UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

PURIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DE UMA
BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactobacillus sake* 2a
ISOLADO DE LINGÜIÇA FRESCAL

Cláudia Moreno Rosa

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof. Dr. Bernadette D. G. M. Franco.

São Paulo
2001

Ficha Catalográfica

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

Rosa, Cláudia Moreno
R788p Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina
produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de lingüiça
frescal / Cláudia Moreno Rosa. -- São Paulo, 2001.
98p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos
e Nutrição Experimental.

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

I. Microbiologia de alimentos 2. Proteína : Bioquímica
I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo,
orientador.

664.07 CDD

Cláudia Moreno Rosa

PURIFICAÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO DE UMA
BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactobacillus sake* 2a
ISOLADO DE LINGÜIÇA FRESCAL

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Prof. Dr. Bernadette D.G.M. Franco
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Mauro F. Leitão
1º. Examinador

Prof. Dr. Elaine Cristina de Martinis
2º. Examinador

Prof. Dr. Marina Baquerizo Martinez
3º. Examinador

Prof. Dr. Maria Teresa Destro
4º. Examinador

Prof. Dr. Thomas J. Montville
5º. Examinador

São Paulo, 17 de abril de 2001

As etapas de purificação e estudos do modo de ação da bacteriocina 2a foram realizados no Departamento de Food Science da Rutgers - The State University of New Jersey, New Jersey, EUA, com bolsa sanduiche da CAPES.

Aos meus pais, Pedro e Therezinha, pelo apoio eterno e incondicional.

Aos meus irmãos, Fernando e Karina, pela cumplicidade, por toda amizade e por estarem sempre próximos.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Bernadette D. G. M. Franco pela orientação, por todo o seu incentivo e especialmente pela confiança, carinho e importante apoio para a realização do meu doutorado sanduiche.

To Dr. Montville for giving me the opportunity to work in his lab, for all his attention and for teaching me how to be a better person and a professional.

Às professoras Maria Teresa Destro e Mariza Landgraf pelas importantes dicas, por todo o carinho, todo o incentivo e por todos os bons momentos que passamos juntas.

To Dr. Chikindas for teaching me and helping me with important things in the lab.

To Daniel for all his love and for being part of my life while I was in the USA.

Aos amigos Luciano, Denize, Wladimir, Emilieme, Viviane e Mariana pela companhia e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

To my friends Jie Lie, Jennifer Cleveland and Li Zhue for sharing problems and happiness and for making my life much better while I was far away home.

To my friends Jeannete, Celeste, Chris, Glynnis, Connie, Rutger for the great time that I had with you guys.

À Lúcia e Kátia pela paciência e pelo agradável convívio no laboratório.

À Maria, Andréia e Regina por me acolherem carinhosamente em suas casas num período difícil da minha vida.

À Raquel pela amizade, por me ajudar na parte final do trabalho, por todo alto astral contagiante e por também me acolher em sua casa.

À Denise pelo carinho e pelas boas risadas nesse final de tese.

À Lina, minha mais nova amiga, pela sua ajuda importante na parte final da tese.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Nelson Nascimento, funcionário do Estúdio Multimeios do Centro de Computação Eletrônica, pelas animações presentes na apresentação oral dessa tese.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

À CAPES pela bolsa Doutorado sanduiche.

À FAPESP pelo apoio financeiro para as pesquisas na área de bacteriocina desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Peptídios antimicrobianos.....	4
3.2 Bacteriocinas de bactérias láticas.....	5
3.2.1. Classificação.....	7
3.2.2. Biossíntese.....	9
3.2.2.1. Sistema de auto-indução da produção de bacteriocina.....	12
3.2.2.2. Sistema de imunidade do produtor de bacteriocina.....	13
3.2.3. Modo de ação.....	13
3.2.4. Aspectos legais do uso de bacteriocinas.....	18
3.2.5. Diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.....	21
3.2.6. Purificação.....	22
3.2.7. Espectro de atividade.....	24
3.2.8. Resistência ao calor, à enzimas e à variações de pH.....	25
3.2.9. Detecção e quantificação de bacteriocinas.....	26
3.3. Aplicação de bacteriocina no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos.....	28
3.3.1. Controle de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
3.3.2. Controle de outros microrganismos.....	30
3.3.3. Utilização de bacteriocinas em carnes.....	31
3.4. Resistência de <i>Listeria monocytogenes</i> à bacteriocina.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Origem e conservação das cepas utilizadas.....	36
4.1.1. Bactéria lática produtora de bacteriocina.....	36
4.1.2. Microrganismos	36

