulose
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DOC: Dissolved oxygen concentration
EC: European Commission
EFSA: European Food Safety Authority
FAO: Food Agriculture Organization
FDA: diacetato de fluoresceína
FOS: fructooligossacarídeos
FTIR: Infrared Spectroscopy
G: ácido- α -L-gulurônico
GG: díades de guluronato
GRAS: Generally recognized as safe
HM: alto grau de metoxilação
HPLC: High-performance liquid chromatography
IMO: isomaltooligossacarídeos
LAB: bactéria ácido-lática
LAPRS: liquid acid protein residue of soybean
LM: baixo grau de metoxilação
LPMP: *Lactobacillus plantarum* microencapsulated powder
LB: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
LP: *Lactobacillus plantarum*
LL: *Lactococcus Lactis*
M: ácido- β -D-manurônico
MM: díades de manuronato

MG/GM: hetero-díades

NAD/NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NMP: número mais provável

PB: Plackett-Burman

QPS: Presunção de Segurança Qualificada

SEM: Scanning Electron Microscopy

SGJ: Simulated Gastric Juice

SIJ: Simulated Intestinal Juice

SLM: solid lipid microparticles

ST: *streptococcus thermophilus*

TGI: tract gastro intestinal

UFC: Unidade Formadora de Colônia

WHO: World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: grau Celsius

pH: potencial hidrogeniônico

mm: milímetro

Ca²⁺: cálcio

Zn²⁺: zinco

Cu²⁺: cobre

g: grama

L: litro

h: hora

mL: mililitro

dm: decímetro

CaCl: cloreto de cálcio

min: minuto

g: força *g*

MgSO₄.7H₂O: sulfato de magnésio

MnSO₄.H₂O: sulfato de manganês

rpm: rotações por minuto

M: molar

NaOH: hidróxido de sódio

H₃PO₄: ácido fosfórico

O₂: oxigênio

k_{La}: coeficiente de transferência de oxigênio

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

U: unidade

mM: milimolar

kV: kilovolts

cm: centímetro

keV: quiloelétrons-volt

COO⁻: grupamento carboxílico

mg: miligrama

Hg: mercúrio

HCL: ácido clorídrico

α : alpha

β : beta

μm : micrômetro

μL : microlitro

Sumário

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS II, III.....	47
CAPÍTULO II - “USE OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> AND <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> IN THE PREPARATION OF A FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (PROBIOTIC) AND ITS BENEFITS”.....	50
CAPÍTULO III – “THERMODYNAMIC INVESTIGATION ON BACTERIOCIN THERMOSTABILITY: THE CASE OF NISIN”	71

INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais interessados em ter uma vida saudável, buscando alimentos que contribuam para o bom funcionamento do organismo de forma segura. Entre os componentes da alimentação que favorecem a melhora da saúde, a soja vem se destacando devido ao seu elevado teor de proteínas – quando comparado ao leite bovino –, tornando-se uma alternativa para pessoas que buscam alimentos saudáveis ou mesmo apresentem intolerância ao leite e/ou alérgicas à proteína do leite (SMIDERLE., 2006).

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa com particularidades únicas, que foi descoberta há mais de cinco mil anos na região norte da China. Devido à sua versatilidade, é considerada um dos alimentos mais completos, possuindo grande potencial para atuar na manutenção da saúde e na redução de risco de diferentes doenças crônicas (MATEOS-APARECIDO *et al.*, 2008). Atualmente, o Brasil não é somente o segundo maior produtor de soja do mundo – ficando atrás dos EUA –, mas também o segundo maior importador de grão, óleo e farelo desta *commodity* agrícola (CHAUDHARY *et al.*, 2015; EMBRAPA SOJA., 2016).

Em razão das características nutricionais da soja e seus benefícios à saúde, seu consumo aumentando sofreu grande rejeição pelo sabor residual e aumento da flatulência, sendo esses problemas correlacionados com os oligossacarídeos (estaquiose e rafinose) presentes naturalmente nesta e em outras leguminosas (BEDANI *et al.*, 2014).

Para melhorar o sabor e aumentar seu consumo, a fermentação láctica do extrato solúvel de soja é visto como uma alternativa, podendo ser aliado à suplementação com sacarose, melhorando sua característica sensorial (BEHRENS, ROIG, SILVA., 2004).

Com a fermentação láctica da soja, podemos conferir características funcionais a este alimento com a adição de bactérias probióticas, auxiliando no tratamento de algumas doenças inflamatórias intestinais (DII) como a colite ulcerativa (CU) e a doença de Crohn; as bactérias ácido-láticas, com propriedades probióticas, atuam por meio da modulação da microbiota intestinal, além de contribuir para melhoria da digestão da lactose e na redução dos sintomas de intolerância a este carboidrato (PANDEY, MISHRA, 2015).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014). Esses microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies – tanto de bactérias, como de leveduras –, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos. Para um produto ser considerado probiótico, deve oferecer uma quantidade mínima de 10^8 a 10^9 UFC bactérias probióticas na porção diária (BRASIL, 2008). A microbiota humana é o foco de diversas pesquisas referentes à sua dinâmica e relação com diferentes doenças, sendo hoje um dos maiores campos de pesquisa da atualidade. A maioria dos esforços é direcionada ao trato gastrointestinal (eixo intestino cérebro e o sistema neuroimunoendócrino), que abriga a maioria dos nossos microrganismos. Diversos compostos e alimentos têm sido enquadrados com o apelo de alimento funcional e, dentre estes, estão os probióticos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da resolução da diretoria colegiada RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Dentro da última década, nossa compreensão dos organismos que habitam nossa flora intestinal e sua funcionalidade na saúde humana vem sendo estudada e demonstrou ser promissora no tratamento de diferentes doenças por meio da modulação da microbiota intestinal (SCHMIDT, RAES, BORK, 2018). As bactérias lácticas constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos na indústria alimentícia. São produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos (lático e butírico), diacetil, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas (BALCIUNAS *et al.*, 2013; MAYO *et al.*, 2010). Todos esses compostos podem antagonizar o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos, como as bacteriocinas, que têm atraído grande interesse na indústria de alimentos, em decorrência de seu uso potencial como conservante “natural” (BROMBERG *et al.*, 2006; COLLINS *et al.*, 2010).

Lactobacillus plantarum é uma das bactérias ácido-láticas utilizadas para elaboração de um produto probiótico (BERNARDEAU *et al.*, 2008), mostrando um metabolismo homofermentativo, tolerância ácida moderada, sendo um microrganismo considerado GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (BRINQUES & AYUB, 2011). Segundo o estudo realizado por Carbonera & Pinho

(2010), foi identificado um grande efeito antagônico do *L. plantarum* sobre a microbiota deterioradora no processo de fermentação da *anchóita*. Durante este processo, e com o auxílio da glicose (carboidrato fermentescível), esta cepa demonstrou eficácia significativa na redução do pH e no aumento da acidez devido à produção de ácidos orgânicos e, em maior expressão, o ácido láctico (CARBONERA & PINHO, 2010; SABO *et al.*, 2014).

A *Lactococcus lactis* é utilizada há séculos na fermentação de alimentos – especialmente queijo, iogurte, chucrute e similares –, considerada GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) pela *Food and Drug Administration* (FDA), também podendo ser empregada como probiótico (SONG *et al.*, 2017). Além de conferir sabor, a *L. lactis*, sendo uma bactéria ácido-láctica (BAL), também é produtora de ácido láctico que preserva os alimentos. Algumas cepas melhoram ainda mais essa propriedade de preservação com a produção de bacteriocinas, reforçando seu papel na indústria de alimentos (BOLOTIN *et al.*, 2001). Ademais de sua importante função nos alimentos, *L. lactis* tornou-se o modelo de bactéria ácido-láctica para o estudo de engenharia genética. Vários fatores, incluindo seu tamanho pequeno e genoma totalmente sequenciado (2,3 Mbp), o desenvolvimento de ferramentas de engenharia genética compatíveis – como clonagem e sistemas de expressão com opções personalizáveis –, tornaram-na um modelo desejável (LINARES *et al.*, 2010). Nas últimas duas décadas, *L.lactis* ampliou consideravelmente sua aplicação em alimentos e estudos realizados sobre essa bactéria e em muitas ocasiões, atuando como uma alternativa em relação ao uso de gram-positiva *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus plantarum*, ou a Gram-negativa, *Escherichia coli*, sendo a *E. coli* um dos microrganismos modelos mais estudados pela ciência (GARCIA-FRUITOS, 2012).

As bacteriocinas são pequenos peptídeos com propriedades antibacterianas. Estes são produzidos por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Até agora, algumas centenas de bacteriocinas foram descritas. A classificação de bacteriocinas sofre alterações contínuas à medida que novos desenvolvimentos em relação à sua estrutura, a sequência de aminoácidos e o mecanismo reconhecido de sua ação estão disponíveis (BACTIBASE, 2013; BAGEL, 2013). Algumas bacteriocinas (lantibióticos) contêm aminoácidos atípicos, como lantionina (Lan), metilantionina (MeLan), desidroalanina (Dha), desidrobutirina (Dhb) ou D-alanina (D-Ala). As

bacteriocinas mais reconhecidas são produzidas por bactérias ácido-láticas, incluindo nisina produzida por cepas de *Lactococcus lactis* (ARNISON *et al.*, 2013).

Estas bacteriocinas foram reconhecidas como totalmente seguras para os seres humanos. Atualmente, a nisina é usada como agente de preservação na indústria de alimentos. Outras bacteriocinas de bactérias lácticas e preparações probióticas fornecem uma alternativa aos antibióticos e são usadas em alimentos e ração animal (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996; DE CARVALHO *et al.*, 2010).

Descobertas há mais de 50 anos, as bacteriocinas podem ser sintetizadas ribossomicamente sob a forma de proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos. Na indústria alimentícia, as bacteriocinas podem ser utilizadas como conservantes naturais para alimentos, além de diminuir o risco de contaminação cruzada e aumentarem o tempo de vida-de-prateleira. Já na indústria farmacêutica, as bacteriocinas são principalmente encontradas no grupo dos lantibióticos que possuem uma possível utilização no tratamento de hipertensão, herpes, inflamações, alergias da pele e tratamento de úlceras (COLLINS *et al.*, 2010; BALCIUNAS *et al.*, 2013; GILLOR *et al.*, 2005).

Segundo Drider *et al.* (2006), a maioria das bacteriocinas conhecidas até então, são sintetizadas envolvendo quatro diferentes genes: o responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o da produção da proteína de transporte ABC (ATP-binding cassette), que externaliza a bacteriocina; e por último, o que codifica uma proteína acessório, não pertencente ao transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina.

A bacteriocina mais reconhecida da classe I é a nisina, produzida por certas cepas de *Lactococcus lactis*. A nisina manifesta uma ampla gama de atividade antibacteriana direcionada contra bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Listeria*. Isto previne também contra a formação de esporos e inibe desenvolvimento de células bacterianas vegetativas de *Bacillus* e gêneros de *Clostridium* (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 1996; CINTAS *et al.*, 1998; CHEIGH e PYUN, 2005). Hoje, a grande maioria dos estudos da produção de bacteriocinas está dedicada às bactérias ácido-láticas síntese de peptídeos a partir das bactérias ácido-láticas (LAB) – como *Lactococcus* spp. (Nisin), *L. plantarum* (AcH Pediocin),

Enterococcus spp. (Enterocin), e *Pediococcus* spp. –, para aplicação como preservantes naturais de alimentos (CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2009; DEEGAN *et al.*, 2006; RILEY & CHAVAN, 2007).

Alguns pesquisadores relatam que a microencapsulação é muito importante para auxiliar na proteção das bactérias probióticas, já que devem sobreviver às operações de processamento e estocagem do produto, assim como ao ambiente gástrico, enzimas hidrolíticas e sais biliares do trato gastrointestinal (Capela *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2014). Ademais, a microencapsulação pode promover a liberação controlada no local de ação dos microrganismos probióticos, otimizando, portanto, a sua eficiência (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008, 2011; KRASAEKOOPT *et al.*, 2006).

Em geral, a encapsulação é definida como o processo de atrelamento de uma substância (também conhecida de material do núcleo ou de agente ativo) dentro de outra substância, como material da parede ou do agente de revestimento (FANG & BHANDARI, 2010). Ambos os materiais do núcleo e agente de revestimento podem ser materiais puros ou de misturas (ERSUS & YURDAGEL, 2007).

O material a ser usado para encapsular as bactérias probióticas deve conter propriedades que levem em conta a natureza delicada destas cepas, além da técnica a ser empregada (Ribeiro *et al.*, 2014). Favaro-Trindade & Grosso (2002) avaliaram a tolerância de *L. acidophilus* e de *B. lactis* microencapsulados em acetato ftalato de celulose, pela técnica de *spray drying*, em soluções de pH e bile, similares às encontradas no estômago e intestino, e demonstrou que esta técnica foi responsável por aumentar a viabilidade das cepas probióticas. É importante salientar que os agentes encapsulantes devem ser certificados como GRAS “Geralmente Reconhecido como Seguro”, além de detalhar o tipo de liberação do produto e estabilidade (NEDOVIC *et al.*, 2011).

Entre as técnicas de encapsulação propostas, o *spray drying* é uma das mais utilizadas em bactérias lácticas probióticas (ANEKELLA & ORSAT, 2013), uma vez que é um processo contínuo e tem baixos custos no processo, além de produzir partículas secas de boa qualidade (FANG & BHANDARI, 2011). Esta técnica consiste na atomização em gotículas de uma formulação líquida que contém tanto material do núcleo e agente de revestimento. Em seguida, um gás de processo aquecido (ar ou nitrogênio) conduz a uma intensa evaporação da umidade da

superfície da gota, o que a mantém fresca até que o estado seco seja alcançado (FANG & BHANDARI, 2012), permitindo, assim, o processamento de ingredientes sensíveis ao calor como os carotenoides ou polifenóis (GHARSALLAOUI, *et al.*, 2007). Deste modo, espera-se que a microencapsulação promova aumento da viabilidade celular seja na vida-de-prateleira do produto, seja na presença de estresse gastrointestinal, conseguindo ser liberado no sítio de ação ideal.

Com o objetivo de apresentar uma opção de alimento funcional para os consumidores em geral, e principalmente para aqueles que não apreciam ou não podem consumir derivados do leite – como os intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite, hipercolesterolêmicos e vegetarianos estritos –, o presente trabalho tem como objetivo geral o estudo tecnológico de um produto fermentado em meio de soja com duas linhagens de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus plantarum* CECT-221 e *Lactococcus lactis* CECT-40434 (coleção espanhola de cultivos-CECT).

