



MONIQUE SUELA SILVA

***TEJUINO*: BEBIDA TÍPICA MEXICANA COM
POTENCIAL PROBIÓTICO**

LAVRAS - MG

2016

MONIQUE SUELA SILVA

***TEJUINO*: BEBIDA TÍPICA MEXICANA COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Monique Suela.

Tejuino: bebida típica mexicana com potencial probiótico / Monique Suela Silva. – Lavras: UFLA, 2016.

49 p.

Tese(doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Bibliografia.

1. Fermentação. 2. *Leuconostoc citreum*. 3. Probióticos. 4. Simulador do trato gastrintestinal. 5. *Weissella cibaria*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MONIQUE SUELA SILVA

***TEJUINO*: BEBIDA TÍPICA MEXICANA COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 22 de agosto de 2016.

Dra. Rosane Freitas Schwan,	UFLA
Dra. Cíntia Lacerda Ramos,	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli,	UFLA
Dra. Sabrina Carvalho Bastos,	UFLA
Dra. Marisela Gonzalez Avila	CIATEJ
Dr. Javier Placido Arrizon Gaviño	CIATEJ

Dr. Disney Ribeiro Dias
Orientador

Dra. Rosane Freitas Schwan
Coorientadora

LAVRAS – MG
2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Microbiologia Agrícola e do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias, pela orientação e ensinamentos, essenciais para a realização deste trabalho e crescimento profissional.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela coorientação e ensinamentos.

Ao Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño Del Estado de Jalisco (CIATEJ) e aos Drs. Javier Placido Arrizon Gaviño, Marisela Gonzalez Avila e Anne Gschaedler Mathis, pelas orientações e confiança para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição para o melhoramento deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório, pelas ajudas na condução do experimento e pelos momentos de descontração.

Aos meus familiares e namorado, pelo apoio e incentivo, por saberem a importância da educação e o valor de um sonho.

Agradecer, principalmente, a Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar diante das dificuldades.

RESUMO

A fermentação, além de preservar os alimentos, aumenta seu valor nutricional por meio da síntese de aminoácidos essenciais, vitaminas e outros compostos. Além disso, os microrganismos responsáveis pela fermentação e presentes no alimento, ainda viáveis, podem trazer benefício para os seres humanos, apresentando características probióticas. Os cereais, por sua vez, são fontes de carboidratos não digeríveis que atuam como prebióticos. Assim, a fermentação de cereais, combinada ao uso de microrganismos probióticos, constitui área de interesse para a investigação de novos alimentos funcionais. No México existem vários produtos fermentados tradicionais a partir do milho, entre eles o *tejuino*. Este trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar possíveis bactérias probióticas do *tejuino*. Inicialmente, 81 bactérias isoladas e identificadas do *tejuino* passaram por seleção baseada em dois principais critérios: não patogenicidade e consistirem espécies novas com potencial probiótico. As 11 bactérias selecionadas foram adaptadas à temperatura de 37 °C, crucial para o sucesso das análises seguintes. Aquelas que mais bem se adaptaram foram *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Chryseobacterium bovis* e *Bacillus safensis*. As bactérias foram cultivadas em seus respectivos meios até atingirem uma população de 8-9 Log UFC/ml e inoculadas separadamente no equipamento que simula o trato gastrointestinal humano (*automatic robotic intestinal system*, ARIS), primeiramente com solução salina a 0,9% e, depois, com “alimento” simulado. As bactérias recuperadas nesta etapa foram submetidas à prova de inibição de patógenos (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium isolada de frango, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) pela técnica de Kirby-Bauer e avaliadas quanto à produção de ácidos graxos de cadeia curta por HPLC e à capacidade de adesão às células HT-29. As espécies foram confirmadas por técnicas moleculares ao final do experimento. As bactérias *L. citreum* e *W. cibaria* sobreviveram à passagem pelo simulador (7 e 6 Log UFC/mL recuperadas ao final, respectivamente) e apresentaram bons resultados nos testes probióticos *in vitro*. Ambas foram capazes de inibir os patógenos testados e a análise dos perfis de ácidos graxos demonstrou a produção dos ácidos propiônico e butírico, envolvidos na melhoria da saúde e do bem-estar do consumidor. A capacidade de aderir às células de adenocarcinoma colorretal foi verificada apenas para *L. citreum* (aproximadamente, 25% de adesão), enquanto *W. cibaria* não alcançou 1%. Assim, a bebida *tejuino* tem grande valor agregado não somente cultural, mas também nutricional, uma vez que pode se tratar de um alimento probiótico, visto que há presença de bactérias com potencial probiótico.

Palavras-chave: Fermentação. *Leuconostoc citreum*. Probióticos. Simulador do trato gastrointestinal. *Weissella cibaria*.

ABSTRACT

Fermentation increases nutritional value by essential amino acids, vitamins and other compounds synthesis, besides that, also preserves the food. Moreover, the microorganisms responsible for fermentation and in the food, still viable, can bring benefits to humans, showing probiotic characteristics. Cereals, on the other hand, are nondigestible carbohydrates sources that act as prebiotics. Therefore, the fermentation of cereals, combined with probiotic microorganisms use, consist in an area of interest for new functional foods investigation. In Mexico, there are several traditional fermented products from corn, including *tejuino*. This study was performed in order to select potential probiotic bacteria from *tejuino*. Initially, 81 bacteria that were isolated and identified from *tejuino* passed for selection based on two main criteria: no pathogenicity and consist of new species with potential probiotic. The 11 selected bacteria were adapted to the temperature of 37 ° C, crucial to the success of the following analysis. Those that best adapted were *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Chryseobacterium bovis* and *Bacillus safensis*. The bacteria were grown in their respective culture media until reaching a population of Log 8-9 cfu / ml and inoculated separately in equipment that simulates the human gastrointestinal tract (*automatic robotic intestinal system*, ARIS), first with 0.9% saline and then with simulated "food". The bacteria recovered at this stage were subjected to pathogen inhibition test (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium* isolated from chicken, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) by Kirby-Bauer technique and evaluated for production of fatty acids of short chain by HPLC and the cells ability to adhere to HT-29. The species were confirmed by molecular techniques at the end of the experiment. The bacteria *L. citreum*, and *W. cibaria* survived the passage through the simulator (7 and 6 Log UFC/mL recovered at the end, respectively) and showed good results in the Probiotics *in vitro* tests. Both were able to inhibit the tested pathogens and analysis of fatty acid profiles showed the production of propionic and butyric acids that are involved in improving the health and consumer welfare. The ability to adhere to colorectal adenocarcinoma cells was observed only for *L. citreum* (approximately 25% of adherence) while *W. cibaria* not reached 1%. Thereby, the *tejuino* beverage has not only great culture value, but also nutritional, since it can be treat as a probiotic food and has the presence of bacteria with potential probiotic.

Keywords: Fermentation. *Leuconostoc citreum*. Probiotics. Gastrointestinal Tract Simulator. *Weissella cibaria*.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	8
	Introdução Geral	8
1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	Probióticos	11
2.2	Prebióticos	12
2.3	Simbióticos	14
2.4	Fermentação	14
2.5	Alimentos fermentados à base de cereal	16
2.6	Tejuino - bebida fermentada indígena à base de massa de milho nixtamalizado	18
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	26
	ARTIGO 1 Evaluation of probiotic properties of <i>Weissella cibaria</i> and <i>Leuconostoc citreum</i> isolated from <i>tejuino</i> – a typical Mexican beverage	26

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos fermentados deram importante contribuição à dieta humana em muitos países, uma vez que a fermentação é uma tecnologia barata que preserva os alimentos e melhora seu valor nutricional e suas propriedades sensoriais (STEINKRAUS, 1997). Os alimentos fermentados são produzidos, mundialmente, utilizando uma variedade de técnicas, matérias-primas e microrganismos (BLANDINO et al., 2003). Na maioria dos países tropicais onde os produtos lácteos são difíceis de armazenar, os alimentos amiláceos, como mandioca, milho e sorgo, entre outros são a base da alimentação. (BEN OMAR; AMPE, 2000).

Embora os cereais sejam considerados a principal fonte de nutrientes, como proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras em todo o mundo, a qualidade nutricional e sensorial destes alimentos é pobre, quando comparada com a do leite e seus derivados. Uma alternativa para tornar esses alimentos mais palatáveis e agregar valor nutricional seria a fermentação (BLANDINO et al., 2003). Além do mais, os cereais são fontes de carboidratos não digeríveis (prebióticos) que promovem diversos efeitos fisiológicos benéficos, além de estimular seletivamente o crescimento de lactobacilli e bifidobactérias.

Os prebióticos são compostos que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas humanas no trato gastrointestinal superior, afetando benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento e ou atividade de determinadas bactérias presentes no cólon, que podem melhorar a saúde do hospedeiro (CHARALAMPOPOULOS et al., 2002). Sendo assim, uma

alternativa para atender à crescente demanda do consumidor por alimentos saudáveis seriam os alimentos fermentados à base de cereais, uma vez que estes podem ser fontes de prebióticos e probióticos.