4.2. Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	37
4.2.1. Teste de antagonismo “spot on the lawn”	37
4.2.2. Técnica de difusão em poços.....	38
4.3. Quantificação da bacteriocina no sobrenadante de cultura de <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	39
4.4. Avaliação do efeito do meio de cultura e da temperatura de incubação na multiplicação e produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	40
4.5. Monitoramento da produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus sake</i> 2a ao longo da curva de crescimento.....	40
4.6. Determinação da resistência térmica da bacteriocina.....	41
4.7. Inibição da multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela bacteriocina 2a.....	41
4.8. Determinação da atividade bactericida ou bacteriostática da bacteriocina 2a.....	42
4.9. Determinação da ação da bacteriocina nas fases de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
4.10. Indução da produção de bacteriocina 2a.....	43
4.11. Purificação da bacteriocina.....	45
4.11.1. Determinação da concentração de bacteriocina e proteína total.....	45
4.11.2. Extração ácida.....	45
4.11.3. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....	46
4.11.4. HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	46
4.11.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina.....	47
4.12. Determinação do mecanismo de ação.....	48
4.12.1. Determinação das alterações dos níveis de ATP intracelular e extracelular.....	48
4.12.2. Determinação de $\Delta\Psi$ (potencial de membrana) na presença de bacteriocina 2 ^a	50

4.12.3. Determinação de Δ pH na presença da bacteriocina 2a.....	51
4.12.4. Determinação da ação sobre lipossomos.....	52
4.12.4.1. Extração de lipídios.....	52
4.12.4.2. Formação dos lipossomos.....	52
4.12.4.3. Determinação do efluxo de carboxifluoresceína dos lipossomos.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. Comparação de dois métodos de avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	54
5.2. Efeito da neutralização do pH na sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a....	55
5.3. Avaliação do efeito do meio de cultura e da temperatura de incubação na multiplicação e produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	56
5.4. Quantificação da bacteriocina no sobrenadante da cultura de <i>Lactobacillus sake</i> 2a.....	60
5.5. Monitoramento da produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus sake</i> 2a ao longo da curva de crescimento.....	61
5.6. Determinação da resistência térmica da bacteriocina.....	62
5.7. Determinação da influência da concentração de bacteriocina 2a na multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	64
5.8. Determinação da atividade bactericida ou bacteriostática da bacteriocina 2a.....	65
5.9. Determinação da ação da bacteriocina nas fases de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
5.10. Indução da produção de bacteriocina 2a.....	69
5.11. Purificação da bacteriocina 2a.....	70
5.12. A influência de bacteriocina 2a nos níveis de ATP intracelular e extracelular.....	75

5.13. Depleção do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) pela bacteriocina 2a.....	78
5.14. Depleção do gradiente de pH (ΔpH) pela bacteriocina 2a.....	80
5.15. A influência de bacteriocina 2a na permeabilidade dos lipossomos à carboxifluoresceína (CF).....	82
6. CONCLUSÃO.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das bacteriocinas.	8
Tabela 2	Exemplos de países que permitem o uso de nisina.	19
Tabela 3	Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.	22
Tabela 4	Origem das cepas testadas quanto à sensibilidade à bacteriocina 2a produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.	37
Tabela 5	Tamanho dos halos de inibição, utilizando os métodos "spot on the lawn" e difusão em poços para determinação da sensibilidade à bacteriocina 2a produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.	55
Tabela 6	Tamanho dos halos de inibição causados pelos sobrenadantes de <i>Lactobacillus sake</i> 2a neutralizados e não neutralizados.	56
Tabela 7	Produção de bacteriocina por <i>Lactobacillus sake</i> 2a em dois meios de cultura à diferentes temperaturas.	57
Tabela 8	Resistência térmica da bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.	63
Tabela 9	Indução da produção de bacteriocina por componentes adicionados ao meio de cultura MRS.	69
Tabela 10.	Purificação de bacteriocina 2a.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da biossíntese, produção, excreção e imunidade das bacteriocinas da classe 2a.	10
Figura 2	Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis à bacteriocina: "wedge-like" (A), "barrel-stave" (B).	16
Figura 3	Multiplicação celular de <i>Lactobacillus sake</i> 2a medido em absorbância nos meios APT e MRS em diferentes temperaturas.	58
Figura 4	Produção de bacteriocina 2a nos meios APT e MRS em diferentes temperaturas.	58
Figura 5	Quantificação da bacteriocina produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a pelo método de difusão em poços, utilizando <i>Listeria monocytogenes</i> como microrganismo indicador.	60
Figura 6	Multiplicação <i>Lactobacillus sake</i> 2a e produção de bacteriocina por em caldo MRS a 30° C durante 24 horas.	61
Figura 7	Redução da multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A por concentrações diferentes de bacteriocina 2a.	65