Os objetivos específicos foram:

- Estudar os parâmetros cinéticos do processo fermentativo;
- Avaliar as respostas do planejamento experimental de misturas com inclusão de variáveis de processo em preparado de soja fermentado;
- Determinar a pós-acidificação do produto fermentado de soja em tempos pré-determinados (1, 14 e 28 dias) de armazenamento a 4°C;
- Realizar a contagem microbiológica das culturas lácticas em tempos pré-determinados (1, 14 e 28 dias) de armazenamento a 4°C;
- Determinar os principais oligossacarídeos e ácidos orgânicos;
- Determinar os principais ácidos graxos e peptídeos bioativos;
- Estudar o estresse gastrointestinal *in vitro* em modo estático;
- Determinar atividade antimicrobiana de possíveis bacteriocinas em tempos pré-determinados (1, 14 e 28 dias) de armazenamento a 4°C;
- Estudo dos parâmetros termodinâmicos do metabolismo (Etapa Itália);

Este trabalho está estruturado em capítulos. O Capítulo I apresenta o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento deste projeto. Os capítulos II e III estão na forma de artigos científicos que serão submetidos à publicação, resultantes do desenvolvimento deste projeto de doutorado. Neles estão descritas as metodologias empregadas na condução dos experimentos, bem como a análise e discussão dos resultados.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

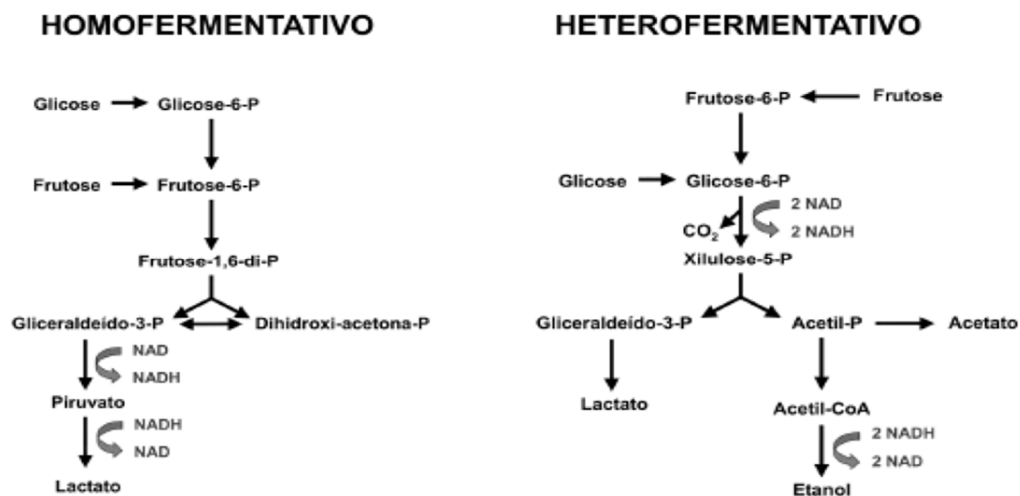
O importante papel das bactérias ácido-láticas (BALs), do ponto de vista tecnológico, é ilustrado pela produção de biomoléculas de alto valor agregado durante o processo fermentativo, produzindo ácido láctico como maior bioproduto do metabolismo. Além disso, algumas culturas lácticas, inclusive probióticas, produzem ácido acético, ácido málico, etanol, aromas (diacetil e acetoína), bacteriocinas, exopolissacarídeos e importantes enzimas (proteases), aumentando, assim, a vida-de-prateleira e segurança microbiológica do produto fermentado, melhorando, deste modo, a textura e características sensoriais do produto (LEROY e VUYST, 2004; MAYO *et al.*, 2010). Em particular, as propriedades antimicrobianas das BALs permitiram o aumento da vida-de-prateleira de muitos alimentos através de processos de fermentação (PAPAGIANNI e PAPAMICHAEL, 2011). De fato, a inibição de microrganismos deteriorantes dos alimentos pode ser atribuída à produção de compostos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, antibióticos e bacteriocinas (SARIKA *et al.*, 2010).

Algumas espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Pediococcus* inibem o crescimento de outros micro-organismos, incluindo os patogênicos intestinais e os deteriorantes, através da produção de compostos antibacterianos ou bacteriocinas (AHMAD *et al.*, 2010; SAAD *et al.*, 2013). Além disso, essas espécies, citadas anteriormente, podem ser consideradas probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Para isso, tem sido sugerido que uma das desejáveis propriedades das cepas probióticas seja a habilidade de produzir substâncias, como bacteriocinas, a qual oferece o potencial de fornecer vantagem na colonização e competição do trato gastrointestinal (CASTRO *et al.*, 2011).

Por definição, as bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por uma ampla variedade de bactérias, incluindo BALs, que apresentam espectro de ação contra uma variedade de microrganismos incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, fungos e vírus (REDDY *et al.*, 2009). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, particularmente BALs, apresentam amplo espectro como bioconservante de alimentos e como agente terapêutico (GALVEZ *et al.*, 2008). Estruturalmente, esses peptídeos são compostos de 20 a 60 aminoácidos e podem ser responsáveis pelas principais propriedades das bacteriocinas, que incluem a tolerância ácida, termoestabilidade e especificidade bactericida (COLINS *et al.*, 2010). A nisina é o exemplo mais conhecido, que é bioproduzida por muitas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo considerada o protótipo de bacteriocina de BALs (PERIN *et al.*, 2012). As bactérias ácido-lácticas apresentam viabilidade em pH baixo. Além disso, possuem um sistema de transporte de ácido láctico e prótons para o exterior celular de forma simultânea, levando a homeostase do pH interno gerando energia (TORO, 2005; BERNARDEAU *et al.*, 2008). Estas bactérias são classificadas entre mesofílicas e termofílicas, de acordo com sua temperatura de crescimento. As mesofílicas crescem em aproximadamente a 30°C e as termofílicas se desenvolvem a uma temperatura próxima de 42°C (SYBESMA *et al.*, 2006). Os gêneros mais representativos são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Tetragenococcus* (DANIEL *et al.*, 2011).

As bactérias ácido-lácticas apresentam condições nutricionais específicas em relação ao meio de cultivo, por meio de metabolismo fermentativo estreitamente dependente da quebra de açúcares para obtenção de energia. Através dos produtos finais da fermentação, podem ser classificadas em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas (Figura 1). As primeiras sintetizam apenas ácido láctico, já as heterofermentativas além de ácido láctico, produzem outros compostos como ácido acético, aldeído, diacetil, dióxido de carbono e etanol (MARTINS *et al.*, 2006; GONÇALVES, 2009).

Figura 1: Rota metabólica homofermentativa e heterofermentativa de bactérias lácticas.



Fonte: Adaptado de KANDLER (1983).

Por meio da via Embden-Meyerhof (glicólise), as bactérias homofermentativas convertem as hexoses, quase totalmente, em ácido láctico, sendo que um mol de glicose ou outro substrato glicosídico é convertido a dois moles de ácido láctico, na ausência de oxigênio molecular. O processo ocorre em duas etapas: primeiramente a glicose é fosforilada por ATP e clivada para originar gliceraldeído fosfato. Na sequência, o gliceraldeído fosfato é transformado em ácido láctico através de várias reações de óxido-redução, acopladas por moléculas de NADH e NAD à fosforização do ADP, ocorrendo, desta forma, os ciclos de fermentação subsequentes (BRIANS; WARNER, 2003; GONÇALVES, 2009). Por meio da lactato-desidrogenase, o piruvato é reduzido a ácido láctico, utilizando NADH como doador de hidrogênio. São produzidas quatro moléculas de ATP para cada molécula de glicose fermentada, tendo em vista que duas moléculas são consumidas, a produção líquida é de duas moléculas de ATP por molécula de glicose fermentada (TORO, 2005).

A via pentoses-fosfato (Dickens) é utilizada pelas bactérias heterofermentativas, assim as hexoses são fermentadas a ácido láctico em 50 % e o restante (ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono, álcool) são simultaneamente fermentados com duas moléculas de ATP e NADH₂NAD para que ocorra a continuação do processo de fermentação (GONÇALVES, 2009).

As bactérias lácticas constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos na indústria alimentícia. São produtoras de uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo: ácidos (lático e butírico), diacetil, peróxido de

hidrogênio, dióxido de carbono, álcool, aldeído e bacteriocinas (BALCIUNAS *et al.*, 2013; MAYO *et al.*, 2010). Todos esses compostos podem antagonizar o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas presentes nos alimentos, como as bacteriocinas, que têm atraído grande interesse na indústria de alimentos, em decorrência ao seu uso potencial como conservante “natural” (BROMBERG *et al.*, 2006; COLLINS *et al.*, 2010).

Sendo necessária uma avaliação mais ampla, a EFSA (*European Food Safety Authority*) propôs um método de análise de segurança antes da comercialização de grupos específicos de microrganismos, ocorrendo a elaboração de uma “Presunção de Segurança Qualificada” (QPS), ou seja, avaliar a segurança de um grupo taxonômico definido, um gênero ou grupo de espécies, realizado com base no estabelecimento da identidade, patogenicidade e aplicação final (EC, 2007). Como resultado desta avaliação, a EFSA publicou em 2007 que 33 gêneros de *Lactobacillus* possuem QPS, tais gêneros encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Espécies de *Lactobacillus* com status QPS (EC, 2007).

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>	

Fonte: European Food Safety Authority, 2007.

1.2. Probióticos

1.2.1. Definição

A OMS- (Organização Mundial da Saúde) define probióticos como “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, entre estas bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e leveduras.

1.2.2. Características

Os critérios mínimos exigidos para um produto ser considerado probiótico incluem conter especificação por gênero e cepa, ser de origem humana, conter bactérias vivas, ser resistente aos processamentos tecnológicos de fabricação e ao ambiente ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas, ter capacidade de colonização e de adesão às células da mucosa intestinal, produzir substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas, auxiliar na prevenção da translocação bacteriana, ser seguro ao uso humano e não apresentar patogenicidade (OLIVEIRA *et al.*, 2002; SZAJEWSKA *et al.*, 2006; THEOPHILO; GUIMARÃES, 2008).

1.2.3. Dosagem

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão responsável por especificar a dose que deve ser inserida nos produtos industrializados, bem como as exigências para a comercialização do produto. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g, devendo ser ingeridos diariamente para garantir um efeito contínuo, conforme indicação do fabricante. No entanto, a concentração de probióticos pode variar bastante conforme a cepa e o produto, alguns demonstrando ser eficazes a níveis mais baixos, enquanto outros requerem quantidades muito maiores. Dessa forma, não é possível estabelecer uma dose geral para todos os probióticos e a recomendação é basear a dosagem de acordo com estudos em humanos que mostrem benefícios à saúde, conforme mostrado na tabela 2 (OMG, 2011; BRASIL, 2002).

Tabela 2: Relação efeito/benéfico- Mecanismos de ação

Efeitos e Benefícios	Possíveis causas e mecanismos
Alívio da intolerância a Lactose	Redução de lactose no produto e maior disponibilidade de β -galactosidase no trato gastrointestinal.
Ação contra patógenos entéricos	Exclusão competitiva, produção de compostos antimicrobianos e prevenção de adesão de patógenos.
Controle e prevenção de alergias	Barreira imunológica e modulação do sistema imune.
Efeitos anticarcinogenico	Conversão de compostos carcinogênicos em compostos inócuos, degradação de pré-carcinogenos, redução de enzimas promotoras de processos cancerígenos, normalização da permeabilidade intestinal e estimulação do sistema imune .
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese de colesterol, uso de colesterol por assimilação e precipitação com sais biliares desconjugados.
Modulação imunológica	Melhora a formação de macrófagos, estimula a produção de células supressoras e de γ -interferon e diminui ocitocinas pré inflamatórias.

Fonte: Adaptado de VASILJEVIC & SHAH (2008).

1.3. MICROENCAPSULAÇÃO

A aplicação de probióticos, no entanto, tem a dificuldade de elaborar produtos com uma boa resistência ao processamento e viabilidade durante toda a vida útil do produto, uma vez que algumas cepas são extremamente sensíveis a fatores como meio ácido e oxigênio. Neste contexto, a microencapsulação tem sido proposta para auxiliar na proteção dos probióticos aos efeitos adversos do ambiente, além de promover a liberação controlada no local de ação do microrganismo, otimizando sua eficiência (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

O uso de uma matriz de polissacarídeo exemplo (maltodextrina ou Inulina) parece ser uma alternativa viável para proteger os microrganismos (probióticos) frente à exposição à água e íons H^+ (LAHTINEN *et al.*, 2007), cuja vantagem é ser facilmente digerida pelo intestino, pelas lipases, possibilitando a liberação do

probióticos em seu site de ação (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2011), aumentando sua eficiência.

Até hoje, já foram realizados diferentes métodos com diferentes tecnologias para encapsulação de probióticos, embora algumas tecnologias de encapsulação tenham alcançado resultados satisfatórios na proteção dos probióticos, pesquisas sobre novas tecnologias de encapsulação, bem como novos agentes encapsulantes, são importantes para possibilitar a obtenção de micropartículas de baixo custo e em escala industrial, para, assim, serem incorporados pela indústria (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2011).

Muitos materiais podem ser utilizados como encapsulantes na confecção de micropartículas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carregena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrolulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; a proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (JACKSON & LEE, 1991).

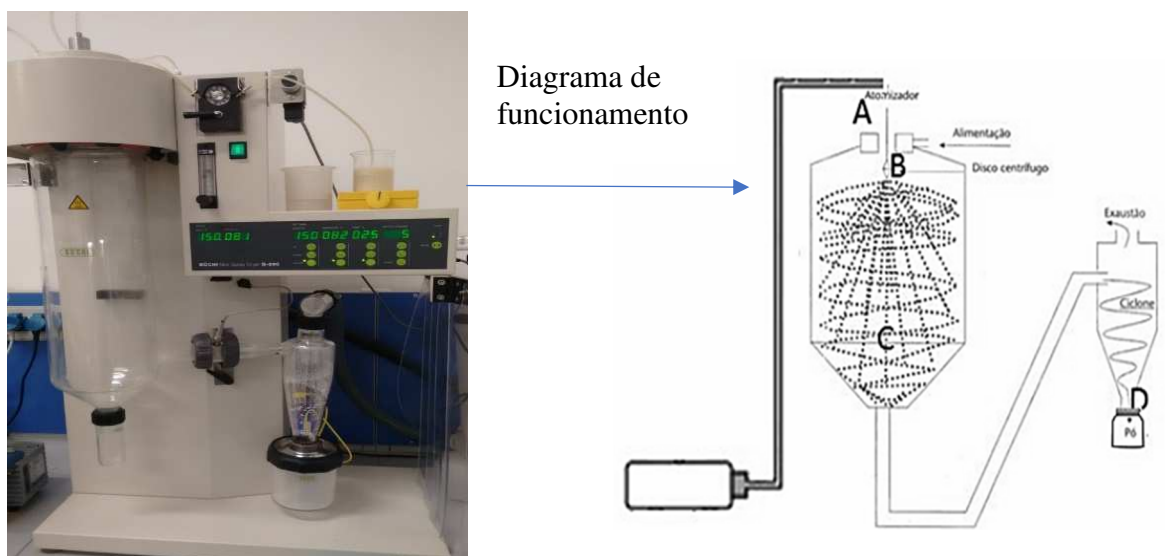
Várias técnicas têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008) a seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON & LEE, 1991), mas nem todas as técnicas podem ser aplicadas para encapsular probióticos devido à toxicidade de alguns compostos como solventes orgânicos. Outro fator é o tamanho das células e o custo para confecção destes produtos, sendo este um dos maiores problemas para indústria de alimentos (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2011).

De acordo com Santos *et al.* (2000), existem algumas características importantes para que o agente encapsulante deva ser considerado ideal, devendo apresentar: baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser fácil de manusear durante o processo de microencapsulação; proteger o material a encapsular de circunstâncias adversas, como oxigênio, luz e pH; ter propriedades desejadas de liberação do material a encapsular; solúvel em solventes usados; apresentar sabor agradável quando administrado por via oral.

1.3.1. SPRAY DRYING

O *Spray drying* (secagem por pulverização) é uma tecnologia de secagem simples, rápida, reproduzível e escalável, que permite condições de temperatura moderada, que são adequadas para compostos biofarmacêuticos e microrganismos sensíveis ao calor. Está bem estabelecida na indústria química de alimentos e na indústria farmacêutica. Comparada a outras tecnologias de secagem usadas em aplicações de entrega de medicamentos, o *spray drying* é um processo contínuo para transformar diretamente vários líquidos (por exemplo, soluções, emulsões, dispersões, pastas) em pequenas partículas sólidas (microcápsulas), o *spray drying* está disponível comercialmente e o custo de produção é consideravelmente mais baixo em comparação com outras tecnologias de secagem, como, por exemplo, a liofilização.

Figura 2: Esquema do equipamento do spray drying.



Fonte: Esquema autoral.

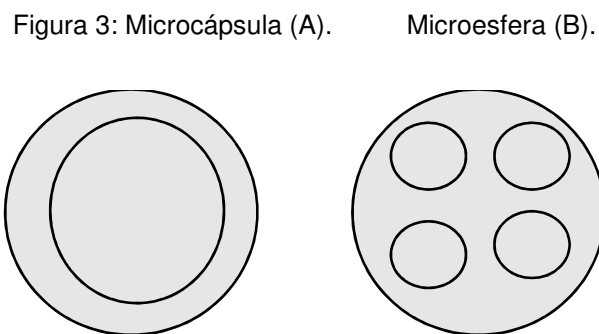
O custo para utilização do ingrediente encapsulado também é considerado um fator limitante no emprego da encapsulação pela indústria alimentícia. De acordo com Gouin (2004), sugere-se que não seja ultrapassado um custo adicional de € 0,1/kg ao alimento. As etapas do processo do spray drying são basicamente: (1º) aquecimento do gás de secagem; (2º) geração de gotículas; (3º) secagem das gotículas; e (4º) coleta de partículas. O equipamento possui um sistema de bombeamento, por onde a suspensão é aspirada até a região (A), onde há um sistema de aquecimento do ar de entrada. Localizado na região (B), existe um bocal (bico atomizador) que possui saída para a suspensão e o ar. A atomização é iniciada quando a suspensão, sob efeito da compressão do gás, entra pelo pequeno orifício do bico atomizador, formando pequenas gotículas que representam um dos pontos críticos do processo, já que o tamanho da gota formada determina o tamanho da partícula. A atomização é realizada usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, e as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente na câmara de secagem (C), transformando-se em partículas sólidas (MAFART, 1994). Pela formação de um sistema de sucção, o gás movimenta-se de forma circular, formando um movimento de ciclone que encaminha as partículas secas para o recipiente coletor (D).