Probióticos são microrganismos vivos que, consumidos em concentrações adequadas, podem trazer benefícios à saúde do consumidor (GUARNER; SCHAAFSMA, 1998). Tais benefícios envolvem a modulação e a estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; a promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; a diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e lático; a produção de bacteriocinas; a promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; a estimulação do sistema imune; o aumento da absorção de minerais e a produção de vitaminas (HOLZAPFEL et al., 1998). Os probióticos bacterianos comumente utilizados incluem algumas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces boulardii*, de acordo com Morrow et al. (2012), ainda é a única levedura utilizada como probiótico.

Para que microrganismos sejam utilizados como probióticos, eles devem resistir ao ácido estomacal, à bile e às enzimas pancreáticas; ser capazes de aderir às células da mucosa intestinal e colonizar o intestino; produzir substâncias antimicrobianas (bacteriocinas); trazer benefícios à saúde do consumidor e não serem patogênicos (*generally regarded as safe*, GRAS). Para aplicação industrial, os microrganismos probióticos, além de cumprirem os requisitos anteriormente citados, devem apresentar baixo custo, manter sua viabilidade durante o processamento e armazenamento e ser de fácil aplicação nos produtos (PRADO et al., 2008).

A maioria das bactérias utilizadas em alimentos probióticos comercializados foi isolada do trato gastrintestinal de humanos por meio de amostras fecais, uma vez que a probabilidade de compatibilidade e

sobrevivência na microbiota intestinal é maior. Contudo, microrganismos isolados de alimentos fermentados espontaneamente têm demonstrado habilidades probióticas em testes *in vitro* (MATHARA et al., 2008; TAKEDA et al., 2011). Sendo assim, a seleção de bactérias a partir de uma bebida típica mexicana, o *tejuino* representa uma alternativa na busca por novos probióticos, uma vez que não há dados na literatura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Probióticos

O termo probiótico significa “para a vida” e é normalmente utilizado para nomear determinados microrganismos que, quando ingeridos em concentrações adequadas, trazem inúmeros benefícios à saúde do consumidor, sejam eles humanos ou animais (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2001). Geralmente, para conferir tais benefícios, os microrganismos devem estar vivos e em concentrações superiores a 10^8 - 10^9 células por dose diária (PRADO et al., 2008). As bactérias do ácido lático são os principais representantes probióticos (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2001), sendo mais comumente utilizadas as espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CRUZ; FARIA; DENDER, 2007).

Os alimentos probióticos industrializados são comumente encontrados em produtos lácteos, tais como iogurtes e kefir (GRANATO et al., 2010; HELLER, 2001). Estes alimentos constituem carreadores adequados, uma vez que promovem uma imagem saudável e positiva dos probióticos e os consumidores já estão familiarizados com o fato de que os alimentos fermentados contêm microrganismos vivos (HELLER, 2001).

O microrganismo, para ser utilizado como probiótico, deve apresentar algumas propriedades, como resistência aos ácidos e bile, adesão às células epiteliais, colonização do intestino, produção de substâncias antimicrobianas denominadas de bacteriocinas (JACK; TAGG; RAY, 1995) e bom crescimento, além de afetar benéficamente a saúde do consumidor (PRADO et al., 2008). Principalmente, o microrganismo não deve ser patogênico e reconhecido como GRAS (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998). Além destas

características, do ponto de vista comercial, o microrganismo deve, ainda, apresentar baixo custo, manter sua viabilidade durante o processamento e armazenamento, ser de fácil aplicação nos produtos e resistir durante o processamento físico-químico do alimento (PRADO et al., 2008).

Os benefícios associados aos probióticos envolvem o aumento da tolerância à lactose e melhora na digestão, influência positiva na microbiota intestinal, redução do pH intestinal, melhora no funcionamento do intestino, redução do colesterol, redução dos níveis de amônia e de outros compostos tóxicos, produção de vitaminas do complexo B, restauração da microbiota intestinal normal após terapia com antibiótico, tratamento e prevenção de diarreia aguda por rotavírus e estimulação do sistema imune (GIBSON; ROBERFROID; LOUUAİN, 1995; PAPADIMITRIOU et al., 2015).

A maioria das bactérias probióticas comercializadas atualmente foram originalmente isoladas de amostras fecais humanas, de forma a maximizar a probabilidade de compatibilidade com a microbiota intestinal e melhorar suas chances de sobrevivência (CRUZ; FARIA; DENDER, 2007; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Contudo, microrganismos isolados de alimentos fermentados têm demonstrado tais habilidades em estudos *in vitro* (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Sendo assim, existe enorme interesse em alimentos fermentados tradicionais, os quais constituem reservatório para pesquisas por novas cepas com novas propriedades funcionais (AYENI et al., 2011).

2.2 Prebióticos

Os prebióticos, em sua maioria carboidratos, são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade de um número limitado de

bactérias no cólon e, dessa forma, melhoram a saúde do hospedeiro (ROBERFROID et al., 2010). Os prebióticos, além de estimularem tais bactérias benéficas, devem também resistir à acidez gástrica e às enzimas de mamíferos, e ser susceptíveis à fermentação pela microbiota intestinal (LAPARRA; SANZ, 2010). Denominados de fibras solúveis (VYAS; RANGANATHAN, 2012), os prebióticos são o substrato energético para a microbiota e para as células do hospedeiro; são essenciais para o crescimento das células do cólon, os colonócitos, além de importantes para o balanço de água e eletrólitos, e também impedem a invasão de patógenos (BENGMARK, 2007).

O grupo de bactérias capazes de fermentar os prebióticos incluem bifidobactérias, lactobacilos e eubactérias (HOLZAPFEL; SCHILINGER, 2002). Os benefícios à saúde envolvendo as bifidobactérias são melhoramento do ambiente intestinal, inibição de bactérias patogênicas, imunomodulação, síntese de vitamina B, melhora na absorção de cálcio, redução dos níveis de amônia e de colesterol sanguíneos, e inibição da formação de tumor (GIBSON et al., 1996).

Os prebióticos com eficácia comprovada e comercialmente disponíveis são fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, lactulose e galacto-oligossacarídeos. Embora não exista uma dose diária recomendada, acredita-se que concentrações de 4 a 20 g/dia sejam suficientes para demonstrar eficácia (TUOHY et al., 2003). Roberfroid et al. (1998) sugeriram que a dose mínima diária de ingestão de inulina ou fruto-oligossacarídeos para que a população de bifidobactérias aumente no intestino seja de 4 g. Por outro lado, doses superiores a 20 g/dia podem trazer efeitos colaterais, como aumento da flatulência e inchaço abdominal (TUOHY et al., 2003). A chicória, o alho, a cebola, a alcachofra e os aspargos são exemplos de alimentos ricos em FOS (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

2.3 Simbióticos

Os simbióticos são o produto da combinação de probiótico e prebiótico, no intuito de aumentar a sobrevivência e a atividade do probiótico, como também estimular as bifidobactérias e os lactobacilos indígenas (DUGHERA et al., 2007; TSLICHIYA et al., 2004). Dessa forma, a combinação de um micro-organismo com o substrato específico para o seu crescimento pode ser vantajoso. Por exemplo, a utilização de FOS e a bactéria *Bifidobacterium* resultam no aumento da capacidade de sobrevivência do probiótico, uma vez que o substrato está prontamente disponível para a fermentação (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999).

A microbiota intestinal apresenta importante papel na manutenção da saúde e do bem-estar humano. Tais benefícios envolvem estimulação do sistema imune, efeito antagonista contra patógenos, detoxificação de compostos carcinogênicos, fermentação de ingredientes alimentares não digeríveis e liberação de metabólitos associados à comunicação entre a microbiota e o hospedeiro (CORTHER; DORÉ, 2010).

Probióticos, prebióticos e simbióticos têm demonstrado ser clinicamente efetivos contra uma variedade de distúrbios intestinais, como indigestão, diarreia do viajante e, também, no melhoramento e na manutenção da saúde em geral. Outras pesquisas têm, ainda, demonstrado resultados promissores no combate ao câncer e a doenças envolvendo o cérebro, os rins e na obesidade (VYAS; RANGANATHAN, 2012).