No contexto de aplicações de encapsulamento de microrganismos, os principais benefícios são:

- Controle do tamanho, forma e morfologia das partículas (forma amorfa/cristalina, porosidade);
- Processo de uma etapa para converter diretamente vários alimentos líquidos em pós secos;
- Simplicidade e facilidade de operação do processo;
- Baixo custo operacional, tecnologia eficiente em energia e rapidez no processo;
- Capacidade de expansão;
- Projeto de ciclo aberto e fechado para secagem por pulverização de solventes orgânicos e aquosos;
- Processamento de substâncias sensíveis ao calor com baixo risco de degradação;

- Projeto de partículas com propriedades controladas de liberação de medicamentos;
- Alta eficiência de encapsulamento e vida útil prolongada;
- Técnica versátil para a formulação de microcápsulas com vários excipientes encapsulantes.

No processo de microencapsulação podem ser produzidos dois tipos básicos de estruturas: a microcápsula, onde a partícula é formada de um único núcleo e está envolvida por uma fina parede (Figura 3A); e a microesfera, onde o material encapsulado está uniformemente distribuído (Figura 3B).



Fonte: Desenho autoral.

1.3.2. INULINA UM PREBIÓTICO COMO AGENTE ENCAPSULANTE

Os efeitos atribuídos aos prebióticos são: (a) estimulação seletiva da multiplicação das bactérias benéficas no cólon; (b) potencial para reprimir patógenos e limitar virulência por imunoestimulação; (c) modulação de funções fisiológicas, como a absorção de cálcio e o metabolismo lipídico e; (d) redução do risco de câncer de cólon. (SAAD *et al.*, 2013). Os prebióticos atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora possam ter algum efeito no intestino delgado (KOLIDA; TUOHY; GIBSON, 2002).

Dentre os prebióticos, a inulina é uma dos mais estudados e com propriedades bem estabelecidas (GIBSON *et al.*, 2004). A inulina é um carboidrato de reserva naturalmente presente nas plantas da família *Asteraceae* (RONKART *et*

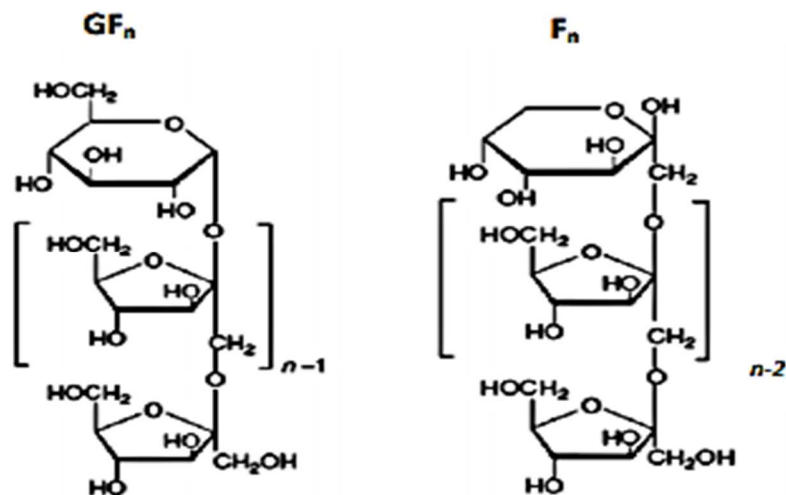
al., 2009). No entanto, a espécie *Cichorium intybus* (chicória) é a mais utilizada para a extração industrial de inulina (ROBERFROID, 2007), enquanto a oligofrutose é obtida a partir da inulina (GIBSON *et al.*, 2004).

O uso de excipientes como material de parede no processo de microencapsulação por *spray dryer* é de prática comum. Um dos materiais mais utilizados como agente encapsulante na secagem por atomização é a inulina, em razão de seu baixo custo e baixa higroscopicidade, o que evita a aglomeração de partículas (ANSELMO, 2006). A inulina de batata foi o primeiro produto comercial no mercado, apresentando capacidade de formar um gel suave e reversível e sendo aplicado como substituto parcial da gordura em sorvetes e molhos para saladas. Desde então, várias maltodextrinas têm sido produzidas para diversas aplicações (KENNEDY; KNILL; TAYLOR, 1995).

Quimicamente, os frutanos do tipo inulina são carboidratos polidispersos compostos por cadeias lineares de unidades de frutose, ligadas entre si por ligações β 2-1, com ou sem uma unidade final de glicose (Figura 4) (ROBERFROID, 2007).

Dependendo do comprimento da cadeia, definido pelo número de unidades de monossacarídeos – denominado grau de polimerização (DP) –, tem-se a inulina e a oligofrutose (SAAD, 2006). O grau de polimerização (DP) da inulina extraída da chicória varia entre 2 e 60. A oligofrutose (DP 2-9) é produzida pela hidrólise parcial da inulina utilizando uma endoinulinase (EC 3.2.1.7) (BIEDRZYCKA; BIELECKA, 2004).

Figura 4: A estrutura química molecular da inulina é predominantemente do tipo GF_n, podendo apresentar também compostos do tipo F_n, correspondendo G à glucose, F à frutose e n ao número de unidades de frutose presentes, conforme indica a figura.



Fonte: adaptado de FRANCK, 2006.

1.4. PRODUTOS FERMENTADOS DE SOJA

Existem vários tipos de molhos e condimentos feitos a partir de misturas de soja fermentada, como o missô, o shoyu e o tepeh (ENDRES, 2001; SINGH *et al.*, 2008). O missô, feito a partir do grão cozido e fermentado, é utilizado tanto como base para sopas como condimentos para agregar sabor a uma variedade de alimentos e receitas; o shoyu é um molho de soja obtido por meio da fermentação e cozimento da soja e outros cereais – como arroz e milho –, podendo ser adicionado a outras substâncias alimentícias aprovadas pela legislação em vigor; o tempeh é originário da Indonésia e feito a partir dos grãos fermentados e cozidos; o óleo de soja é extraído da semente da soja e é utilizado como fonte de alimento e/ou no preparo, e com as novas tecnologias também pode ser usada, entre outras aplicações, como biocombustível (ANVISA, 1978; ENDRES, 2001; TACO, 2011).

Os produtos de soja apresentam atividades biológicas, como por exemplo, a ação das isoflavonas contra a peroxidação lipídica pelas suas atividades antioxidantes. Além disso, foi reportado que a atividade antioxidante de isoflavonas

agliconas foram superiores às de glicosiladas (ONOZAWA *et al.*, 1998). As isoflavonas glicosiladas podem ser transformadas, por processos enzimáticos, em agliconas como daidzeína e genisteína, cujas atividades antioxidantes têm sido superiores às das formas glicosiladas (PARK *et al.*, 2001). O perfil nutricional da soja se divide em (40% de proteínas, 30% de carboidratos e 20% de lipídios), contribuindo para melhora do perfil lipídico, hormonal em mulheres com menopausa, alta demanda de proteínas, também podendo agir benéficamente em pacientes com *Diabetes mellitus tipo 2* através dos transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT4). Porém, ainda não foi elucidado como a soja influencia em tais fatores (LAMMI *et al.*, 2015; VILLEGAS, 2008; MUELLER *et al.*, 2012).

1.4.1. PRODUTOS DE SOJA FERMENTADOS COM PROBIOTICOS

Produtos fermentados de soja contendo probióticos demonstram, após a fermentação por bactérias lácticas, uma queda do pH que conferem características sensoriais como viscosidade e acidez. É necessário que os produtos fermentados conservem suas características sensoriais durante a vida de prateleira, mas tem-se observado que o pH continua decrescendo, com conseqüente sinérese e mudanças na consistência. As culturas starter fermentam açúcares para produzir ácido láctico, que serve para acidificar o produto, preservá-lo, conferir-lhe sabor, além de hidrolisar proteínas, alterando a textura do produto (BATT, 1999). Algumas possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos quando fermentadas em meios apropriados (TUINIER *et al.*, 2000, GORRET *et al.*, 2003; CHAMPAGNE *et al.*, 2006; GRATTEPANCHE *et al.*, 2007). Tem sido atribuídas às bactérias lácticas (BAL) produtoras de EPS, o efeito benéfico à saúde (CHABOT *et al.*, 2002). Em muitos casos, os polissacarídeos liberados extracelularmente por bactérias lácticas oferecem vantagens em uma variedade de produtos de alimentos fermentados (CERNING, 1990). De fato, em vez de usar aditivos como melhoradores da textura, estabilizantes, emulsificantes, gelificantes ou agentes antisinérese em alimentos fermentados, pode ser conveniente usar bactérias lácticas produtoras de EPS como culturas starter (SMITINONT, 1999).

Em relação aos produtos fermentados de soja, vários estudos já foram realizados, no sentido de identificar microrganismos e componentes produzidos durante a fermentação que afetam diretamente a aceitação. A utilização do

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus fornece um produto de melhor aceitação em relação àqueles fermentados apenas com o *Streptococcus thermophilus*. Na literatura, é descrito que tal fato deve-se à capacidade do microrganismo em produzir diferentes concentrações de aldeídos (n-pentanal e o n-hexanal), sendo responsáveis por um sabor desagradável (PINTHONG *et al.*, 1980). Há diversos trabalhos descrevendo o emprego de bactérias ácido-lácticas como: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactococcus lactis*, dentre outros. Na tabela 3 são apresentados alguns dos trabalhos realizados que avaliaram a estabilidade de produtos derivados de soja com características probióticos e prebióticos.

Tabela 3: Características de fermentados de soja (probióticos).

Produto	Microrganismo	Tempo de estudo /temperatura	Viabilidade	Referência
“iogurte” de soja	<i>E.faecium</i> CRL 183 <i>Lhervectucus subsp. Jugurti</i> 416	21 dias/10°C	10 ⁷ a 10 ⁹ UFC/mL	ROSSI <i>et al.</i> ,2000
“iogurte” de soja	<i>L.acidophilus</i> e <i>B.infantis</i>	45 dias/4°C e 12°C	10 ⁶ UFC/mL	CANGANELLA <i>et al.</i> , 2000
“iogurte” de soja medicinal	<i>L.delbrueckii subsp.latis</i> <i>L.plantarum</i>	30 dias/4°C	10 ⁷ UFC/mL	PYO e SONG 2009
“queijo” de soja	<i>DH1,GH4</i> <i>L.casei subsp.rhamnosus</i>	30 dias/10°C	10 ⁷ a 10 ⁶ UFC/mL	LIU <i>et al.</i> , 2006
“iogurte” de soja e yacon	<i>E.faecium</i> CRL 183 <i>Lhervectucus subsp. Jugurti</i> 416	21 dias/5°C	10 ⁸ UFC/mL	PAULY-SILVEIRA, 2009

Fonte: Saad, 2006

Conforme descrito por Pyo e Song (2009), desenvolveram um “iogurte” de soja fermentado com *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* e *Lactobacillus plantarum*, contendo ácido γ -aminobutírico (GABA), aminoácidos livres, estaminas e isoflavonas agliconas. Os elevados teores de fitoquímicos funcionais foram alcançados pela adição de soja fermentada com *Monascus pilosus* (MFSE-1,5%), dando resultado ao um produto probióticos de soja funcional com boa aceitação.

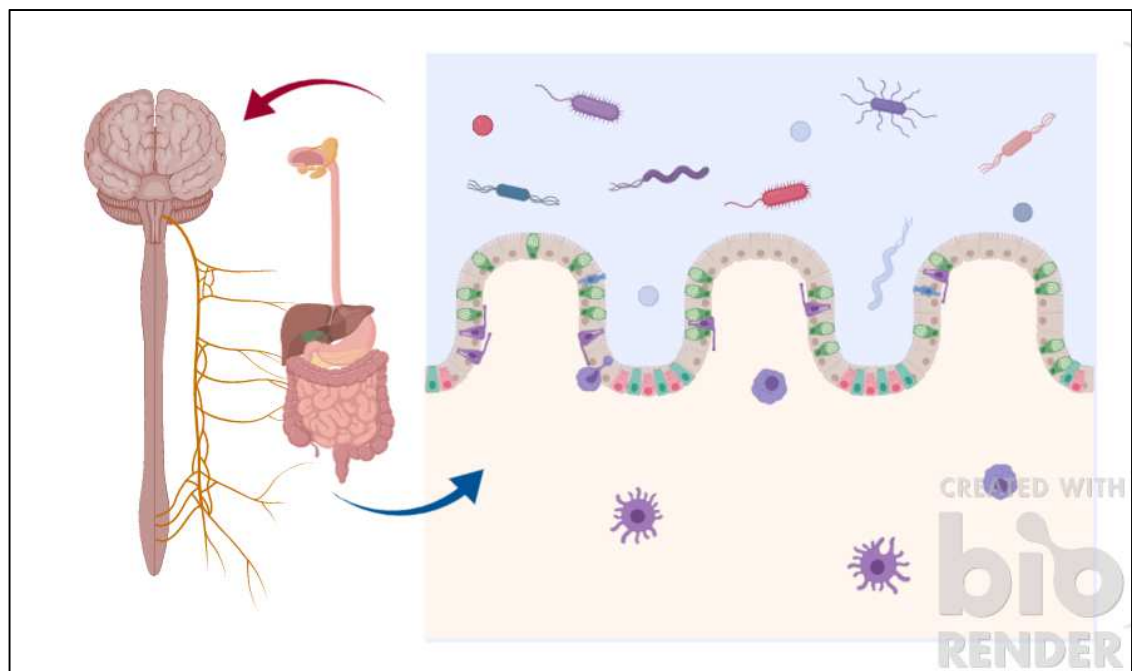
1.5. TRATO GASTROINTESTINAL E SUA MICROBIOTA

No intestino delgado, ocorre a digestão enzimática dos alimentos e a absorção dos nutrientes. Já o cólon é o local responsável por absorver grande quantidade de água e eletrólitos, permitir a evacuação de resíduos e substâncias tóxicas, e ainda alojar várias espécies de bactérias que irão metabolizar os substratos que não foram digeridos pelo intestino delgado. A degradação desses compostos resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta e estes, por sua vez, servem de substrato para as células epiteliais do cólon (MACFARLANE, 1997). A barreira intestinal, composta pelo endotélio vascular, revestimento das células epiteliais e camada de muco, cobre uma superfície de cerca de 400 m². A integridade da parede intestinal é sustentada por proteínas transcelulares formando junções estreitas entre as células epiteliais. Protegida por três camadas de mucina, a parede intestinal forma uma barreira não permeável, manter enzimas digestivas e microrganismos dentro do espaço luminal, separar da corrente sanguínea. Microrganismos que colonizam o intestino podem produzir bacteriocinas na tentativa de superar patógenos (DRISSI *et al.*, 2015).

Logo após o nascimento, o trato gastrointestinal (TGI) dos seres humanos, até então estéril, é colonizado por população microbiana materna e ambiental (BARBOSA *et al.*, 2006), onde a maioria da microbiota intestinal saudável advém da mãe. Assim, fatores como dieta, ambiente e estresse vão influenciar a composição da flora da mãe e, conseqüentemente, a da criança ao nascer. Portanto, o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido é fortemente dependente das práticas de alimentação maternas e da higiene do ambiente (SALMINEN & ISOLAURI, 2006). Depois de ser colonizado, entre um e dois anos, o trato gastrointestinal passa a abrigar uma população microbiana bastante densa e variável (NICOLI, 1995).

Segundo descrito pelo Instituto Danone Research (IDR) (2007), a manutenção de uma microbiota intestinal estável depende de três fatores: fisiológico, iatrogênico e nutricional. Os fatores fisiológicos se referem à idade, às alterações hormonais como no período da menopausa e ao estresse; os iatrogênicos, à presença ou não de patologias e uso de medicamentos; e os fatores nutricionais, ao consumo de alimentos que contenham substâncias prebióticas ou micro-organismos probióticos.