2.4 Fermentação

A fermentação é uma das técnicas mais antigas de preservação dos alimentos (STILES, 1996). Desde o início das civilizações, métodos de

fermentação de leite, carnes e vegetais têm sido descritos. Todavia, consistiam em processos artesanais, naturais, em que não se conhecia a ação dos microrganismos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

A preservação do alimento pela fermentação é uma técnica efetiva e econômica (PARVEEN; HAFIZ, 2003), não somente por reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes, como também por aumentar, por via natural, o valor nutricional do alimento pela síntese microbiana de aminoácidos essenciais e vitaminas. A fermentação também proporciona o aumento da digestibilidade dos alimentos de difícil assimilação, do ponto de vista nutricional, enquanto podem reduzir o volume de material a ser transportado e diminuir o tempo de cocção do alimento (SIMANGO, 1997). Além do mais, a fermentação pode também resultar na detoxificação e na destruição de substâncias indesejáveis presentes na matéria-prima, tais como fitatos, taninos e polifenóis (GADAGA et al., 1999). Geralmente, envolvem culturas mistas de microrganismos que crescem simultaneamente ou em sucessão, agregando alto valor nutritivo e promovendo diversidade de sabores, aromas, e texturas no alimento fermentado (PARVEEN; HAFIZ, 2003).

Nos países em desenvolvimento, a fermentação constitui uma técnica importante não somente de preservação dos alimentos, visto a escassez de recursos e capital que limitam a utilização de técnicas para preservação e melhoramento de alimentos, como também uma maneira de enriquecimento dos alimentos com vitaminas (PARVEEN; HAFIZ, 2003).

Em princípio, a fermentação consistia em metodologias e conhecimentos passados de geração em geração, dentro de uma comunidade e destinada a número pequeno de indivíduos. Contudo, em meados do século XIX, dois eventos ocorreram e alteraram este cenário e a compreensão deste processo. O primeiro deles refere-se à Revolução Industrial, que resultou na concentração de grande massa populacional nas cidades. Este fato levou à necessidade de se

produzir alimentos em escalas cada vez maiores, a fim de atender à demanda da população, o que resultou na industrialização desses processos manufaturados. O segundo evento foi o surgimento da microbiologia como ciência, em 1850 e a compreensão da base biológica da fermentação (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Os alimentos fermentados são produzidos, mundialmente, utilizando-se uma variedade de técnicas, matérias-primas e microrganismos. Contudo, existem somente quatro principais tipos de fermentação que são a alcóolica, a ácido-lática, a ácido acética e a álcali (BLANDINO et al., 2003). A fermentação alcóolica resulta na produção de etanol, por leveduras, como na produção de vinhos e cervejas. Na fermentação ácido-lática que ocorre em leites fermentados e cereais, as bactérias do ácido lático são as principais envolvidas. Outro grupo de bactérias igualmente importante na fermentação de alimentos é o das bactérias produtoras do ácido acético. Nesta fermentação, o etanol é convertido em ácido acético na presença de oxigênio. Por último, cita-se a fermentação álcali, durante a fermentação de peixes e sementes, popularmente utilizada como condimento (MCKAY; BALDWIN, 1990).

2.5 Alimentos fermentados à base de cereal

Os cereais são considerados a principal fonte de nutrientes, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras da alimentação em todo o mundo. Entretanto, a qualidade nutricional dos cereais e suas propriedades sensoriais são, algumas vezes, inferiores ou pobres, quando comparadas com as do leite e produtos derivados do leite. Sendo assim, a fermentação é uma via simples e econômica de melhorar o valor nutricional, as propriedades sensoriais e as qualidades funcionais deste alimento (BLANDINO et al., 2003).

Os alimentos fermentados tradicionais são preparados de cereais conhecidos em toda a parte do mundo, como arroz, trigo, milho e sorgo. Alguns são utilizados como corantes, temperos, bebidas, em cafés da manhã ou refeições, e alguns são componentes principais da alimentação. Na maioria destes produtos, a fermentação é natural e envolve culturas mistas de leveduras, bactérias e fungos. As bactérias mais comuns durante a fermentação correspondem a espécies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*. Os gêneros de fungos mais comumente encontrados são *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichothecium*. As leveduras são representadas por espécies do gênero *Saccharomyces*, resultando na fermentação alcoólica (STEINKRAUS, 1997).

O tipo de microbiota desenvolvida em cada alimento fermentado depende da atividade de água, do pH, da concentração de sal, da temperatura e da composição da matriz alimentar (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999).

A indústria de alimentos está direcionada ao desenvolvimento de novos produtos na área de alimentos funcionais ou ingredientes funcionais, devido à demanda do consumidor por alimentos saudáveis. Os cereais são fontes de carboidratos não digeríveis (prebióticos), como β -glucana, arabinxilana e oligossacarídeos, que estão envolvidos em diversos efeitos fisiológicos benéficos na saúde do consumidor. São, também, responsáveis por estimular seletivamente o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias presentes no cólon. Sendo assim, os cereais oferecem alternativa à produção desses alimentos (CHARALAMPOPOULOS et al., 2002).

2.6 Tejuino - bebida fermentada indígena à base de massa de milho nixtamalizado

Na maioria dos países tropicais onde os produtos lácteos são difíceis de armazenar, os alimentos amiláceos, como mandioca, milho e sorgo, entre outros, são a base da alimentação (BEN OMAR; AMPE, 2000). Dentre os cereais, o milho tem sua origem no México, tendo sido consumido na forma fermentada por centenas de anos. Inúmeros produtos tradicionais à base de milho têm sido desenvolvidos pelas populações indígenas do México e do Peru, desde a era pré-colombiana e utilizados como estimulantes, na medicina tradicional e em cerimônias religiosas (SANGWAN; KUMAR; GOYAL, 2014).

O milho é boa fonte dietética de fibras e proteínas, enquanto apresenta baixas concentrações de lipídios e sódio. De acordo com a variedade do milho, ele pode conter vitaminas B, ácido fólico, vitamina C e um precursor da vitamina A, além de ser rico em fósforo, magnésio, manganês, zinco, cobre, ferro, selênio e, em menor quantidade, potássio e cálcio (SANGWAN; KUMAR; GOYAL, 2014).

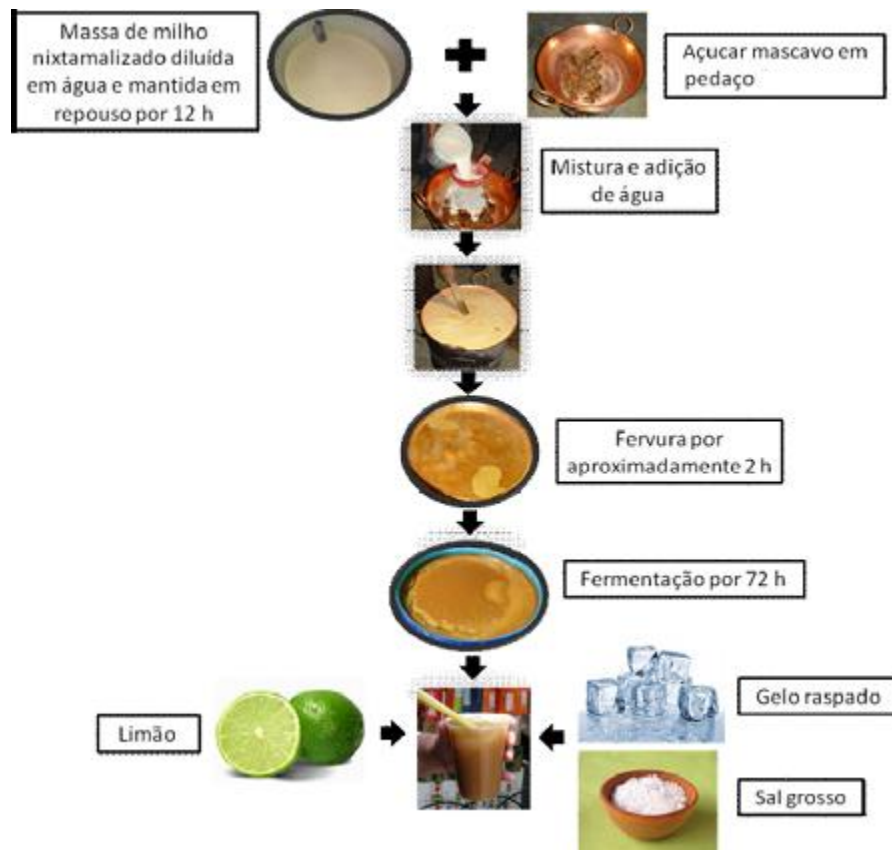
O milho é a terceira cultura de cereal mais importante no mundo, depois do arroz e do trigo (DÍAZ-RUIZ et al., 2003). Devido à sua adaptabilidade, pode ser cultivado em ampla faixa de condições climáticas. Os principais países produtores da América Latina são México, Brasil, Argentina, Uruguai, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela. Em muitos destes países, o milho constitui um dos principais artigos alimentícios, utilizado, principalmente, na alimentação humana ou como alimento para animais (NURANDA; WACHER; OWENS, 1995). Todavia, atualmente, existem, no México, alguns alimentos fermentados à base de milho de origem pré-colombiana, os quais seguem os mesmos processos de elaboração utilizados pelos indígenas. Algumas dessas bebidas fermentadas à base de milho são *pozole*, *atole*, *charagua* e *tejuino*, entre outras.