Figura 5: Ação dos probióticos no intestino.



Fonte: imagem autoral adaptada <https://biorender.com>.

Legenda: competição por ingredientes alimentares usados como substratos de crescimento, bioconversão de, por exemplo, açúcares em produtos de fermentação com propriedades inibitórias, produção de substratos de crescimento tais como EPS ou vitaminas, para outras bactérias, antagonismo direto por bacteriocinas, estimulação da resposta imunológica inata (mecanismos subjacentes desconhecidos) eixo intestino-cérebro, afetado diretamente pela absorção de hormônio e nutriente em relação à microbiota presente. CEI, células epiteliais; CD, células dendríticas; T, células-T.

2. Bibliografia

ANASTASIADOU, S., PAPAGIANNI, M., FILIOUSIS, G., AMBROSIADIS, I., KOIDIS, P.. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 448–454, 2008.

ANEKELLA, K., ORSAT, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 17-24, 2013.

AUGÈRES, MC. **Etude en bioréacteur de la résistance aux stress rencontrés par les bactéries probiotiques lors de leur ingestion** [mestrado profissional]. Thiverval-Grignon: AgroParisTech, 2011. 39 p.

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

BÉAL, C., FONSECA, F., CORRIEU, G. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophilus* is related to membrane fatty acid composition. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 2347–2356, 2001.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comp Rev. Food Science Food Safety*, v. 3, p. 1–20, 2004.

BEDANI, R., VIEIRA, A.D.S., ROSSI E.A., SAAD S.M. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-443, 2014.

BEDANI, R., CAMPOS, M.M., CASTRO, I.A, ROSSI, E.A, SAAD, S.M. Incorporation of soybean by-product okara and inulin in a probiotic soy yoghurt: texture profile and sensory acceptance, **Journal Science Food Agriculture**, v. 94, p. 119-125, 2014.

BERMÚDEZ-HUMÁRAN, L. G., CAMILLE, A., MOTTA, J.P., DERAISON, C., STEIDLER, L., VERGNOLLE, N., CHATEL, J.M., LANGELLA, P. Engineering lactococci and lactobacilli for human health, *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, p. 278–283, 2013.

BOGSAN, C.S.B., FLORENCE, A.C.R., PERINA, N., HIROTA, C., FABIANA, A.S.M., SOARES., SILVA, R.C., OLIVEIRA, M.N. Survival of *Bifidobacterium lactis* HN019 and release of biogenic compounds in unfermented and fermented milk is affected by chilled storage at 4 C. **Journal of Probiotics & Health**, v. 1, p. 114, 2013.

BRINQUES, G.B., AYUB, M.A.S. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 123-128, 2011.

BROMBERG, R., MORENO, I., DELBONI, R.R., CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*ssp. *Hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência. Tecnologia. Alimentos**, v. 26, p. 135-144, 2006.

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

CAPELA, P., HAY, T.K.C., SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, p. 203-211, 2006.

CARBONERA, N., PINHO, M.L. Activity of *Lactobacillus plantarum* on the fermented anchoita (*Engraulis anchoita*) Preservation. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 201-207, 2010.

CHEIKHYOUSSEF, A., POGORI, N., CHEN, H., TIAN, F., CHEN, W., TANG, J, ZHANG, H. Comparison of three different methods for the isolation of bacteriocin-like inhibitory substances from *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 17, p. 182-194, 2009.

COLLINS, B., COTTER, P. D., HILL, C., ROSS, R. P. Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins, in: F. MOZZI, R. R. RAYA, G. M. VIGNOLO. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, p. 89-109, 2010.

CONVERTI, A., DEL BORGHI, A., GANDOLFI, R., LODI, A., MOLINARI, F., PALAZZI, E. (2002). Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 232-237, 2002.

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

DONKOR, O.N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIC, T., SHAH, N.P.. α -Galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. **Food Chemistry**, v. 20, n. 104, p. 120, 2007a.

DONKOR, O.N., NILMINI, S.L.I., STOLIC, P., VASILJEVIC, T., SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **Intitute Dairy Journal**, v. 17, p. 657–665, 2007b.

DONKOR, O. N., HENRIKSSON, A., VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 375–381, 2005.

ERSUS, S., YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 805-812, 2007.

FANG, Z.X., BHANDARI, B. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. **Food Research International**, v. 48, p. 478-483, 2012.

FANG, Z.X., BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1139-1147, 2011.

FANG, Z.X., BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in **Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FAO; WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, ON, Canada, April 30th and May. Disponível em: <1st.ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2015.

FAVARO-TRINDADE, C.S., HEINEMANN, R.J.B., PEDROSO, D.L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. CAB Reviews: **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 4, p. 1-8, 2011.

FAVARO-TRINDADE, C.S., PINHO, S.C., ROCHA, G.A. (2008). Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food technology**. Preprint Serie, v. 11, p. 103-112, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C.S., GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* and *B. lactis* and enaluation of their survival at the pHs values of the stomach and in bile. **Journal of microencapsulation**, v. 19, p. 485-894, 2002.

FLORENCE, A.C.R. **Respostas fisiológicas de bifidobactérias submetidas aos estresses ácido, frio e gastrointestinal em leite orgânico e convencional** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013. 203 p.

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

FLORENCE, A.C.R., BEAL, C., SILVA, R.C., OLIVEIRA, M.N. Survival of three *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains is related to trans-vaccenic and a-linolenic acids contents in organic fermented milks. **LWT - Food Science Technology**, v. 56, p. 290–295, 2014.

FLORENCE, A.C.R., OLIVEIRA, R.P.S., SILVA, R.C., SOARES, F.A.S.M., GIOIELLI, L.A., OLIVEIRA, M.N. (2012a). Organic milk improves *Bifidobacterium lactis* counts and bioactive fatty acids contents in fermented milk. **LWT - Food Sci Technol**, v. 49, p. 89–95, 2012a.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of biological chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRANCO, R. M., OLIVEIRA, L.A.T., CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos: revisão. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 142, p. 22-33, 2006.

GALLEGO, M. B., MAZZO, J. E., SÁNCHEZ, M. M., CARRE, M. P., CODINA, A. F., BRUGUÉ, S. A. El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CECT7315/7316 mejora el estado de salud general em personas de edad avanzada. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, p. 642–645, 2011.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007.

GILLOR, O., NIGRO, L. M., & RILEY, M. A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. **Current pharmaceutical design**, v. 11, p. 1067-1075, 2005.

HASMANN, F.A., GURPILHARES, D.B., ROBERTO, I.C., CONVERTI, A., PESSOA JR., A. New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 849-858, 2007.

JONKERS, D., STOCKBRUGGER, R. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 133-148, 2007.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 49, p. 209-224, 1983.

KIESLER, P., FUSS, I.J., STROBER, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. **CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, p. 154-170, 2015.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., HILTON C. DEETH, H.C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 177-183, 2006.

KWOK, K.K., GROVES, M.J., BURGESS, D.J. A novel method for the determination of sterility of microcapsules and measurement of viability of encapsulated organisms. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 410-413, 1992.

MACHADO, M. R. G. **Bebida de soja fermentada com lactobacillus acidophilus: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional** Dissertação. (Doutorado)- Faculdade Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, 2007.117 p.

MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R., HUIS, T., VELD, J.H.J. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 1031–1037, 1997.

MAYO, B., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., FERNÁNDEZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ-MARTÍN, P., BARDOWSKI, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria, in: F. MOZZI, R.R. RAYA, G.M. VIGNOLO. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, p. 3-33, 2010.

NEDOVIC, V., KALUSEVIC, A., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S., BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, p. 11806-1815, 2011.

OLIVEIRA, A.C., MORETTI, T.S., BOSCHINI., BALIERO, J.C.C., FREITAS, L.A.P., FREITAS, O., FAVARO, T.C.S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 1687-1693, 2007.

OLIVEIRA, M.N., SODINI, I., REMEUF, F., CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **Intitute Dairy Journal**, v. 11, p. 935–942, 2001.

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

PANDEY, S.M., MISHRA, H.N. Optimization of the prebiotic & probiotic concentration and incubation temperature for the preparation of synbiotic soy yoghurt using response surface methodology. **LWT - Food Science Technology**, v. 62, p. 458-467, 2015.

PEREIRA, L. C. **Influência da associação de culturas probióticas sobre as características do queijo petit-suisse**. Dissertação. (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 2007, 94 p.

PHADTARE, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Curr Issues Molecular Biology**, v. 6, p. 125–136, 2004.

PUPIN, A. M. **Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais**. In: Seminário novas alternativas de mercado. Alimentos funcionais e biotecnologia, Campinas, p. 133-145, 2002.

REIFF, C., KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 300, p. 25-33, 2010.

RIBEIRO, M.C.E., CHAVES, K.S., GEBARA, C., INFANTE, F.N.S., GROSSO, C.R.F., GIGANTE, M.L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, v. 66, p. 424-431, 2014.

RILEY, M., CHAVAN, M. **Bacteriocinas: ecology and avolution**. 1st ed. Heidelberg: Springer, 2007.

ROELS, J.A. **Energetics and Kinetics in Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1983.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 1-16, 2006.

SABO, S.S., VITOLO, M., DOMÍNGUEZ, J.M., OLIVEIRA, R.P.S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, v. 64, p. 527-536, 2014.

SOUZA, P.M., ALIAKBARIAN, B., FERREIRA FILHO, E.X., MAGALHÃES, P.O., PESSOA, A., CONVERTI, A., PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 17-21, 2015.

SPINNLER, H.E., & CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal. Dairy Res*, v. 56, p. 755-564, 1989.

STURMER, E.S., CASASOLA, S & COMMORETTO, M.G. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. *Revista Brasileira Nutrição Clínica*, v. 27, p. 264-272, 2012.

TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications: a review. *Euro Jounal Clinical Nutrition*, v. 56, p. 2-15, 2002.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: Production, genetic organization and mode of action. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 209-221, 2009.

VOLKIN, D.B.; KLIBANOV, A.M. Mechanism of thermoinactivation of immobilized glucose isomerase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1104-1111, 1989.

WANG, Y., DELETTRE, J., GUILLOT, A., CORRIEU, G., BÉAL, C. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Cryobiology**, v. 50, p. 294–307, 2005.

AHMAD, C., NATASCHA, C., HAIQIN, C., JIANXIN, Z., JIAN, T., HAO, Z., WEI, C. BIFIDIN I – A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: Purification and Partial amino acid sequence. **Food Control**, v. 21, p. 746-753, 2010.

GALVEZ, A., LOPEZ, R.L., ABRIOUEL, H., VALDIVIA, E., OMAR, N.B. Application of bacteriocins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125-152, 2008.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

MAYO, B., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., FERNÁNDEZ, M., KOWALCZYK, M., PABLO ÁLVAREZ- MARTÍN, P., BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria, in: F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo (Ed.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, p. 3-33, 2010.

OLIVEIRA, R.P.S., PEREGO, P., CONVERTI, A., OLIVEIRA, M.N. Effect of inulin as a prebiotic to improve growth and counts of a probiotic cocktail in fermented skim milk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 520-523, 2011.

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

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

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

PAPAGIANNI, M., PAPAMICHAEL, E.M. Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6730-6734, 2011.

PERIN, L.M., MORAES, P.M., VIÇOSA, G.N., JÚNIOR, A.S., NERO, L.A. Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal**, v. 25, n. 1, 2012.

REDDY, K.V.R, YEDERY, R.D., GUPTA, S.M. Antimicrobial peptides: premises and promises **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536–547, 2009.

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

SARIKA, A.R., LIPTON, A.P., AISHWARYA, M.S. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, p. 291-297, 2010.

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS II e III

Os Capítulos II e III estão apresentados na forma de artigos científicos. Em cada um destes capítulos consta a introdução, os materiais e as metodologias empregadas, juntamente com a discussão dos resultados obtidos e as conclusões pertinentes a cada etapa de trabalho desenvolvida.

O primeiro artigo (Capítulo II - “Use of *Lactobacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in the preparation of a fermented soybean product (probiotic) and its benefits”) é uma revisão que aborda três tópicos principais: Tecnologias de fermentação para a produção de microorganismos potencialmente probióticos; utilização do meio de soja como meio de cultivo; este artigo será submetido ao periódico *Food Reviews International*.

O segundo artigo (Capítulo III –“Thermodynamic investigation on bacteriocin thermostability: the case of nisin”) foi realizado o estudo da termodinâmica da nisina, com o intuito de elucidarmos sua capacidade termo lábil para possível emprego em processos utilizados na indústria alimentar que requer altas temperaturas. Este artigo será foi submetido ao periódico *Journal of Food Engineering*.

CAPÍTULO II - “USE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOCOCCUS LACTIS* IN THE PREPARATION OF A FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (PROBIOTIC) AND ITS BENEFITS”.

**USE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *LACTOCOCCUS LACTIS* IN THE
PREPARATION OF A FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (PROBIOTIC) AND ITS
BENEFITS**

Gabriel Moretti-Almeida*
advisor: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Department of Pharmaceutical Biochemical Technology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences University of São Paulo.

* e-mail: gabrielmoretti@usp.br.

Abstract

Currently, the idea of reducing milk components as vehicles for probiotic agents has been promoted due to the high proportion of individuals with lactose intolerance and allergy to milk protein components. Researchers suggest that lactose intolerance occurs in the sensitized intestinal mucosa, causing abdominal cramps, vomiting, constipation, fecal occult blood loss, and in more severe cases, intestinal obstruction and protein-losing enteropathy. Taking into consideration the pathologies related to food intolerance, new alternatives such as soy-based probiotic fermented beverages instead of dairy products have been emphasized in the diet, since besides providing a beneficial modulation of the intestinal microbiota, they may act to decrease the intestinal microbiota immune stress. The CINAC system acidification kinetics of the different formulations were performed at 42°C. The ternary co-culture composed of *Lactococcus lactis* (LL), *Lactobacillus bulgaricus* (LB), *Streptococcus thermophilus* (ST) was the highest acidification rate (V_{max} 11.40 x 10⁻³ units). pH / min) 10.12 hours to reach pH 4.5 (P <0.05), after acidification the *Lactococcus lactis* (LL) strain presented the lowest significant acidification rate in relation to the others at 37°C p <0.05 and the *Lactobacillus plantarum* ternaria coculture. (LP), *Lactobacillus bulgaricus* (LB) and *Streptococcus thermophilus* (ST) presented the highest acidification rate in relation to the other p <0.05, at 42°C, and the highest acidification rate was *Lactococcus lactis* (LL) next to *Lactobacillus plantarum* (LP). In microbiological counting all microorganisms at different temperatures and formulations maintained viability above 10⁶ after 28 days of storage at 4°C.

1. INTRODUCTION

Consumers today are increasingly interested in having a healthy life, seeking foods that contribute to their health safely. Among the foods that favor an improvement in health, soybean has stood out due to its high protein content when compared to bovine milk, making it an alternative for people who are looking for an alternative to healthy foods or even have milk intolerance and/or are allergic to milk protein (SMIDERLE, 2006).

Soybean (*Glycine max*) is a unique legume that was discovered more than 5000 years ago in the north of China. Due to its versatility, it is considered one of the most complete foods known to man and has great potential to act in the region, health maintenance and reduce the risk of different chronic diseases (MATEOS-APARECIDO *et al.*, 2008). Brazil is currently the second largest soybean producer in the world, only behind the United States of America, which also places Brazil as the second largest importer of soybean grain, oil and meal (CHAUDHARY *et al.*, 2015; EMBRAPA, 2016)

Due to the nutritional characteristics of soybean and its health benefits, its consumption has increased, and also has great rejection for its residual flavor and increased flatulence being correlated to these problems with the oligosaccharides (stachyose and raffinose) naturally present in soybeans and other legumes (BEDANI *et al.*, 2014).

To improve the taste and increase its consumption, the lactic fermentation of soluble soy extract has seen as an alternative and can be combined with sucrose supplementation improving its sensory characteristics (BEHRENS, ROIG, SILVA, 2004).

With the lactic fermentation of soy, we can give functional characteristics to this food with the addition of probiotic bacteria, helping in the treatment of some inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis (CU) and Crohn's disease, lactic acid bacteria with properties. Probiotics act by modulating the intestinal microbiota, in addition to improving lactose digestion and reducing symptoms of intolerance to this carbohydrate (PANDEY, MISHRA, 2015).

Probiotics are living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer some health benefit (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014). These microorganisms belong to different genera and species, both bacteria and yeast, and

have been associated with several beneficial effects. For a product to be considered probiotic, it must offer a minimum amount of 10^8 to 10^9 CFU probiotic bacteria in the daily portion (BRAZIL, 2008). The human microbiota is the focus of several research regarding its dynamics and relationship with different diseases and is one of the largest fields of research today. Most efforts are directed to the gastrointestinal tract (gut axis brain and neuroimmunoendocrine), which houses most of our microorganisms. Within the last decade, our understanding of the organisms that inhabit our intestinal flora and their functionality and their roles in human health has been studied and shown to be promising in treating different diseases through modulation of intestinal microbiota (SCHMIDT, RAES, BORK, 2018).

1. Methodology

1.1. Microbial Culture Sources

The following strains were used: *Streptococcus thermophilus* TA040 (ST) (Danisco) and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* LB340 (LB) (e.g. yogurt microorganisms) (DuPont™ Danisco®), *Lactobacillus plantarum* CECT-221 (LP) and *Lactococcus lactis* CECT-4434 (LL) (e.g. probiotic microorganisms), both from the Spanish Collection of Cultures.

1.2. Inoculum Preparation

Each probiotic strain will be weighed on an analytical precision scale and rehydrated in 50 mL UHT (Ultra High Temperature) soymilk (Ades, Sao Paulo, Brazil) at 37°C for 15 minutes before use. Two peaks were performed every 24 h of pre-cultivation. The initial average microbial count of each inoculum will be approximately 10^6 to 10^8 CFU/mL. The soybean base (Soymilke, Rio Grande do Sul, Brazil) will be reconstituted to 12% total solids and heat treated using a Thermomix TM31 homogenizer (Vorwerk, Wuppertal, Germany). The soybean base will be cooled to 10°C and stored overnight awaiting the fermentation process. Subsequently, the probiotic strains (inoculum) were inoculated into 250 ml of soy-based preparation, to standardize the inoculum the growth curve was performed (*Lactococcus lactis*, figure 1), (*Lactobacillus plantarum*, figure 2).

1.3. Acidification profile

Each experimental fermentation will be performed in triplicate and the assay will be performed twice at different times. The process will be monitored using the Cinac system (Ysebaert, Frépillon, France) described by Spinnler & Corrieu (1989), which allows continuous measurement of the pH level in real time by computing the acidification rate during the fermentation period. Two kinetic parameters were considered: (a) V_{max} (maximum acidification rate in units of pH/min), and (b) $tpH4.5$ (time in hours to reach pH 4.5). Fermentation is interrupted by stopping in the Cinac System followed by stirring the clot with a perforated disc stainless steel rod; the stick will be shaken up and down for 2 min. It is then filled into 50 ml in heat-sealed jars and conditioned at 4°C.

1.4. Viable bacterial count

Samples of the dairy drinks (1 ml) were homogenized with 9 ml of 0.1% w / v peptone water for 1 min on a tube shaker and then serial dilutions were made using the same diluent and inoculations in media selective. The milk bacteria *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* were enumerated on M17 agar and MRS - pH 5.4, respectively, and incubated at 37°C for 72 hours. The media cited were prepared according to recommendations of Saccaro *et al.* (2011). *L. plantarum* will be listed on selective MRS agar medium added vancomycin after incubation at 30°C for 48h in incubator (BOD) and *L.lacts* on selective MRS 30°C agar medium for 48h in anaerobic jar according to methodology described by Dave and Shah (1996) and Saccaro *et al.* (2011). Anaerobic conditions were established using AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke). Plates containing 30 to 300 colonies were chosen to be enumerated and colony forming units per mL of product (CFU / mL) were calculated. The analyzes were performed in triplicate and at predetermined periods under refrigeration at 4°C, as follows: d1 (24 h after fermentation); d14 (fourteen days) and; d28 (twenty-eight days).

Post acidification

The pH values during the storage period of dairy drinks were determined in a digital potentiometer (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), properly calibrated with pH 7.0 and 4.0 buffer solutions (INSOLT ADOLFO LUTZ, 1985). The analyzes were performed in triplicate and at predetermined periods under refrigeration at 4°C, as follows: d1 (24 h after fermentation); d14 (fourteen days) and; d28 (twenty-eight days).

Fatty acid determination

The fatty acid dosage of the elaborated dairy drinks was conducted from the lipid fraction extraction of the samples according to the method described by International Organization for Standardization ISO 14156-IDF 172: 2001 (ISO, 2001), and adapted by Florence *et al.* (2009) followed by methylation of fatty acid esters prepared by transesterification according to method 15884-IDF 182: 2002 (ISO, 2002). Fatty acid esters were analyzed by gas chromatography according to the recommendations of Florence *et al.*, (2012, 2014). The qualitative composition of the

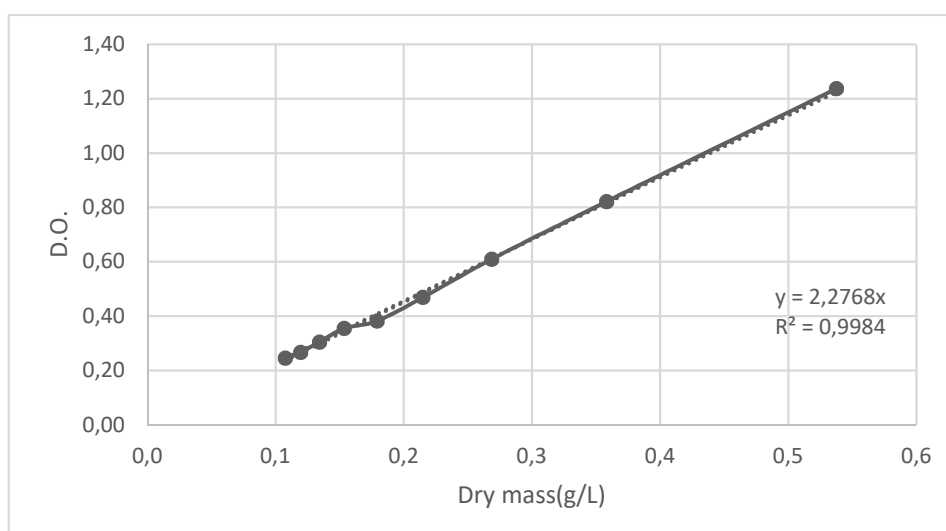
samples will be determined by comparing peak retention times with the respective fatty acid standards. The quantitative composition will be performed by area normalization, expressed as a percentage by mass, according to the official method Ce 1-62 (AOCS, 1997). Results were grouped and expressed as percentage of short chain fatty acids (C4:0 – C6:0), medium chain fatty acids (C8: 0 - C15: 0), long chain fatty acids (C16: 0 – C18:3), saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids. The analyzes were performed in triplicate and at predetermined periods under refrigeration at 4°C, as follows: d1 (24 h after fermentation); d14 (fourteen days) and; d28 (twenty-eight days).

2. Results and discussion

2.1. Pre-inoculum Study

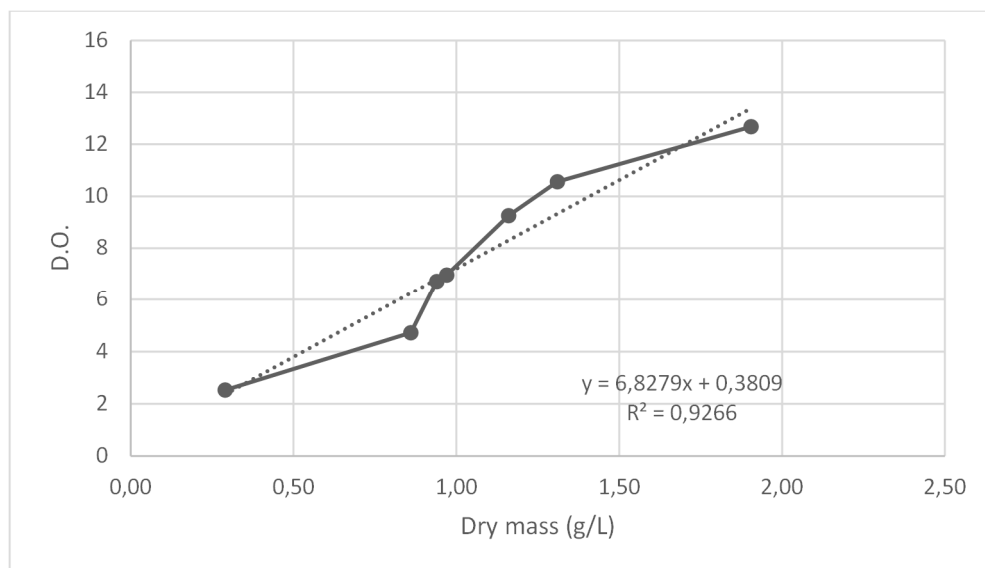
The study was performed to obtain the optimal cell growth and standardization of inoculants to be placed in soy milk in order to have the same UFC/ml cell concentration, and a concentration of 10^8 was established as the standard for the beginning of fermentation. For *Lactococcus lactis* CECT-4434 (LL) (Figure 1) and *Lactobacillus plantarum* CECT-221 (LP) (Figure 2) strains.

Figure 1: Pure cell culture growth LL (*Lactococcus Lacts*); At 30°C, 100rpm, values allowed by the media performed in triplicate, a linear regression, dry mass production with respect to optical dencidity was performed.



Source: author

Figure 2: Pure cell culture growth LP (*Lactobacillus plantarum*); At 30 °C, 100rpm, values allowed by the media performed in triplicate, a linear regression, dry mass production with respect to optical density was performed.



Source: author

2.2. Acidification Kinetics

The acidification kinetics of yogurt was characterized by V_{max} , t_{max} , pH_{Vmax} e $t_{pH 4,5}$ (SPINLER, H.E, & CORRIEU, G., 1989) (table 4). Fermentations were conducted until reaching the pH 4.5 which is the isoelectric point next to soy proteins (BOŽANIĆ, R., 2006; VISSESANGUAN, W. et al., 2005). Figure 1 shows the acidification curve obtained during the cultivation of the fermented soybean base. It was observed that the time to reach the pH 4,5, between monocultures *L. plantarum* (LP) was from 63% smaller than *L. lactis* (LL), but when we compare the same cultures we see that the LP the 37°C is 28% slower than when fermented at 42°C, Due to these results we chose to work only with the temperature of 42°C for fermentation. In the general observation of monocultures at different temperatures in relation to co-cultures there are significant differences showing shorter fermentation time, and thus more technologically viable, we can compare the variables that were more advantageous to the industrial use of these strains.

Figure 3: Acidification curve of 42°C of *S. thermophilus* (St), *L. bulgaricus* (Lb), *L. plantarum* (Lp) and *L.lactis* soybean microorganisms at 37°C and 42°C until pH 4.5. Legend: LL (), LP (), LL-LB-ST (), LP-LB-ST (), LP-LL-LB-ST () .

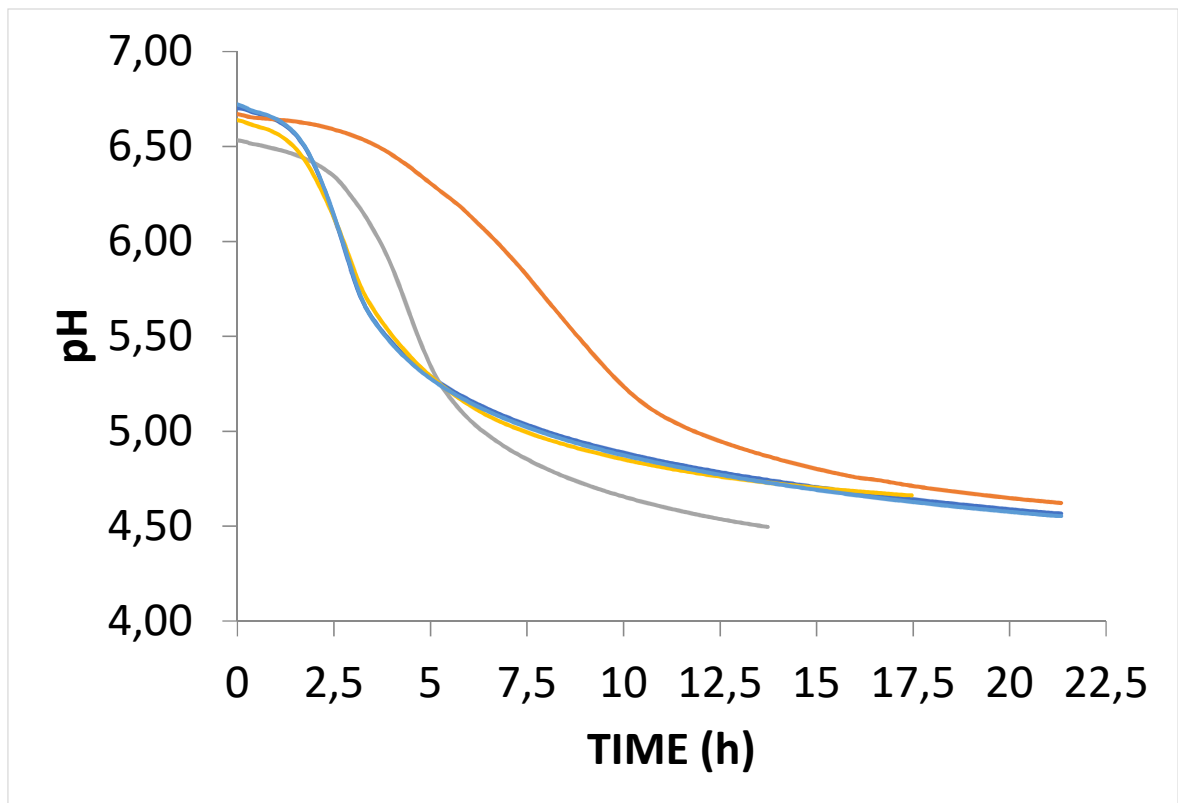


Table 1: Kinetic parameters of microorganisms *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb), *Lactococcus lactis* (LL) and *Lactobacillus plantarum* (Lp) in soybean base at 42°C until pH 4.5.

Base	TpH _{5,5} (h)	TpH _{5,0} (h)	TpH _{4,5} (h)	V _{max} (*upH.min ⁻¹)	T _{vmax} (h)	pH _{vmax}
LP	8,7±0,15 ^b	11,8±0,07 ^a	23,00±0,16 ^b	4,13±0,05 ^a	7,90±0,54 ^b	5,70±0,42 ^a
LL	4,0±0,11 ^a	7,40±0,14 ^b	17,47±0,22 ^a	9,31±0,10 ^b	3,00±0,36 ^a	5,90±0,36 ^a
LP LB ST	13,1±0,10 ^c	16,9±0,05 ^c	21,1±0,18 ^b	4,69±0,02 ^a	13,5±0,41 ^c	5,40±0,33 ^a
LL LB ST	4,20±0,06 ^a	5,60±0,32 ^b	10,12±0,24 ^a	11,40±0,20 ^c	4,30±0,15 ^a	5,70±0,18 ^a
LL LP LB ST	7,90±0,12 ^b	10,00±0,21 ^a	12,28±0,17 ^c	9,37±0,08 ^b	3,40±0,11 ^a	5,6±0,22 ^a

Legend: Kinetic parameters of *Streptococcus thermophilus* (St), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb), *Lactobacillus plantarum* (Lp) and *Lactococcus lactis* (LL) microorganisms in soybean base at 42°C to pH 4.5. A, b, c Different letters in the same column denote significant difference ($P \leq 0.05$) between treatments. V_{max} = maximum acidification rate; T_{vmax} = time required to reach V_{max}; PHV_{max} = pH at V_{max}; TpH5.0 = time Required to reach pH 5.0; TpH4.5 = time required to reach pH 4.5 (end of fermentation).