Estes alimentos fermentados indígenas têm ganhado grande importância, não somente alimentícia, mas também econômica (BEN OMAR; AMPE, 2000).

O *tejuino*, ou *tesguino*, é uma bebida tradicional mexicana à base de milho (Figura 1). O preparo desta bebida varia entre os povos, mas, geralmente, utiliza uma massa de grãos de milho nixtamalizado. A nixtamalização consiste no cozimento dos grãos de milho em óxido de cálcio (CaO - cal). Este processo aumenta a disponibilidade de aminoácidos, ferro e outros minerais, ácido nicotínico e niacina, bem como diminui os níveis de tanino dos grãos (SEFA-DEDEH et al., 2004). O *tejuino* é obtido da fermentação desta massa de milho nixtamalizado, a mesma massa utilizada para o preparo de *tortillas* e *tamales*, pratos típicos da culinária mexicana. Adicionam-se a esta massa água e açúcar mascavo. Em seguida, a mistura é colocada para ferver e deixada em repouso à temperatura ambiente por, aproximadamente, 24 horas, para que a fermentação ocorra. A bebida é servida fria, com suco de limão, uma pitada de sal grosso e gelo (LONG, 2010).

Alimentos fermentados à base de cereais são possíveis simbióticos, devido à sua constituição química e microbiológica. Tais alimentos fermentados tradicionais têm uma riqueza de microrganismo ainda pouco explorada. Aliado a este fato e à falta de dados na literatura sobre o *tejuino*, há crescente interesse no estudo desta bebida, objetivando não somente averiguar o perfil microbiológico, como também a busca por cepas probióticas e, dessa forma, melhorar as qualidades funcionais e a produção em larga escala.

Figura 1 - Esquema de produção artesanal de *tejuino*. O processo de produção da bebida segue, basicamente, estas etapas, com algumas modificações no modo de preparo e nos ingredientes adicionados, como essências e polpa de frutas.



3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No mundo, há grande variedade de alimentos fermentados nos quais diferentes substratos são metabolizados por uma diversidade de microrganismos e produtos com características únicas e com grande valor cultural. A diversidade de tais produtos se deve à heterogeneidade das tradições encontradas no mundo, às preferências culturais, às diferentes áreas geográficas onde são produzidos e à matéria-prima utilizada para a fermentação.

Os cereais têm demonstrado serem substratos convenientes para o crescimento de bactérias probióticas e excelentes carreadores, além de conter potenciais compostos prebióticos, cuja funcionalidade merece ser explorada. Tais alimentos são foco de grande interesse, devido à crescente compreensão do papel que a microbiota intestinal apresenta na saúde e na resistência a doenças.

REFERÊNCIAS

- AYENI, F. A. et al. Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow 's intestine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 97-104, 2011.
- BEN OMAR, N.; AMPE, F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3664-3673, 2000.
- BENGMARK, S. Bioecological control of acute and chronic diseases: the role of pro-, pre- and synbiotics. **Kuwait Medical Journal**, Safat, v. 39, n. 3, p. 216-226, 2007.
- BLANDINO, A. et al. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 131-49, 1999.
- CHARALAMPOPOULOS, D. et al. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, p. 131-141, 2002.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6946, n. 98, p. 487-490, 1998.
- CORTHER, G.; DORÉ, J. A new era in gut research concerning interactions between microbiota and human health. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, Jouy-en-Josas, v. 34, p. 1-6, 2010. Supplement.
- CRUZ, A. G. da; FARIA, J. D. A. F.; DENDER, A. G. F. van. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.
- DÍAZ-RUIZ, G. et al. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4367-4374, 2003.

DUGHERA, L. et al. Effects of symbiotic preparations on constipated irritable bowel syndrome symptoms. **Acta Biomedic**, Fidenza, v. 78, p. 111-116, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Rome, 2001. 34 p.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 53-61, 1999.

GADAGA, T. H. et al. A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1, p. 1-11, 1999.

GIBSON, G. L. E. Y. Y. R.; ROBERFROID, M. B.; LOUUAINE, C. de. Critical review dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 55, p. 899-912, 1996.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, p. 1401-1412, 1995.

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 237-238, Nov. 1998.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, n. 2, p. 374-379, 2001.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p. 85-101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Barking, v. 35, p. 109-116, 2002.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 171-200, 1995.

KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p. 45-57, 1999.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, London, v. 61, p. 219-225, 2010.

LONG, J. Tecnología alimentaria prehispánica. **Revista Eletrônica Estudos de Cultura Nahuat**, Ciudad de México, v. 39, p. 127-136, 2010.

MATHARA, J. M. et al. Functional properties of lactobacillus plantarum strains isolated from maasai traditional fermented milk products in Kenya. **Current Microbiology**, New York, v. 56, n. 4, p. 315-321, 2008.

MCKAY, L. L.; BALDWIN, K. A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 87, p. 3-14, 1990.

NURAIIDA, L.; WACHER, M. C.; OWENS, J. D. Microbiology of pozol, a Mexican maize dough. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 567-571, 1995.

PAPADIMITRIOU, K. et al. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 1-28, Feb. 2015.

PARVEEN, S.; HAFIZ, F. Fermented cereal from indigenous raw materials. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 2, n. 5, p. 289-291, 2003.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 2, p. 111-123, 2008.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

- ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, London, v. 104, p. 1-63, 2010.
- ROBERFROID, M. B. et al. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 128, p. 11-19, 1998.
- SANGWAN, S.; KUMAR, S.; GOYAL, S. **Maize: nutrition dynamics and novel uses in maize: nutrition dynamics and novel uses**. New Delhi: Springer India, 2014. 161 p.
- SEFA-DEDEH, S. et al. The microflora of fermented nixtamalized corn. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 97-102, 2004.
- SIMANGO, C. Potential use of traditional fermented foods for weaning in Zimbabwe. **Social Science & Medicine**, New York, v. 44, n. 7, p. 1065-1068, 1997.
- STEINKRAUS, K. H. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. **Food Control**, Guildford, v. 8, n. 5/6, p. 311-317, 1997.
- STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, n. 2/4, p. 331-345, 1996.
- TAKEDA, S. et al. The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. **Animal Science Journal**, Berlin, v. 82, n. 4, p. 571-579, 2011.
- TSLICHIYA, J. et al. Single-blind follow-up study on the effectiveness of a symbiotic preparation in irritable bowel syndrome. **Chinese Journal of Digestive Diseases**, Shanghai, v. 5, p. 169-174, 2004.
- TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Therapeutic Focus**, Darmstadt, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.
- VYAS, U.; RANGANATHAN, N. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. **Gastroenterology, Research and Practice**, Cairo, v. 2012, p. 1-16, 2012.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1

Evaluation of probiotic properties of *Weissella cibaria* and *Leuconostoc citreum* isolated from *tejuino* – a typical Mexican beverage

Normas da revista International Journal of Food Microbiology

Monique Suela Silva¹, Cíntia Lacerda Ramos¹, Marisela Gonzalez Avila³, Anne Gschaedler Mathis⁴, Javier Placido Arrizon Gaviño⁴, Rosane Freitas Schwan¹,
Disney Ribeiro Dias²

¹ Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA), Campus
Universitário, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

² Department of Food Science, Federal University of Lavras (UFLA), Campus
Universitário, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

³ Laboratório de Digestión *ex vivo*, Centro de Investigación y Asistencia en
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco – CIATEJ, Avenida Normalistas, 800
–Guadalajara, Jalisco, 44270 -México

⁴ Laboratório de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia
en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco – CIATEJ, Avenida Normalistas,
800 –Guadalajara, Jalisco, 44270 - México

ABSTRACT

Tejuino is a traditional Mexican beverage prepared by fermentation of nixtamalized corn mass. The survival of bacterial strains isolated from *tejuino* were evaluated in the human gastrointestinal model ARIS using saline solution and simulated “food” as matrices. Antagonistic activity towards pathogenic bacteria, short-chain fatty acids production and adhesion to HT-29 cells were also studied. Eleven strains were selected based on being nonpathogenic, described as GRAS (generally recognized as safe) and novel specie as probiotic. First, the bacteria strains were submitted to temperature increase until 37 °C in order to select those able to tolerate corporal temperature. Thus, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*, *Chryseobacterium bovis* and *Bacillus safensis* were selected and inoculated, separately, in the ARIS model. Saline solution (0.9% w/v) and “food” were used as matrix. *B. safensis* and *C. bovis* were unable to survive the simulation test of the human gastrointestinal tract. The “food” was more efficient matrix recovering higher than 5.0 Log CFU/mL at end of assay. *Leu. citreum* seemed to be more resistant to gastrointestinal conditions than *W. cibaria* recovering 7-8 Log CFU/mL. However, both strains reached the recommended population in the intestine (around 6-7 Log CFU/mL) when administered with “food” matrix. In the antagonistic assay, *Leu. citreum* showed highest ($p<0.05$) inhibition towards *S. aureus* and *S. Typhimurium* strains while *W. cibaria* had highest ($p<0.05$) activity towards *L. monocytogenes*. The production of short-chain fatty acids in MRS broth were evaluated and *Leu. citreum* showed higher ($p<0.05$) production of formic, propionic and butyric acids (0.10 g/L, 37.52 g/L and 2.65 g/L, respectively) than *W. cibaria* (0.09 g/L, 16.68 g/L and 1.26 g/L, respectively). In regards of adhesion to HT-29 cells, *Leu. citreum* showed higher percentage of adhesion (approximately 25 %) than *W. cibaria* (approximately 0.5 %). *Leu. citreum*, never previously described as probiotic, showed to be a potential probiotic strain due its tolerance to gastrointestinal condition, antagonistic activity towards foodborne pathogens, short-chain fatty acids production and adhesion to HT-29 cells. This study provided a first insight relating probiotic properties to *tejuino* strains. However, more studies regarded to safety and *in vivo* tests should be performed in order to stablish a novel probiotic strain.

Keywords: *tejuino*, probiotic, human gastrointestinal model ARIS, *Leuconostoc citreum*, *Weissella cibaria*.

1 INTRODUCTION

The demand for healthy foods has driven the food industry to develop new functional products. Functional foods include foods or ingredients that have a beneficial effect on consumer health and / or reduces the risk of chronic disease in addition to the basic nutritional function (Charalampopoulos et al., 2002). Amongst these, it is possible to highlight the probiotics foods. Probiotics are live microorganisms that when ingested in adequate concentrations confer numerous benefits to consumer health (FAO/ WHO, 2001). Probiotics may be found in a variety of products, mainly dairy products, such as yogurt, fermented milks and kefir (Heller, 2001; Granato et al., 2010). Lactic acid bacteria (LAB) is the main group of probiotic microorganisms actually described (Holzapfel and Schillinger, 2002), and the most commonly used species are those belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera (da Cruz et al., 2007). In order to confer benefits to the host, the probiotic strain must be able to survive passage through the gastrointestinal tract, surviving exposure to hydrochloric acid in the stomach and bile in the small intestine, reaching the large intestine (Kabak and Dobson, 2011).

The evaluation of probiotic properties is usually previously performed by *in vitro* assays. Bile and acid resistance, adhesion to the intestinal mucosa, and evaluation of antagonistic activity towards pathogenic bacteria are very useful assays for a pre-selection of potential probiotic strains (Argyri, et al., 2013; Ayeni et al., 2011; Ramos et al., 2013). The ability of probiotic bacteria to survive the harsh environments encountered during processing and gastrointestinal transit has been a major factor in their selection criteria (Nagpal et al., 2012). A five-stage reactor was developed by Molly et al. (1993) to simulate the gastro-intestinal ecosystem of humans. Hernández-Moedano et al. (2014) employed a similar system (Automatic Robotic Intestinal System –

ARIS) to evaluate the prebiotic effect of different fructan fractions on microbial growth. The system consists of five double-jacketed vessels, sequentially connected simulating the stomach, small intestine, ascending, transverse and descending sections of the colon. The system may have a total retention time of 72 h. This system can be useful to provide information about probiotic survival under different conditions including food matrices.

In general, probiotic strains are isolated from human samples as faeces and breast milk (Arboleya et al., 2011; Sathyabama et al., 2012), however, studies have found potential probiotic strains in different food products such as olives, cocoa, sausage, and indigenous fermented foods (Argyri, et al., 2013; Ayeni et al., 2011; Ramos et al., 2013). *Tejuino* is a traditional Mexican beverage prepared by fermentation of nixtamalized corn mass. The nixtamalization process is performed by cooking corn with calcium oxide (CaO₂) and this process can improve several nutritional parameters, enhancing the bioavailability of iron and other minerals, free nicotinic acid, niacin and amino acids, while reducing tannin levels (Sefa-Dedeh et al., 2004).

Tejuino is prepared using the same mass of processed corn used to produce *tortillas* and *tamales*, typical dishes in Mexican cuisine. Sugar and water are added to the mass, which is boiled. The obtained liquid is allowed to ferment at room temperature for about 24 hrs. The beverage is consumed cold with lemon juice, a pinch of salt, and a shaved ice shell or lemon sorbet (Long, 2008). Although some corn foods have been described, there is no data and literature about the microorganisms or probiotic properties of *tejuino* fermentations. The aim of this work was to evaluate the survival of selected bacteria strains isolated from *tejuino* in the human gastrointestinal model ARIS using saline solution and simulated “food” as matrices. Probiotic properties such as antagonistic activity towards pathogenic bacteria, short-chain fatty acids production and adhesion to HT29 cells were also studied.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganisms and culture conditions

A total of 11 bacteria strains (*Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum*, *Bacillus safensis*, *Pseudomonas breneri*, *Pseudomonas psychrophila*, *Chryseobacterium bovis*, *Acetobacter tropicallis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Corynebacterium calluane*, *Kurthia gibsonii*, and *Pantoea vagans*) isolated from *tejuino* and belonging to Industrial biotechnology laboratory of *Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco – CIATEJ* (Guadalajara, México) were selected based on some criteria: nonpathogenic, described as GRAS (generally recognized as safe) and novel specie as potential probiotic.

The bacteria strains were cultured in their respective culture media. *Weissella cibaria* and *Leuconostoc citreum* were cultured in MRS broth (10 g/L Peptone, 10 g/L Beef extract, 5 g/L Yeast extract, Dextrose 20 g/L, 80:1 Polysorbate, 2 g/L Ammonium citrate, 5 g/L Sodium acetate, 0.1 g/L Magnesium sulfate, 0.05 g/L Manganese sulfate, 2 g/L Dipotassium phosphate). *Bacillus safensis*, *Pseudomonas breneri* and *Pseudomonas psychrophila* were cultured in M17 broth (5 g/L Casein peptone, 5 g/L Soy peptone, 0.25 g/L Yeast extract, 5 g/L Beef extract, 0.5 g/L Ascorbic acid, 0.25 g/L Magnesium sulfate, 19 g/L β -glycerophosphate disodium). *Chryseobacterium bovis* was grown in nutrient broth (3 g/L Beef extract, 5 g/L Peptone) and *Acetobacter tropicallis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Corynebacterium calluane*, *Kurthia gibsonii*, and *Pantoea vagans* in PCA broth (5 g/L Casein peptone, 2.5 g/L Yeast extract, 1 g/L Glucose). All strains were incubated at 30 °C for 24h.

The pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* from human and *Salmonella Typhimurium* isolated from chicken)

belonging to Industrial biotechnology laboratory of CIATEJ (Arrizon, 2014) and used in the antagonism test were grown in nutrient broth. *Listeria monocytogenes* was cultured in tryptic soy broth enriched with yeast extract (17 g/L Casein peptone, 3 g/L Soybean peptone, 5 g/L Sodium chloride, 2.5 g/L Dipotassium phosphate, 2.5 g/L Dextrose and 5 g/L Yeast extract). They were incubated at 37 °C for 24-48 hours.

2.2 Tolerance to corporal temperature

In order to colonize human intestine, the microbial culture should be able to grow at 37°C. Thus, the 11 bacteria strains were cultured onto plates containing their respective culture media (described in section 2.1) at 30 °C for 24 h and successive growth in new culture media were performed with 0.5 °C increments in the temperature, each 24 h until 37°C. Based on these results, the *Leu. citreum*, *W. cibaria*, *C. bovis* and *B. safensis* strains all of them adapted to this conditions, then were selected for the following tests.

2.3 Human gastrointestinal tract simulation

The survival of selected strains to gastrointestinal conditions were evaluated in the human gastrointestinal model ARIS as described by Hernández-Moedano et al. (2014) with modifications. Each bacteria strain was separately evaluated using two different matrices: saline solution 0.9 % (w/v) and subsequently with a “food” containing 20 % (v/v) lipids (soybean oil), 15 % (w/v) protein (peptone), 45 % (w/v) carbohydrates (50 % sugar and 50% wheat flour) and 20 % (v/v) water completing the final volume of 200 mL. The mixture was cooked and boiled for 5 min.

For each assay, 8 to 9 log CFU/mL of bacteria strains were inoculated into 200 mL of each sterile solution (saline and “food”). The inoculum was grown for 24 h at 37 °C, centrifuged (3000g for 10 min at 4 °C), washed twice with sterile distilled water and resuspended in the solution. The solutions were introduced in the ARIS model at 37 °C with 50 rpm agitation. Stomach conditions were simulated by adding 0.33 g of pepsin into 200 mL of solution. The pH was adjusted to 2.0-2.5 with HCl. The time in stomach was 2 hr. The intestinal conditions were simulated by adding 1 g of bile and 0.19 g of pancreatin to the 200 mL of the mixture obtained from the stomach. The pH was adjusted to 5.0-5.5 with NaOH. The time in the intestine was 4 hr. Samples were taken for microbiological analysis at end of each condition (stomach and intestine). The sample were plated onto MRS, M17 and nutrient agar according to the bacteria strain and incubated for 24 h at 37°C. The bacteria recovered at the end of simulation of human gastrointestinal conditions containing saline were grown up to reach 8-9 log CFU / ml and re-inoculated in the system with “food”.