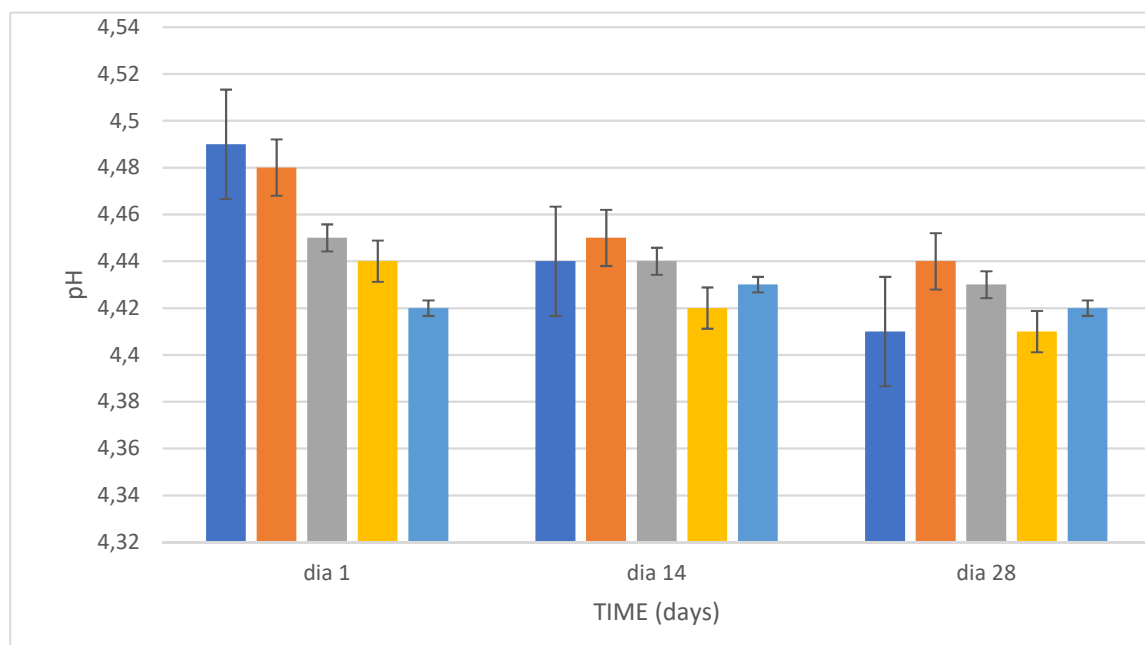
From the data collected during fermentation, the acidification rate (V_{max}) was calculated as the time variation of the pH (dpH/dt) and expressed as 10⁻³ units of pH/min. During the incubation period, the following kinetic parameters were also calculated: (i) T_{vmax} (h), time in which V_{max} was hit; tpH5.0 (h), the time required to reach the pH 5.0; E (iii) tpH 4.5 (h), the time required to reach pH 4.5 (that is, to complete the fermentation) (OLIVEIRA, *et al.*, 2012; OLIVEIRA., 2002).

2.3. Post Acidification

in this study, Božanić *et al.* (2011) performed the fermentation of soybean milk at two temperatures (37°C and 42°C) with the following strains *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus thermophilus* and also using culture of yogurt with the addition of *Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis* only crops at 42 °C were shown in this article, because it presented shorter time in the fermentation kinetics to reach pH 4.5 when measuring the post acidification rate (figure 4), the acidification of the medium in the different days (d1, d14 and d28) was not statistically significant, with no statistical differences. Tamime and Robinson,

1985 reported that *Streptococcus thermophilus* initiates milk fermentation and that Lactobacilli contribute to acidification. Later in incubation, *S. thermophilus* is able to grow in soy drinks because of its ability to use sucrose and other oligosaccharides present in soy milk (CHUMCHUERE and ROBINSON, 1999). Similar behavior can be explained for *L. acidophilus*- *L. plantarum*.

Figure 4: post-acidification profile of LP (*Lactobacillus plantarum*) and LL (*Lactococcus lactis*) pure cultures; ternary cultures LL LB ST (*Lactococcus lactis*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*) and LP LB ST (*Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*) and every all cultures mixed. Day 1, Day 14 and Day 28 representing shelf life at 4°C temperature. values resulting from the average realized triplicate. Legend: LP (■), LL (■), LL-LB-ST (■), LP-LB-ST (■), LL-LP-LB-ST (■).

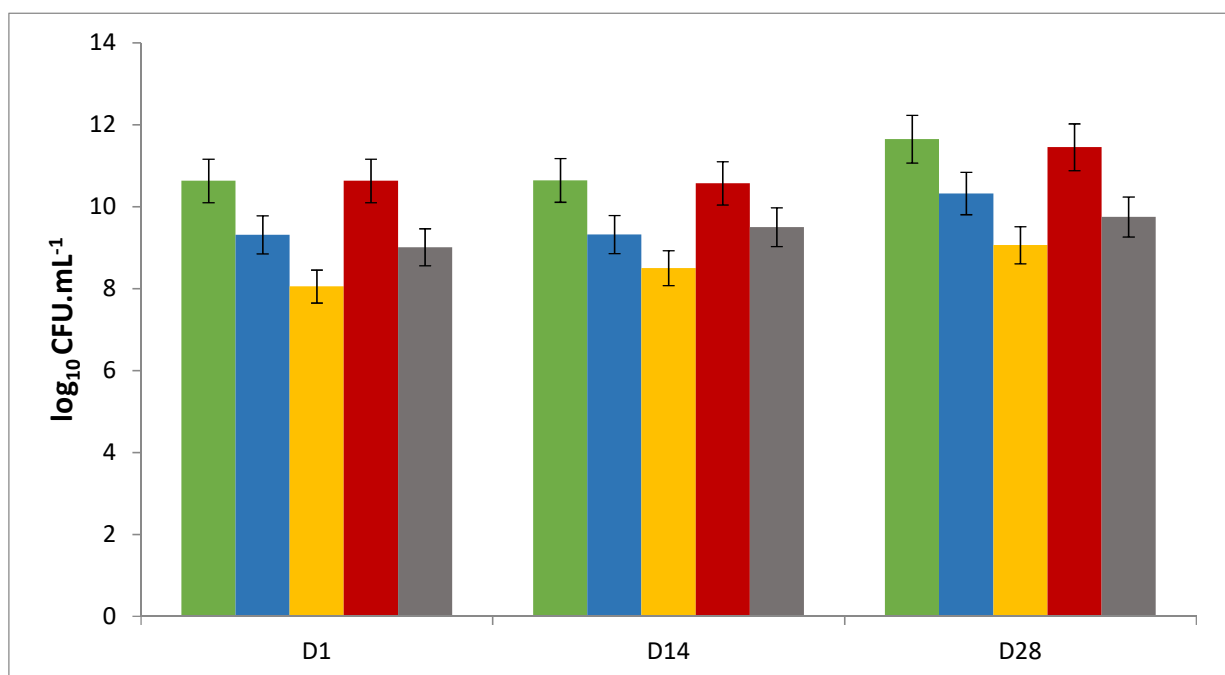


Source: author

Microbiological Count

As shown in Figure 5, which refers to microbiological counts at predetermined times D1, D14, D28 stored at 4°C showed to be viable at the fermentation temperature of 42°C in the different monoculture (LP; LL) and ternary (LL LB ST and LP LB ST) and quaternary (LP LL LB ST), growth was observed in all different combinations of microorganisms on average from 1.5 to 2.2 log in reference from day 28 to D1 representing at the moment when cells are placed to ferment, with the exception of (ST) in co-cultures that even showing plaque growth during storage time did not significantly increase their log to be close to 1.2 log longer than day. 0 (D0) and the same is observed for day 1, 24 hours after the stop of fermentation, shown in the following figure.

Figure 5: Microbiological Count of *L.lactis* (LL), *L. plantarum* (Lp), *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (Lb), *Streptococcus thermophilus* (St) in soybean extract fermented after 1 day (d1), 14 days (d14) and 28 days (d28) storage at 4°C. Legend: LP-LB-ST (■), LL-LB-ST (■), LL-LP-LB-ST (■), LP (■), LL (■).



Through statistical analysis, it was observed that there was significant difference between strains grown at 42°C and 37°C in both experiments between monocultures and co-cultures, *L. plantarum* monoculture at 37°C compared to co-culture at 37°C *L.plantarum*, difference of 1.01 log CFU/mL more than co-culture

respectively in relation to quaternary culture at 37°C, the culture was 0.01 log CFU/ml with no significant difference $P > 0.05$ but in relation to ternary culture it was 1.0 log CFU / ml less than the quaternary $p < 0.05$, the temperature of 42°C for the microbial culture was determined.

Factors affecting probiotic viability in the product include: the total solids content of milk (beef or soy) (VINDEROLA *et al.*, 2002; DONKOR *et al.*, 2006), the type of matrix preservatives and contaminating microorganisms, nutrient availability in milk, sugar and inoculum concentration, interactions between microorganisms present, incubation and storage temperatures, post-acidification peroxide due to microbial metabolism during storage, oxygen concentration in the product, and oxygen permeability by packaging (OLSON and ARYANA, 2008; SAINT-EVE *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009; SACCARO *et al.*, 2009).

2.4. Fatty Acid Analysis

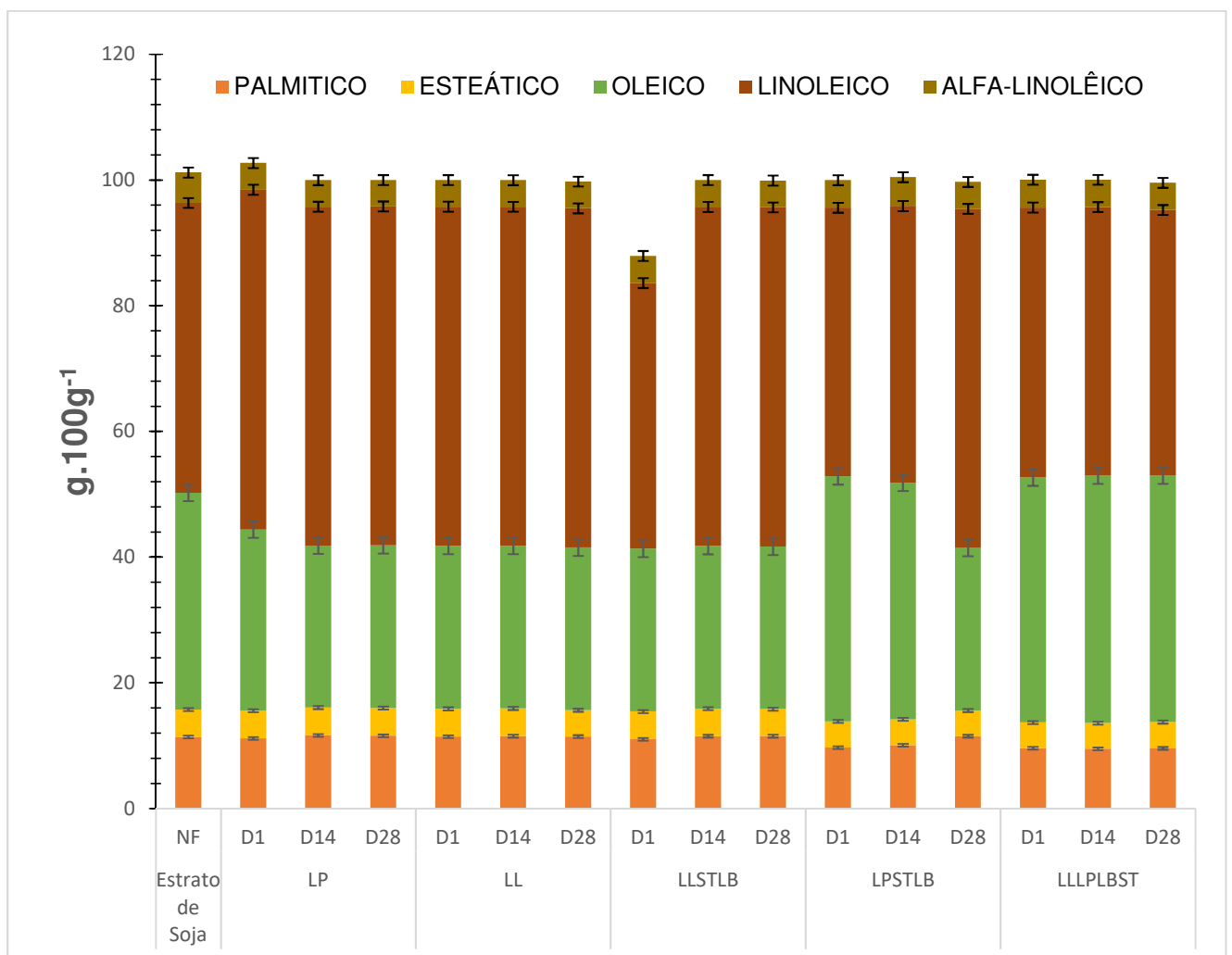
Soybeans are also of great importance as a source of edible vegetable oil; It has a high content of essential fatty acids such as linoleic and linolenic, and of the total fatty acids, it has 15% saturated and 85% unsaturated (61% polyunsaturated and 24% monounsaturated) oil.

Among the fatty acids analyzed, palmitic acid (C 16:0) was the only one that did not show significant differences between samples, even after fermentation and cooling, maintaining its stability during the storage period. The palmitic acid values obtained in the unfermented soybean extract ($10.2 \text{ g } 100^{-1}$) were similar to those observed by Peñalvo *et al.*, (2004) $10.7 \text{ g } 100^{-1}$.

In the quantification of stearic acid (C 18:0) in cultures and co-cultures fermented at 42°C, there was greater stability in the contents of this fatty acid during the storage period studied (28 days), since they remained in $4.4 \text{ g } 100^{-1}$, which was also observed by Antoniassi *et al.*, (2011).

Conversely to what was observed in stearic acid, oleic acid (C 18:1) showed lower stability at both fermentation temperatures in different strains combinations, being in an average amount 25.2% lower than when compared to the unfermented soy extract. In samples that underwent single cooling oleic acid was in average 32.7% higher in d28 when compared to samples that underwent intermediate cooling in the same period and being 10.3% higher than unfermented soybean extract.

Figure 6: Fatty acid profile (g 100 g⁻¹ of total fatty acids) in soybean extract fermented by *L.lactis* (LL), *L.plantarum* (Lp), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (Lb), *Streptococcus thermophilus* (St) (42°C) on 1 day (d1), 14 days (d14) and 28 days (d28) storage at 4°C.



Source: author

3. Discussion

The pH_Vmax value represents the concentration of H⁺ ions at the time V_{max} is reached, as well as the time when the maximum production of organic acids by fermented cultures. There was no significant difference ($P \leq 0.05$) in pH_Vmax values for all cultures and combinations evaluated in this study.

The time required to reach the final pH (pH 4.5) ranged from 11.33 to 23.40 h and was significantly ($P \leq 0.05$) different between pure cultures and probiotic cocultures. The shortest fermentation time was obtained by (ternary) co-cultures of *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, and among the pure culture, *L. lactis* was also the fastest to reach the end of fermentation (pH 4.5), being the ternary culture 29% more efficient than the pure culture (37°C) respectively, it has the lowest V_{max} value of 9.31×10^{-3} pH / Min units in relation to the V_{max} of 11.97×10^{-3} units of pH/min. *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* co-culture, and the stripe with the highest V_{max} value was the most efficient in acidifying the medium, but fermentations performed at 37°C took longer to reach pH 4.5 (data not shown), the temperature of 42°C was chosen as the standard temperature. It was observed at 42°C the least efficient *L. plantarum* with 23.00 (h) ($V_{\max} 4.13 \times 10^{-3}$ pH/Min units) to reach pH 4.5 and the most efficient 12.28 (h) ($V_{\max} 9.37 \times 10^{-3}$ pH/min units) to reach pH 4.5 composed of stripes *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, increased the acidification rate by 36% more than efficiency significantly ($P < 0.5$). The positive effect of *S. thermophilus* on acidification kinetics has been previously reported in other studies using probiotic strains (OLIVEIRA, 2002; RAMCHANDRAN, SHAH, 2010; MOHAMMADI, MORTAZAVIAN, 2011).

4. Conclusion

By correlating the data obtained from CINAC and the microbiological count, it is promising to use the different temperatures for fermentation, maintaining cell viability from Day 1 to Day 28 above 10⁶, a value necessary to characterize a probiotic product and it may reach the intestine, to promote its benefits.

5. Acknowledgement

CAPES (PDSE: 88881.190528/2018-01) and CNPq (142196/2015-0), for financial support and fellowships, and Eigenmann & Veronelli Spa company for providing part of the material resources employed in this study.

6. REFERENCES

ALMEIDA, K. E.; TAMIME, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 672-678, 2009.

BEDANI, R., VIEIRA, A.D.S., ROSSI E.A., SAAD S.M. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-443, 2014.

BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; SILVA, M. A. A. P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Alimentaria**, v. 33, p.101-109, 2004.