2.4 Antagonism towards *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*

The selected strains based on the survival in the human gastrointestinal tract simulation were subject to the antagonism test towards bacterial pathogens using Kirby-Bauer method according to Argyri et al. (2013) with some modifications. *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *S. Typhimurium* isolated from chicken, and *L. monocytogenes* were included as pathogens in inhibition assays. A total of 100 µl of each pathogenic bacteria was spread in their respective media. Two different population of pathogenic bacteria were tested, at population of 4 - 5 Log CFU/mL. Wells (5 mm) were made on each agar plate.

A total of 50 µl of each potential probiotic cultures (*W. cibaria* and *Leu. citreum*) at 9 log CFU/mL were inoculated into the wells. Tetracycline (0,2g/ml) was used as a reference. The plates were incubated at 37°C for 24h. The diameters of the inhibition halos were recorded in mm and classified according to Bujňáková and Kmeť (2012): (-) without inhibition, (+/-) there was inhibition, but not limiting clear zone of inhibition, (+) inhibiting 5 to 6.5 mm, and (++) for inhibition zones greater than 6.5mm. The assay was performed in triplicate.

2.5 Short-chain fatty acids analysis

The evaluation of short-chain fatty acids production was performed by HPLC according to Sanz et al. (2005) with modifications. The *W. cibaria* and *Leu. citreum* strains were grown separately on MRS broth overnight for 16 hr. The bacterial cultures were centrifuged (4°C / 10000 g) and the supernatants were filtered on nylon membrane (0.45µm diameter) and stored in amber vial until analysis.

Samples were analyzed using a liquid chromatography system ProStar (ProStar, model 230, and oven ProStar, model 510) equipped with automatic injection. A column A Minex HPX-87C (250X40mm) was operated at 70°C. Water was used as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The data were obtained using Galaxie Chromatography Data System software. Formic, propionic, acetic and butyric acids were evaluated. All samples were analyzed in triplicate, and individual compounds were identified based on the retention time of standards injected using the same conditions. The sample concentrations were determined using an external calibration method. Calibration curves were constructed by injecting different concentrations of the standards under the same conditions of the samples analyses and the areas obtained were plotted a linear

curve whose equation was used to estimate the concentration of the compounds in the sample.

2.6 Adhesion assay

2.6.1. Growth of HT-29 cells

The human colorectal adenocarcinoma cell line with epithelial morphology was grown in 5A McCoy's medium supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum soro, 200 mM L-glutamine, and 200 mM penicillin - streptomycin. The cells were propagated in 75cm² flasks, at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

2.6.2 Adhesion capacity HT-29 cells

Bacterial adhesion capacity to the HT-29 cell line was investigated for the *W. cibaria* and *Leu. citreum* isolates. The HT-29 cells were subcultivated (1×10^6 cell/mL) in 6 well tissue culture plates in 5A McCoy's with 10 % fetal bovine serum (without antibiotic) and grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ until to reach confluence and therefore are ready for an adherence assay. For adhesion assay, each well containing HT-29 cells was washed three times with DMEM:F12 and 5 ml of 5a McCoy's serum was added. The bacteria isolates were previously grown in MRS broth at 37°C for 24 hr. Approximately 1×10^7 CFU / mL of each bacterium were inoculated into the wells and incubated for 2 hr. Thus, the medium was removed and the wells were washed two times with sterile ultrapure water. For cell lysis, 500µl of 1% (v/v) Tween 80 was added to the wells and incubated for 10 min at room temperature. The obtained mixture was homogenized using a pipette and inoculated onto MRS agar plates,

incubated at 37°C for 24 hr, and colony counts were obtained. An assay without bacteria inoculation was evaluated as control. The assay was performed in triplicate.

2.7 Statistical analysis

The results of human gastrointestinal tract simulations, short-chain fatty acids production and bacterial inhibition test were subjected to analysis of variance and Scott-Knott test using SISVAR software (Ferreira, 2011).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Human gastrointestinal tract simulation

Passage of probiotics through the gastrointestinal tract (GIT) is a hazardous journey, with stress stages which may affect cell viability. The principal stress is that of shifting pH encountered in the stomach, resulting from gastric acid as well as bile (Corcoran et al., 2008). The ability of probiotic bacteria to survive the harsh environments encountered during processing and gastrointestinal transit has been a major factor in their selection criteria (Madureira et al., 2011). Studies evaluating probiotic survival during GIT transit have shown that the survival rate varies due to several factors, including the probiotic strain and physiologic growth state, as well as the food matrix (Bove et al., 2013; Marteau et al 1997). *B. safensis* and *C. bovis* were unable to survive the simulation test of the human gastrointestinal tract. No cells were recovered after simulation of stomach conditions. The table 1 shows the recovered population of *W. cibaria* and *Leu. citreum* mixed in saline solution and “food” after stomach and intestine conditions in the human gastrointestinal model ARIS. For all assays, the isolates were mixed to the matrix (saline solution and “food”) in a concentration of approximately 9 Log CFU/mL. According to Verna and Lucak (2010), commercially available probiotic formulations typically have at least 10^6 CFU, but they may range up to 10^{12} CFU. The recommendation is that a food should contain around 10^8 - 10^9 CFU in order to reach a population of viable cells between 10^6 - 10^7 CFU in the colon.

In the present work, the two strains were more susceptible ($p < 0.05$) to gastrointestinal condition when saline solution was used as matrix (recovered populations lower than 2.0 Log CFU/mL) than using “food” (higher than 6.0 Log CFU/mL) showing that the matrix is important for probiotic survival (Bove

et al, 2013). Regarding saline solution matrix, *Leu. citreum* was more resistant ($p < 0.05$) to stomach conditions than *W. cibaria* (1.46 Log CFU/mL and 0.49 Log CFU/mL, respectively). The next assay, using “food” matrix, there were no significant difference ($p < 0.05$) between the two strains in the gastrointestinal model. For the both different matrices, *Leu. citreum* kept similar ($p < 0.05$) populations in stomach and intestine simulations, while *W. cibaria* showed a slight decrease when mixed with “food”. The population decrease in intestinal conditions can be explained by the nature of the antimicrobial bile salts and its ability to dissolve bacterial membranes (Madureira et al., 2011). *Leu. citreum* seemed to be more resistant to gastrointestinal conditions than *W. cibaria*. However, both strains reached the recommended population in the intestine (around 6-7 Log CFU/mL) when administered with “food” matrices.

3.2 Antagonism activity of *Leu. citreum* and *W. cibaria* towards *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes*

The ability to inhibit the growth of foodborne pathogens in the gut is a key feature for successful probiotic, and have a beneficial effect (Salminen et al., 1996). The antagonistic activity of *W. cibaria* and *Leu. citreum* towards *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* was evaluated and are showed in Fig. 2 and Table 2. *Leu. citreum* showed highest ($p < 0.05$) inhibition towards *S. aureus* and *S. Typhimurium* strains while *W. cibaria* had highest ($p < 0.05$) activity towards *L. monocytogenes*. Species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* have been described to inhibit *Salmonella* spp., *S. aureus* and *L. monocytogenes* strains (Bujnaková and Kmet, 2012; Tejero-Sariñena et al., 2012; Touré et al., 2003). The lactic acid bacteria (including *W. cibaria* and *Leu. citreum*) display important inhibitory capacity by producing antimicrobial compounds such as bacteriocins, antibiotics, organic acids, hydrogen peroxide

(H₂O₂), carbon dioxide (CO₂), diacetyl (CH₃ CO)₂, as well as competition for nutrients or reduction of the redox potential (Holzapfel and Schillinger, 2002).

3.3 Short-chain fatty acids production by *Leu. citreum* and *W. cibaria*

The carbohydrates that were not digested in the small intestine are directed to the colon where they are fermented by the anaerobic microorganisms producing short-chain fatty acids (Scheppach, 1994). These acids are efficiently and rapidly absorbed through the epithelial cells of the colon, the colonocytes, stimulating sodium and water absorption, and exerting proliferative effect on these epithelial cells (Scheppach et al., 1995). The production of short-chain fatty acids (formic, propionic and butyric acids) by *W. cibaria* and *Leu. citreum* in MRS broth were evaluated and are shown in Table 3. *Leu. citreum* showed higher ($p < 0.05$) production of formic, propionic and butyric acids (0.10 g/L, 37.52 g/L and 2.65 g/L, respectively) than *W. cibaria* (0.09 g/L, 16.68 g/L and 1.26 g/L, respectively). Acetic acid was not detected. The three main short-chain fatty acids in the colon are acetic acid, propionic acid and butyric acid (Zhao et al., 2007). Propionate was the main acid produced by the two strains (higher than 16 g/L). The short-chain fatty acids are commonly related to antimicrobial activity. Propionic acid is routinely used in the food industry as antibacterial compound (Arora et al., 2011). The butyric acid has been applied to control *Salmonella* infections (Fernández-Rubio et al., 2009). Further, this acid is the preferred energy substrate for the mucosal cell, exhibits anti-inflammatory effect, is involved in the prevention and treatment of diseases of the colon, and protect against cancer formation (Scheppach et al., 1995). The high short-chain fatty acids production, e.g. propionate and butyrate, by *Leu. citreum* may be related to the high antagonistic activity of this bacteria towards the foodborne pathogens tested in this work.