BERMÚDEZ-HUMÁRAN, L. G., CAMILLE, A., MOTTA, J.P., DERAISON, C., STEIDLER, L., VERGNOLLE, N., CHATEL, J.M., LANGELLA, P. Engineering *lactococci* and *lactobacilli* for human health, **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 278–283, 2013.

BOŽANIĆ, R. Proizvodnja, svojstva i fermentacija sojinog mlijeka. **Mljekarstvo**, v. 56, p. 233–254, 2006.

CHAUDHARY J, PATIL GB, SONAH H, DESHMUKH RK, VUONG TD, VALLIYODAN B, NGUYEN HT. Expanding omics resources for improvement of soybean seed composition traits. **Frontiers in plant Science**, v. 6, p. 1021, 2015.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1181-1189, 2006.

Embrapa soja, 2016. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentação/index.php?pagina24>. Acesso em: 22 jul. 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 1985. 533p.

JONKERS, D., STOCKBRUGGER, R. (2007). Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 133-148, 2007.

KIESLER, P., FUSS, I.J., STROBER, W. (2015). Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. **CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, p. 154-170.

MACHADO, M. R. G. **Bebida de soja fermentada com *Lactobacillus acidophilus*: viabilidade celular, avaliação sensorial, armazenamento e resposta funcional**. Dissertação (Doutorado) – Faculdade Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, 2007. 117p.

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

OLIVEIRA, M.N. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo Probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n.1, 2002.

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

OLSON, D. W.; ARYANA, K. J. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 911-918, 2008.

PEREIRA, L. C. **Influência da associação de culturas probióticas sobre as características do queijo petit-suisse**. Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo. 2007, 94 p.

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

REIFF, C., KELLY, D. (2010). Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 25-33.

SABO, S.S., VITOLO, M., DOMÍNGUEZ, J.M., OLIVEIRA, R.P.S. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SACCARO, D. M.; TAMIME, A. Y.; PILLEGGI, A. N. A. L. O. P. S.; OLIVEIRA, M. N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 397-404, 2009.

SACCARO, D.M.; HIROTA, C.Y.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5 n. 23, p. 3901-3906, 2011.

SAINT-EVE, A.; LEVY, C.; LEMOIGNE, M.; DUCRUET, V.; SOUCHON, I. Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 285-293, 2008.

SCHMIDT, T.S.B., RAES, J., BORK, P. The Human Gut Microbiome: **From Association to Modulation Cell**, v. 172, n. 6, 2018.

SMIDERLE, O. J. **Soja verde para alimentação humana - alternativa para agricultura familiar**. Roraima, 2006. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br>>. Acesso em: 22 jul. 2018.

SPINNLER, H.E., & CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. **Journal. Dairy Res**, v. 56, p. 755-564, 1989.

STURMER, E.S., CASASOLA, S, COMORETTO, M.G. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v. 27, p. 264-272, 2012.

TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications: a review. **Euro Jounal Clinical Nutrition**, v. 56, p. 2-15, 2002.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: Production, genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 209–221, 2009.

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 7, p. 579-589, 2002.

VISSESANGUAN, W., BENJAKUL, S., POTACHAREON, W., PANYA, A., RIEBROY, S. Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of Thua-Nao inoculated with *Bacillus subtilis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, 349–366, 2005.

CAPÍTULO III – “THERMODYNAMIC INVESTIGATION ON BACTERIOCIN THERMOSTABILITY: THE CASE OF NISIN”

Thermodynamic investigation on bacteriocin thermostability: the case of nisin

Gabriel Moretti de Almeida, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, Attilio Converti

Summary

Understanding the thermal inactivation of biopreservatives in food matrixes is essential for their proper use in the food industry, enabling reduction of heating times and optimization of heating temperatures. With this aim in mind, the effect of heat treatment on the activity and thermostability of commercial nisin from *Lactococcus lactis* was investigated. Residual activity tests performed over 90 min in the 70-86°C temperature range demonstrated that bacteriocin thermoinactivation followed first order kinetics. Low values of the inactivation rate constant ($0.0124-0.0892 \text{ min}^{-1}$) and high values of the decimal reduction time ($25.8 \leq D\text{-value} \leq 258.4 \text{ min}$) indicated excellent nisin thermostability in the lower end of the investigated temperature range, but the thermal resistance constant ($z\text{-value}$) was only $15.4 \text{ }^\circ\text{C}$, which pointed out poor thermoresistance at the higher one. The thermodynamic parameters estimated for nisin irreversible thermal inactivation were energy, enthalpy and Gibbs free energy of activation of 155.1, 152.1-152.3 and 86.2-90.4 kJ/mol, respectively, and an activation entropy of $177.9-186.2 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. These results taken together confirm the thermostability of nisin as a biopreservative in use in the food industry, but also suggest the search for new more thermostable antimicrobials for use in operations at higher temperatures.

1. Introduction

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria (LAB) isolated from different environments (Balciunas et al., 2013). They are ribosomally synthesized as extracellular peptides or proteins with antimicrobial activity against closely related species (Ye et al., 2013). Some bacteriocins may inhibit the growth of a wide range of microorganisms, including some food spoilage bacteria and foodborne pathogens such as those belonging to the *Salmonella* and *Listeria* genera (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2013). Due to the outbreak of serious foodborne illnesses and consumer demand for the reduction of chemical additives, bacteriocins have attracted increasing interest as safe and natural antimicrobial agents for food preservation (Riley & Wertz, 2002; O'Sullivan et al., 2002; Deegan et al., 2006). Several bacteriocins produced by LAB have been effectively employed and characterized and tested in food systems to combat pathogenic and spoilage microorganisms, thereby increasing their shelf-life.

Nisin is by far the best characterized and studied bacteriocin, and its use in food is allowed in more than 40 countries (Cleveland et al., 2001). It is a bacteriocin produced by some strains of *Lactococcus lactis*, whose name is derived from the expression "N-inhibitory substance" (NIS) added to the traditional suffix "in" (Davies et al., 1998; Cleveland et al., 2001). This bacteriocin was first described by Rogers (1928) as being capable of inhibiting the growth of *Lactobacillus bulgaricus*. Nisin belongs to bacteriocin class I of lantibiotics, which are small peptides containing approximately 19 to 38 amino acid residues. Its thermostability is the result of the special abundance of unusual thermostable compounds such as lanthionine and β -methyl-lanthionine deriving from the combination of two amino acids linked through a disulfide bond (Jarvis et al., 1968). Nisin variants are nisin A and nisin Z, which differ structurally by only one amino acid but have similar activities (Mulders et al., 1991). Due to the acidic nature of its molecule, nisin is completely stable at pH 2.0 and can be stored for a long time at temperatures between 2 and 7 °C, while inactivation occurs at a pH above 7.0 even at room temperature (Delves-Broughton, 1990).

According to Haug (1993) and Stumbo (1973), the kinetics of thermal destruction of many microorganisms, especially bacteria, can be modeled by assuming a first order decay. Similarly, knowledge about the kinetics and thermodynamics of bacteriocin thermal inactivation is important to enable its proper

use as biopreservatives in high temperature operations of the food processing industry. However, this type of study in food matrices is scarce; to date there are only three reports in the literature, as far as we are aware, on these aspects concerning antimicrobial peptides (Lappe et al., 2009; Sant'Anna et al., 2012). Based on this background, the aim of this work was to get a better knowledge of nisin thermoresistance in order to improve its employment on an industrial scale or to expand its applicability to operations at higher temperatures.

2. Theory

Thermal inactivation of nisin is described in this work following the same general approach used for that of enzymes or the destruction of microorganisms, i.e., assuming first-order reaction kinetics:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt \quad (1)$$

Where C_t is the bacteriocin concentration or activity expressed in arbitrary units (AU) after a treatment time t , C_0 its initial concentration or activity, and k the inactivation rate constant at the temperature under investigation, which can be estimated by linear regression from the plot of the natural logarithm of residual activity versus time.

This parameter is related at any temperatures to the bacteriocin half-life ($t_{1/2}$) according to the equation:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

In food processing, it is common to characterize first-order reactions in terms of decimal reduction time (D -value) and thermal resistance constant (z -value), which are thermal death time concepts. The former, which is the time needed for a 10-fold reduction of the initial activity at a given temperature, is related to k by the equation (Espachs-Barroso et al., 2006):

$$D = \frac{\ln 10}{k} \quad (3)$$

On the other hand, the latter, which is the temperature needed to reduce the D -value by one log-unit, is estimated by plotting the D -values on a log scale against the corresponding temperatures (Stumbo, 1973). Differences between the D - and z -values of microorganisms and nutrients are exploited to optimize thermal processes, in that the z -values for cooking and nutrient degradation (25–45°C) are generally greater than for microbial inactivation (7–12°C) (AWUAH et al., 2007).

The Arrhenius equation, which is the most common mathematical expression to describe the temperature effect on the inactivation rate constant, can be written in its linearized form as:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4)$$

Where A is the Arrhenius constant, E_a the activation energy, R the universal gas constant and T is the absolute temperature. The activation energy can be estimated by linear regression from the semi-log plot of rate constant versus the reciprocal of the absolute temperature.

Activation enthalpy (ΔH^*), activation free energy (ΔG^*) and activation entropy (ΔS^*) of bacteriocin inactivation can then be estimated according to the expressions:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (5)$$

$$\Delta G^* = -RT \ln \left(\frac{k \cdot h}{k_B T} \right) \quad (6)$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta G^*}{T} \quad (7)$$

Where h and k_B are the Planck's and the Boltzmann's constants, respectively and T the average temperature (350.16 K in this work).

3. Materials and methods

3.1. Reagents and media

Brain heart infusion (BHI) was acquired from Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA). Nisin from *Lactococcus lactis*, with specific activity of 1017 IU/mg, was acquired from Hangzhou Hyper Chemicals (Zhejiang, China). Agar and other reagents were acquired from Merck (Darmstadt, Germany).

3.2. Bacterial cultures

The indicator strain used in nisin activity assays was *Listeria innocua* NCTC 11288 stored in 20% (v/v) glycerol at 20 °C. Cells were cultivated anaerobically (anaerobic jar) in BHI at pH 7.4 and 37 °C for 16 h without agitation and then diluted with sterile deionized water up to OD_{600nm} 0.6, corresponding to 3×10⁸ CFU/mL.

3.3. Nisin activity

The antimicrobial activity of nisin was detected by the agar disc diffusion assay (Motta & Brandelli, 2002). Aliquots (20 µl) of 1.0 mg/ml bacteriocin solution in 25 mM phosphate buffered saline were applied on agar plates previously inoculated with a swab submerged in the indicator strain suspension (*L. innocua* NCTC 11288) adjusted to 0.6 McFarland turbidity standard (10⁸ CFU/ml). Plates were incubated at 37°C. Bacteriocin titre was determined by the serial two-fold dilution method. The reciprocal value of the highest dilution where an inhibition zone was observed was taken as nisin activity expressed in arbitrary units per ml (AU/ml). To convert the inhibition halo diameter of the clearance zone (d_H , mm) to activity expressed in arbitrary units, the equation proposed by Sidek et al. (2017) was used:

$$A = \frac{\pi d_H^2 D}{4 V} \quad (8)$$

Where D the eventual dilution factor and V the sample volume (mL).

3.4. Thermal inactivation

Thermal inactivation of nisin was determined by incubating the bacteriocin at 70, 75, 77, 82 and 86°C. Aliquots (1.0 ml) of bacteriocin solution were exposed at the selected temperature in sealed tubes, which were incubated in a thermostatically controlled water bath, model TC120 (B. Braun Biotech, Melsungen, Germany). Tubes were withdrawn at different time intervals, and bacteriocin activity was determined as describe earlier. To disregard the effects of heating-up, the activity after 1 min of heating-up time was considered to be the initial activity ($t = 0$). Assays were done in duplicate.

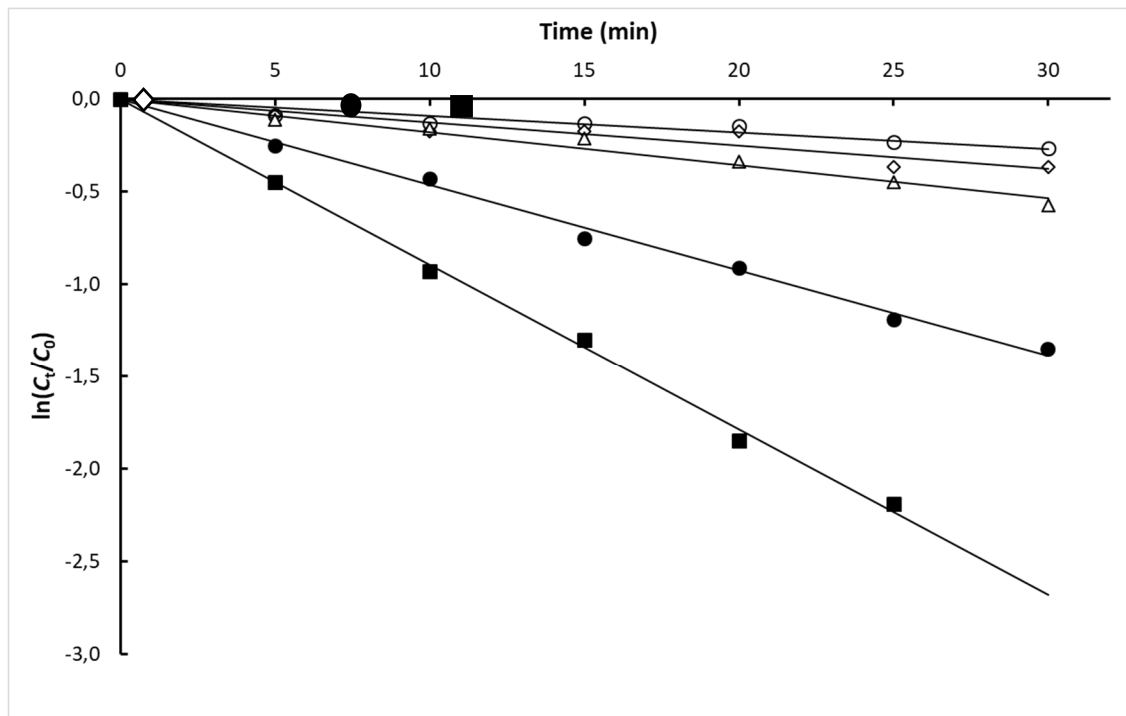
3.5. Statistical analysis

Results worked out by the Microsoft Excel 2016 program (MapInfo Corporation, Troy, NY, USA) were expressed as means of duplicate values and related standard deviations.

4. Results and discussion

Thermal inactivation of *Lactococcus lactis* nisin was investigated for a time of 30 min in the temperature (T) range from 70 to 86 °C. Figure 1 shows that the bacteriocin residual activity decreased as the exposition time at a given temperature increased, and that the higher the temperature, the more pronounced such a decrease. The symbols in this figure refer to the mean experimental values from duplicate runs, while the straight lines correspond to the linear fitting of experimental data by Eq. (1). It can be seen that in all runs bacteriocin inactivation followed a first order kinetics.

Figure 1: Profile of nisin thermal inactivation over time at different temperatures (°C): 70 (O), 75 (◇), 77 (Δ), 82 (●), 86 (■).



Source: author

The values of the first-order specific rate of nisin thermal inactivation (k) estimated at each temperature as the slope of the corresponding semi-log plot of residual activity *versus* time are listed in Table 1 together with those of the determination coefficient (r^2), the half-life ($t_{1/2}$) and the D -value. All thermostability indexes were better than those reported by Lappe et al. (2009) for the antimicrobial peptide cerein 8A, that showed $k = 0.059 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 11.7 \text{ min}$ and D -value = 39.04 min at 70°C, and $k = 0.235 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 2.94 \text{ min}$ and D -value = 9.78 min at 82°C. Nonetheless, for $70 \leq T \leq 77 \text{ °C}$ the values of k were lower and those of $t_{1/2}$ and D -value higher than those reported for *Lactobacillus platarum* ATM11 bacteriocin ($k = 0.017 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 39.9 \text{ min}$ and D -value = 132.5 min at 70 °C), while the opposite took place for $T > 77 \text{ °C}$ ($k = 0.022 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 31.0 \text{ min}$ and D -value = 102.9 min at 80°C) (Thirumurugan et al., 2016). These results give a first indication of the thermoresistance potential of bacteriocins others than nisin at the highest

temperatures of the investigated range, which could be usefully exploited in high temperature operations of food industry.