3.4 Adhesion to HT-29 cells

The adhesion ability to HT-29 cells was evaluated for the *Leu. citreum* and *W. cibaria* and the results are presented in Fig. 3. *Leu. citreum* showed higher percentage of adhesion (approximately 25 %) than *W. cibaria* (approximately 0.5 %). Adhesion to intestinal epithelial cells is an important prerequisite for colonization of probiotic strains in the gastrointestinal tract, preventing their immediate elimination by peristalsis and providing a competitive advantage in this ecosystem (Freter, 1992). Turpin et al. (2012) found that LAB showed percentage of adhesion to HT-29 cells ranging from 0.6 to 30 %. According to these authors, *Lb. plantarum* WCFS1 was the most efficient to adhere HT-29 cells. Kumari et al. (2016) also found similar percentage (15.26 to 24.36 %) for other LAB strains (*Lb. brevis* PLA2, *Lb. paracasei* PLA8 and *L. brevis* PLA16) which were higher than the probiotic strain *Lb. casei* Shirota (7.81 %). *Leu. citreum* strains isolated from wheat bran sourdough did not show adhesion capacity to Caco-2 cells (Manini et al., 2016) while in the present study it showed high adhesion capacity (25.4 %) to HT-29 cells.

Although there are several studies describing probiotic properties of lactic acid bacteria, studies regarding species belonging to *Weissela* and *Leuconostoc* genera have been little exploited. According to the present results, *Leu. citreum* isolated from *tejuino* displayed important probiotic properties, e.g. tolerance to gastrointestinal condition, antagonistic activity towards foodborne pathogens, short-chain fatty acids and adhesion capacity to HT-29 cells. It is well known that spontaneously fermented foods may constitute a reservoir for lactic acid bacteria with potential probiotic characteristics (Mathara et al., 2008; Ramos et al., 2013; Takeda et al., 2011). However, there are few reports about *tejuino* microbiota and its probiotic potential has not been characterized. This

study provided a first insight relating probiotic property to *tejuino* strains. More studies regarded to safety and *in vivo* tests should be performed in order to establish a novel probiotic strain.

Acknowledgement

The authors thank C. C A A Santos for isolating and identification of bacteria strains from *tejuino* samples. This study was supported by CIATEJ (Mexico), and CNPq and CAPES (Brazil) which provided the scholarship.

REFERENCES

Argyri, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, v. 33, p. 282–291, 2013.

<http://dx.doi:10.1016/j.fm.2012.10.005>

Arora, T. et al. Propionate. Anti-obesity and satienty enhancing factor? *Appetite*, v. 56, p. 511 – 515, 2011.

<http://dx.doi:10.1016/j.appet.2011.01.016>

Arrizon, J. et al. In vitro prebiotic activity of fructans with different fructosyl linkage for symbiotics elaboration. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, v. 9, n. 3, p. 69-76, 2014.

Available from:

<http://crawl.prod.proquest.com.s3.amazonaws.com/fpcache/51f2a1823dbd643c4055924649412a7b.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJF7V7KNV2KKY2NUQ&Expires=1474397063&Signature=JNxaUhue%2B60OBbIxJzAGxWGTfrA%3D>

Bunjnáková, D.; Kmet, V. Funcional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Microbiologica*, v. 57, p. 263-267, 2012.

<http://dx.doi:10.1007/s12223-012-0121-x>

Charalampopoulos, D. et al. Application of cereals and cereal components in functional foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 131–141, 2002.

[http://dx.doi:10.1016/S0168-1605\(02\)00187-3](http://dx.doi:10.1016/S0168-1605(02)00187-3)

Da cruz, A. G. et al. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, v. 40, n. 8, p. 951–956, 2007.

<http://dx.doi:10.1016/j.foodres.2007.05.003>

Fernández-Rubio, C. et al. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella Enteritidis infection. *Poultry Science*, v. 88, p. 943-948, 2009.

<http://dx.doi: 10.3382/ps.2008-00484>

Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039 – 1042, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

Food And Agriculture Organization of the United Nations, (2001). World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, (p. 34). Available from: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>.

<http://crawl.prod.proquest.com.s3.amazonaws.com/fpcache/167e807be5fa34c0998ec434abbe70dd.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJF7V7KNV2KKY2NUQ&Expires=1457786745&Signature=5UNbwcx4WvGf%2FRTc3UJp0xk60sM%3D>

Granato, D. et al. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, n. 3, p. 292–302, 2010.

<http://dx.doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>

Heller, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 73, n. 2, p. 374–379, 2001.

<http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/374s.full.pdf+html>

Hernández-Moedano, A. et al. Changes in Intestinal Microorganisms Influenced by Agave Fructans in a Digestive Tract Simulator. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, v. 4, p. 19-25, 2014.

Available from:

https://www.researchgate.net/publication/269697087_Journal_of_Chemical_Biological_and_Physical_Sciences_An_International_Peer_Review_E-3_Journal_of_Sciences_Section_A_Food_Biotechnology_Changes_in_Intestinal_Microorganisms_Influenced_By_Agave_Fructans

Holzapfel, W.; Schilinger, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v. 32, p. 109-116, 2002.

[http://dx.doi:10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](http://dx.doi:10.1016/S0963-9969(01)00171-5)

Kabak, B.; Dobson, A. D. W. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 3, p. 248–260, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1080/10408390903569640>

Kumari, A. et al. Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. Isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using in vitro screening and principal component analysis. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 5, p. 2463–2475, 2016.

<http://dx.doi:10.1007/s13197-016-2231-y>

Long, J. Tecnología Alimentaria Prehispánica. *Revista eletrônica Estudos de Cultura Nahuatl*, v. 39, p. 127-136.

Available from:

<http://www.ejournal.unam.mx/ecn/ecnahuatl39/ECN039000006.pdf>

Madureira, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 44, n. 1, p. 465–470, 2011.

<http://dx.doi:10.1016/j.foodres.2010.09.010>

Manini, F. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *Food Science and Technology*, v. 66, p. 275-283, 2016.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>

Rivera-Espinoza, Y.; Gallardo-navarro, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2010.

<http://dx.doi:10.1016/j.fm.2008.06.008>

Salminen, S. et al. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 70, n. 2-4, p. 347–58, 1996.

Available from:

http://download.springer.com/static/pdf/847/art%253A10.1007%252F00395941.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2F00395941&token2=exp=1457791784~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F847%2Fart%25253A10.1007%25252F00395941.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252F00395941*~hmac=8fb3426df8e652656e76e8b352ab0f2c19edc301bd003828343d62a98e902b30

Sanz, M.L. et al. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 2914 – 2921, 2005.

<http://dx.doi:10.1021/jf0500684>

Scheppach, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *British Medical Journal*, p. 35–38, 1994.

http://dx.doi:10.1136/gut.35.1_Suppl.S35

Scheppach, W. et al. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, v. 31A, n. 7-8, p. 1077–80, 1995.

[http://dx.doi:10.1016/0959-8049\(95\)00165-F](http://dx.doi:10.1016/0959-8049(95)00165-F)

Sefa-Dedeh, S. et al. The microflora of fermented nixtamalized corn. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, n. 1, p. 97–102, 2004.

[http://dx.doi:10.1016/S0168-1605\(03\)00114-4](http://dx.doi:10.1016/S0168-1605(03)00114-4)

Tejero-Sariñena, S. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, v. 18, p. 530-538, 2012.

<http://dx.doi:10.1016/j.anaerobe.2012.08.004>

Touré, R. et al. Production of antibacterial substances by bifidobacteria isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 1058 - 1069, 2003.

<http://dx.doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02085.x>

Turpin, W. et al. Lactobacillaceae and Cell Adhesion: Genomic and Functional Screening. *Plos one*, v. 7, n. 5, p. 1-14, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038034>

Zhao, G. et al. Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 846, p. 202–208, 2007.

<http://dx.doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.027>

Figure captions

Fig. 1 Flow diagram of *tejuino* production

Fig. 2 Antagonistic activity of *Leu. citreum* (L), *W. cibaria* (W) and tetracycline (T) towards *S. aureus* at 5.95 Log CFU/mL (A), *S. Typhimurium* at 5.95 Log CFU/mL (B), *S. Typhimurium* from chicken at 5.61 Log CFU/mL (C), and *L. monocytogenes* at 5.25 Log CFU/mL (C). Clear zones around the wells represent halo of inhibition.

Fig. 3 Percentage of adhesion of *Leu. citreum* and *W. cibaria* to HT-29 cells.

Tables

Table 1 - Population (Log CFU/mL) of *W. cibaria* and *Leu. citreum* using saline solution and “food” as matrix after stomach and intestine simulation in the ARIS model.

	Saline solution		Simulated “food”	
	Stomach (Log CFU/mL)	Intestine (Log CFU/mL)	Stomach (Log CFU/mL)	Intestine (Log CFU/mL)
<i>W. cibaria</i>	0.49±0.85 ^{A,a}	0.50±0.92 ^{A,a}	7.40±0.04 ^{A,c}	6,21±0,11 ^{A,b}
<i>Leu. citreum</i>	1.86±0.03 ^{B,a}	1.26±1,09 ^{A,a}	7.16±0.05 ^{A,b}	7.74±0.08 ^{A,c}

Mean followed by the same capital letter in the columns and the same lower case in the lines did not differ significantly by Scott-Knott method (p<0.05).

Table 2 - Antagonistic activity of *W. cibaria* and *Leu. citreum* towards *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* strains evaluated by halo size (mm).

Bacteria (Log CFU/mL)	Tetracycline (mm)	<i>W. cibaria</i> (mm)	<i>Leu. citreum</i> (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>			
5.95	24.5 (++)	7.0 (++)	11.5 (++)
4.95	25.0 (++)	6.0 (+)	8.6 (++)
Mean	24.7 ^c (++)	6.5 ^a (+)	10.0 ^b (++)
<i>Salmonella</i>			
Typhimurium			
5.95	23.0 (++)	5.5 (+)	10.0 (++)
4.95	22.5 (++)	5.5 (+)	9.0 (++)
Mean	22.7 ^c (++)	5.5 ^a (+)	9.5 ^b (++)
<i>S. Typhimurium</i> from chicken			
5.61	24.5 (++)	6.0 (+)	12.0 (++)
4.61	25.0 (++)	5.5 (+)	11.5 (++)
Mean	24.7 ^c (++)	5.7 ^a (+)	11.7 ^b (++)
<i>Listeria</i>			
<i>monocytogenes</i>			
5.25	31.0 (++)	6.0 (+)	6.0 (+)
4.25	31.5 (++)	7.0 (++)	5.0 (+)
Mean	31.2 ^c (++)	6.5 ^b (+)	5.5 ^a (+)

Mean followed by the same letter in the lines did not differ significantly by Scott-Knott method (p<0.05).

(+) inhibiting 5 to 6.5 mm, and (++) for inhibition zones greater than 6.5mm

Table 3 - Short-chain fatty acids production (g/L) by *W. cibaria* and *Leu. citreum*.

	MRS (g/L)	<i>W. cibaria</i> (g/L)	<i>Leu. citreum</i> (g/L)
Formic acid	0.07±0.00 ^a	0.09±0.01 ^b	0.10±0.00 ^c
Propionic acid	0.11±0.00 ^a	16.68±0.66 ^b	37.52±0.64 ^c
Butiric acid	0.12±0.00 ^a	1.26±0.06 ^b	2.65±0.12 ^c

Mean followed by the same letter in the lines did not differ significantly by Scott-Knott method ($p < 0.05$).

Figures

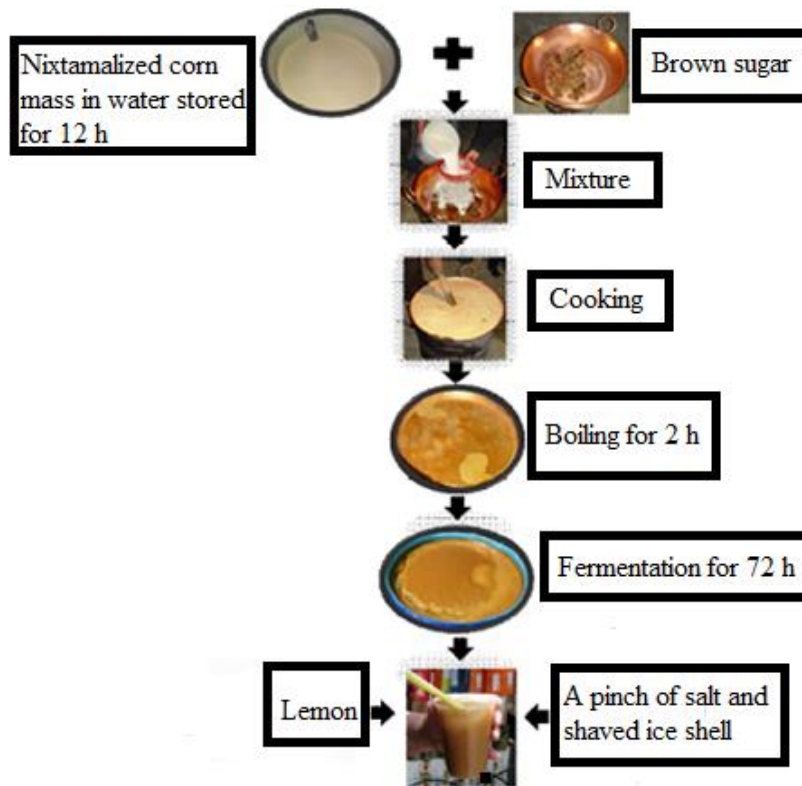


Fig. 1

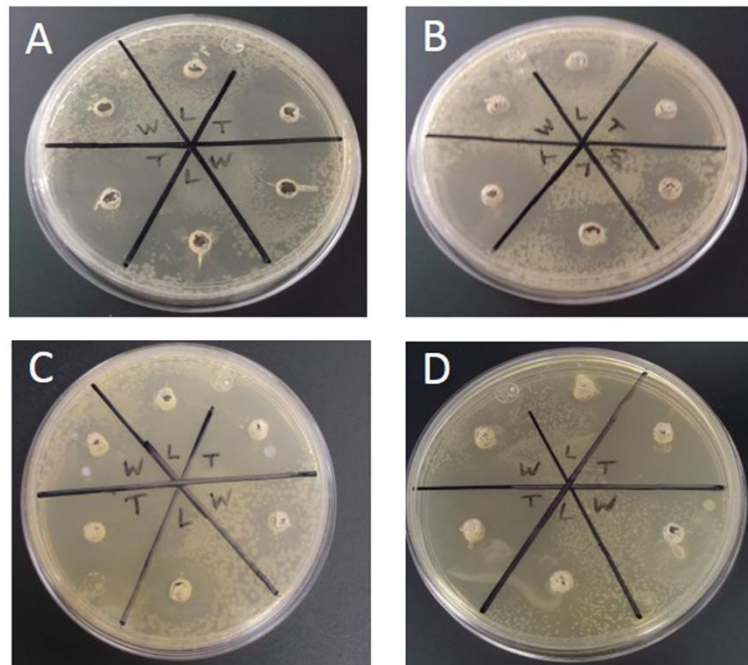


Fig. 2

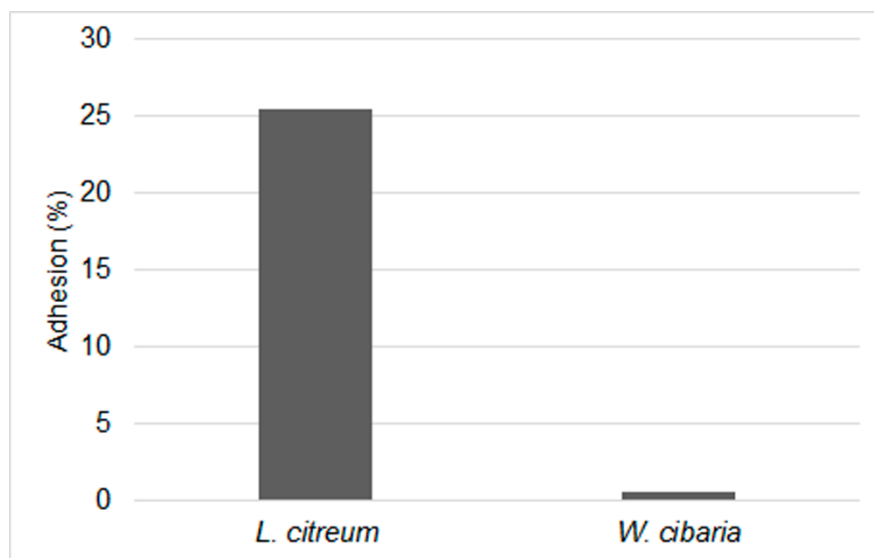


Fig. 3