Table 1: Kinetic results of nisin thermoinactivation at different temperatures (T).

T (° C)	k (min ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (min)	D -value (min)	z -value (° C)
70	0.0089	0.9089	77.9	258.4	15.4
75	0.0124	0.8926	55.9	185.5	
77	0.0178	0.9754	38.9	129.2	
82	0.0463	0.9950	15.0	50.0	
86	0.0893	0.9974	7.8	25.8	

Source: author

As can be seen in the same table, the estimated value of z was 32.6 and 29.9% lower than those obtained by Thirumurugan et al. (2016) for cerein 8A (22.85 °C) and Lappe et al. (2009) for *L. platarum* ATM11 bacteriocin (21.98 °C), indicating that nisin was less stable than these bacteriocins in the higher part of the temperature range ($T > 77$ °C), although more stable at the lower ($T \leq 77$ °C). It can be inferred from these results that nisin can be successfully used in processes such as High-Temperature, Short-Time (HTST) pasteurization, usually performed at 72 °C for a short time (15 s), but also that alternative more thermostable bacteriocins could be more suitable in higher temperature processes such as the Ultra-High Temperature (UHT) one (138 °C) (Ngadi et al., 2012).

Table 2: Thermodynamic parameters estimated for nisin thermoinactivation.

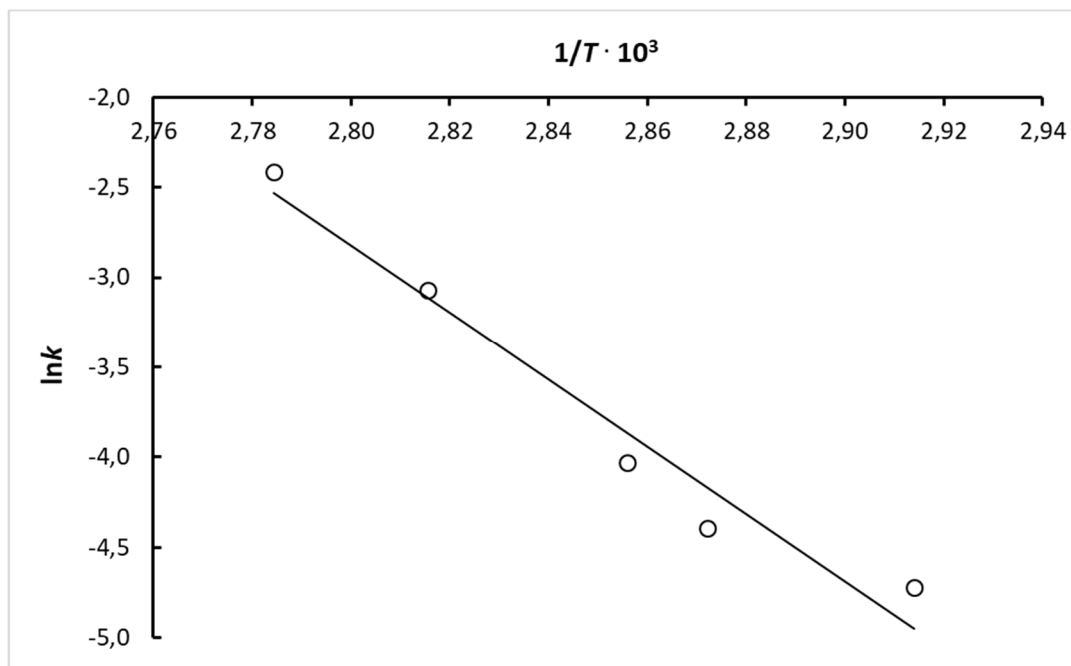
E_a (kJ/mol)	T (°C)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol.K)
155.1	70	152.3	86.2	186.2
	75	152.2	87.5	183.5
	77	152.2	89.0	182.5
	82	152.2	89.3	179.9
	86	152.1	90.4	177.9

E_a = activation energy; ΔH^* = activation enthalpy; ΔG^* = activation Gibbs free energy; ΔS^* = activation entropy.

Source: author

Table 2 summarizes the values of thermodynamic parameters of nisin thermal inactivation, namely activation energy (E_a), estimated from the slope of the straight line shown in Figure 2, activation enthalpy (ΔH^*), activation Gibbs free energy (ΔG^*) and activation entropy (ΔS^*).

In the case of thermal inactivation of a protein and/or a peptide as a bacteriocin, the activation energy can be seen as the energy that needs to be provided to overcome the energy that holds together the secondary, tertiary and/or quaternary structure of molecules. The estimated E_a value for nisin thermal inactivation (155.1 kJ/mol) was much higher than those estimated for other bacteriocins such as the *L. plantarum* ATM11 bacteriocin (78 kJ/mol) (Thirumurugan et al., 2016), the bacteriocin-like inhibitory substance P34 from *Bacillus* sp. P34 (72 kJ/mol) (Sant'Anna et al., 2010) and the antimicrobial peptide cerein 8A from *Bacillus cereus* 8A (105.7 kJ/mol) (Lappe et al., 2009), which indicates stronger temperature dependence, and that inactivation will run very slowly at low temperatures (Boekel, 2008).

Figure 2: Arrhenius de taxas de inativação de nisina $y = -18659x + 49,423$ $R = 0,9612$.

Source: author

On the other hand, ΔH^* can be seen as the total amount of thermal energy required to unfold a biomolecule without breaking covalent bonds (Xiong, et al. 2005), hence being depending on the number of non-covalent bonds broken during the inactivation (Marangoni, 2003; Silva et al., 2018). The values of ΔH^* estimated for nisin (152.1-152.3 kJ/mol) were much larger than those estimated for bacteriocin produced by *L. plantarum* ATM11 bacteriocin (15.7-15.9 kJ/mol) (Thirumurugan et al., 2016) and cerin 8A from *B. cereus* 8A (102.8 kJ) (Lappe et al., 2009), confirming its high thermostability. Moreover, its positive values are consistent with the fact that thermal inactivation is an endothermic process. Since absorbed thermal energy increases structural fluctuation in protein structure, it is responsible for weakening or even disruption of non-covalent bonds holding it together; therefore, higher E_a and ΔH^* values like those estimated in this study point out stronger intramolecular stabilizing forces and less extended conformation (Lima et al., 2011). Pace (1992) reported an energy of approximately 5.4 kJ/mol to remove a $-\text{CH}_2$ moiety from a hydrophobic bond, from which we can estimate that no less than 28.2 noncovalent bonds were broken to form the transition state preceding nisin unfolding. Even though this number was never estimated before for a bacteriocin or BLIS, it can be compared

with those reported for enzymes. For instance, it was is lower than that estimated for *Aspergillus tamarii* URM4634 β -fructofuranosidase (53.8) (Oliveira et al., 2019) but significantly higher than those of a protease from *Aspergillus tamarii* (4.8) (Aguiar-Oliveira and Maugeri, 2011) and a pectinase from *Aspergillus aculeatus* (15.3) (Lima et al., 2011).

Protein unfolding resulting from thermal inactivation is mostly accompanied by positive values of ΔS^* (Saleem et al., 2005; Oliveira et al., 2018) like those estimated in this study (177.9-186.2 J mol⁻¹ K⁻¹), which highlights an increase in the degree of randomness, spontaneity of the process and then heat release. An opposite situation has been reported for *L. plantarum* ATM11 bacteriocin (Thirumurugan et al., 2016) and cerin 8A from *B. cereus* 8A (Lappe et al., 2009), whose inactivation implied negative ΔS^* , i.e., -0.27 and -5.39 and J/mol.K, respectively.

Indeed, the most important thermodynamic parameter to make comparisons among different biological system is ΔG^* because it incorporates both the above enthalpic and entropic contributions. As stressed by Maragoni (2003), positive values of such a parameter denote increased resistance to denaturation. Therefore, the lower values obtained for nisin in the present study (86.2-90.4 kJ mol⁻¹) compared with those reported for *L. plantarum* ATM11 bacteriocin (104.7-110.1 kJ/mol) (Thirumurugan et al., 2016) and cerein 8A (104.7 kJ/mol) (Lappe et al., 2009) suggest lower nisin thermostability.

5. Conclusion.

Thermal inactivation of nisin has been shown to follow first order kinetics. The relatively low values estimated for z-value (15.4 °C) and activation Gibbs free energy of thermal inactivation (90.4 kJ/mol) suggest the importance of looking for new, more stable bacteriocins to be used as microbial agents in food industry applications at temperatures higher than 82 °C.

6. Acknowledgement

CAPES (PDSE: 88881.190528/2018-01) and CNPq (142196/2015-0), for financial support and fellowships, and Eigenmann & Veronelli Spa company for providing part of the material resources employed in this study.

7. References

AGUIAR-OLIVEIRA, Elisa; MAUGERI, Francisco. Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. Brazilian **Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000300002>>.

AWUAH, Gabriel Baffour; RAMASWAMY, Hosahalli; ECONOMIDES, Athanasia. Thermal processing and quality: principles and overview. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 6, p. 584–602, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.08.004>>.

BALCIUNAS, Eduardo Marcos; CASTILLO MARTÍNEZ, Fabio Andrés; TODOROV, Svetoslav Dimitrov; FRANCO, Dora Gombossy de Mello; CONVERTI, Attilio.; OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>>.

CLEVELAND, Jennifer; MONTVILLE, Thomas J.; NES, Ingolf F.; CHIKINDAS, Michael L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)>.

DAVIES, EA; BEVIS, HE; POTTER, R; HARRIS, J; WILLIAMS, GC; DELVES-BROUGHTON, J. Research note: the effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. **Letters Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 186-187, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.t01-1-00401.x>>.

DEEGAN, Lucy; H, COTTER, Paul. D; HILL, Colin, ROSS, Paul. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058-1071, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>>.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. **International Journal of Dairy Technology**, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1990.tb02449.x>>.

ESPACHS-BARROSO, Alexandre; VAN LOEY, Ann; HENDRICKX, Marc; MARTÍN-BELLOSO, Olga. Inactivation of plant pectin methylesterase by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 7, n. 1, p. 40-48, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.07.002>>.

HAUG, Roger Tim. **The Practical Handbook of Compost Engineering**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1993.

JARVIS, B; JEFFCOAT, J; CHEESEMAN, GC. Molecular weight distribution of nisin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 168, n. 1, p. 153-155, 1968.

KARPINSKI T.; SZKARADKIEWICZ, A. Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish Journal of Microbiology*, v. 62, n. 3, p. 223-235, 2013.

LAPPE, Rosiele; CLADERA-OLIVERA, Florencia; DOMINGUEZ, Ana Paula Melo; BRANDELLI, Adriano. Kinetics and thermodynamics of thermal inactivation of the antimicrobial peptide cerein 8. *Journal of Food Engineering*, v. 91, n. 2, p. 223–227, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.08.025>>.

LIMA, Carolina; CA, LIMA FILHO, José L.; NETO, Benício B.; CONVERTI, Attilio; CARNEIRO DA CUNHA, Maria G.; PORTO, Ana L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 16, n. 3, p. 549-560, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12257-010-0247-0>>.

MARANGONI, Alejandro G. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003. <https://doi.org/10.1002/0471267295>.

MULDERS, John; BOERRIGTER, Ingrid; ROLLEMA, Harry; SIEZEN, Roland; DE VOS, Willem. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, v. 201, n. 3, p. 581-584, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16317.x>>.

NGADI, MO; BAJWA, SSS; ALAKALI J. Minimally processed foods. In: Simpson K (Ed.), **Food Biochemistry and Food Processing**, 2nd edition. Ames, IA, USA: Wiley-Blackwell, 2012, pp. 746-763.

OLIVEIRA, Rodrigo Lira de; SILVA, Marcos Felipe; CONVERTI, Attilio; PORTO, Tatiana Souza. Biochemical characterization and kinetic/thermodynamic study of *Aspergillus tamaris* URM4634 β -fructofuranosidase with transfructosylating activity. *Biotechnology Progress*, 2019, in press. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/btpr.2879>>.

OLIVEIRA, Rodrigo Lira; SILVA, Osmar Soares; CONVERTI, Attilio; PORTO, Tatiana de Souza. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 1088-1093, 2018. Disponível: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.154>>.

O'SULLIVAN, L; ROSS, RP; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002. Review. doi: 10.1016/s0300-9084(02)01457-8.

PACE, CN. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, n. 1, p. 29-35, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90121-Y](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90121-Y)>.

RILEY, Margareth; WERTZ, John. Bacteriocins, Evolution, Ecology and Application. **Annual Review Microbiology**, v. 7, p. 129-133, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>>.

ROGERS, LA. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v. 16, n. 2, p. 321-325, 1928.

SALEEM, Muhammad Farrukh; RASHID, Muhammad; JABBAR, Abdul; PERVEEN, Raheela; KHALID, Ahamd; RAJOKA, Muhammadibrahim. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 849-855, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.026>>.

SANT'ANNA, Voltaire; UTPOTT, Michele; CLADERA-OLIVERA, Florencia; BRANDELLI, Adriano. Kinetic modeling of thermal inactivation of the bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3147–3152, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf903626w>>.

SIDEK, Nurul Lyana; TAN, Too Shun; ABBASILIASI, Sahar; WONG, Fadzile Wong Faizal; MUSTAFA, Shuhaimi; ARIFF, Abrakariya. Aqueous two-phase flotation for primary recovery of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) from *Pediococcus acidilactici* Kp10. **Journal of Chromatography B**, v. 1027, p. 81–87, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.024>>.

SILVA, Osmar Soares; OLIVEIRA, Rodrigo Lira; SILVA, Jonathas de Carvalho; CONVERTI, Attilio; PORTO, Tatiana Souza. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1039-1044, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.081>>.

STUMBO, CR. **Thermobacteriology in Food Processing**, 2nd ed. New York: Academic Press, 1973.

THIRUMURUGAN, A; RAMACHANDRAN, S; SIVAMANI, S. Bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum* ATM11: Kinetic and thermodynamic studies. **International Journal of Food Engineering**, v. 15, n. 5, p. 501-505, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0376>>.

VAN BOEKEL, Martinus. Kinetic modeling of food quality: A critical review. *Compr. Rev. Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 1, p. 144-158, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00036.x>>.

XIONG, C.M; SUN, J.R; CHEN, Y.F; SHEN, B.G; DU, J; LI Y.X. Relation between magnetic entropy and resistivity in La/sub 0.67/Ca/sub 0.33/MnO/sub 3. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 41, 2005.

YE, R; XU, H; WAN, C; PENG, S; WANG, L; XU, H; AGUILAR, ZP; XIONG, Y; ZENG, Z; WEI, H. Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 439, p. 148-153, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>>.

30/10/2019

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 7755864J2 - Gabriel Moretti de Almeida

Email: gabrielmoretti@usp.br
Data de Nascimento: 12/11/1987
Cédula de Identidade: RG - 44.435.049-4 - SP
Local de Nascimento: Estado de Goiás
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2011
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Tecnologia de Fermentações - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 02/07/2015
Início da Contagem de Prazo: 02/07/2015
Data Limite para o Depósito: 30/10/2019
Orientador na USP: Prof(a). Dr(a). Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - 02/07/2015 até o presente. Email: rpsolive@usp.br

Aluno USP em convênio de dupla titulação com Instituição estrangeira

Instituição Conveniada: Università degli Studi di Genova, Itália
Orientador na Instituição Conveniada: Patrizia Perego
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/07/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 02/07/2019 até 30/10/2019

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 30/08/2017

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 02/07/2015
 Prorrogação em 24/01/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 30/10/2019 07:54:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 7755864/2 - Gabriel Moretti de Almeida

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5897-2/2	Nutrigenômica do Câncer	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
MGT5744-5/4	Genética e Doenças Gastrointestinais (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	14/09/2015	27/09/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5787-1/4	Aplicação Biotecnológica de Bactérias Láticas	01/02/2016	06/03/2016	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5788-1/1	Aplicação de Alimentos Probióticos na Modulação de Imunidade de Mucosas	28/03/2016	17/04/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5752-1/3	Probióticos em Alimentos e Suas Implicações na Saúde Humana	05/04/2016	16/05/2016	60	4	91	B	N	Concluída
MGT5772-1/1	Neurogastroenterologia e Motilidade Digestiva (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	02/05/2016	15/05/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBT5738-2/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica III	01/04/2019	15/07/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	25
Estágios:			
Total:	0	20	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/07/2019

Impresso em: 30/10/2019 07:54:30