Figura 8	Multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> (medido em log UFC/ml e Absorbância 660 nm) em caldo TSBYE adicionado ou não de bacteriocina 2a produzida por <i>Lactobacillus sake</i> 2a.	66
Figura 9	Efeito da adição de bacteriocina em diferentes fases da multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> .	68
Figura 10	Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina.	75
Figura 11	Variação dos níveis de ATP total e externo nas células de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em função da ação da bacteriocina 2a e da nisina.	76
Figura 12	Efeito da bacteriocina 2a no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) das células de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.	78
Figura 13	Efeito da bacteriocina 2a no gradiente de pH (Δ pH) das células de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.	80
Figura 14	Efeito da bacteriocina 2a na redução do gradiente de pH (Δ pH) nas células de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.	81
Figura 15	Efeito da concentração de bacteriocina 2a no efluxo de carboxifluoresceína dos lipossomos de lipídios de membrana de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.	83

RESUMO

Uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* 2a, isolada de lingüiça frescal comercial foi purificada, caracterizada e seu modo de ação foi estudado com o objetivo de ser utilizada como bioconservante em alimentos. A bacteriocina apresentou efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes* em meio de cultura. Algumas cepas como *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria innocua* foram sensíveis, mas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157H7 foram resistentes a esta bacteriocina. O melhor meio de cultura para a sua produção foi o meio MRS à 25 ou 30°C durante a fase logarítmica de crescimento, obtendo-se 450 UA/ml de bacteriocina. Observou-se estabilidade a 121° C por 15 minutos. A bacteriocina foi purificada 71186 vezes pela técnica de adsorção/desorção de proteínas seguida de cromatografia de troca iônica Mono S, com rendimento de 3%. O peso molecular estimado foi de 3 a 6 kDa, determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina. Nos estudos do mecanismo de ação, a bacteriocina dissipou o potencial de membrana, o gradiente de pH e reduziu de 80% os níveis de ATP intracelular não alterando os níveis de ATP extracelular. Bacteriocina 2a, nas concentrações de 28, 60 e 114 UA/ml, também causou efluxo de 3, 30 e 100% de carboxifluoresceína dos lipossomos construídos com lipídios de membrana de *Listeria monocytogenes* Scott A, respectivamente. Os resultados indicam que a bacteriocina 2a atua formando poros na membrana citoplasmática de células sensíveis não necessitando de um receptor específico. Conclui-se também que a bacteriocina é um bioconservante em potencial, podendo ser usada no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Palavras chaves: bacteriocina, purificação, modo de ação, *Lactobacillus sake*.

ABSTRACT

Bacteriocin 2a produced by *Lactobacillus sake* 2a isolated from a Brazilian meat product (lingüiça) was purified, characterized and its mechanism of action was studied. The bacteriocin 2a showed bactericidal effect against *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* and *Listeria innocua* but it did not have an effect against *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157H7 strains. The highest concentration of bacteriocin 2a (450 AU/ml) was found in MRS medium incubated at 25 or 30°C and its production was at its maximum towards logarithmic growth. It was stable at 121° C for 15 minutes. Bacteriocin 2a was purified 71186 fold by salt extraction from *Lactobacillus sake* cells, followed by cation exchange chromatography using Mono S column. It has an estimated molecular mass of 3-6kDa. In mechanistic studies of action against *Listeria monocytogenes* Scott A, bacteriocin 2a dissipated the pH gradient, the $\Delta\Psi$ and reduced the ATP internal concentration by 80% with no detectable increase in the external ATP concentration. Bacteriocin 2a concentration of 28, 60 and 114 AU/ml, also mediated carboxyfluorescein efflux of 3, 30 and 100% from liposomes made from lipids extracted from *Listeria monocytogenes* Scott A, respectively. These data indicate that bacteriocin 2a forms pores in the cytoplasmatic membrane of target cells similarly Class II bacteriocins. In addition it can be use as a potential anti-microbial against *Listeria monocytogenes* in food.

Key words: bacteriocin, purification, mode of action, *Lactobacillus sake*.

1. INTRODUÇÃO.

Devido a mudanças no estilo de vida, mudanças culturais e aumento da idade média de vida da população, a procura por novos tipos de alimentos, como os de preparo fácil (convenientes), os naturais, ou seja, sem adição de conservantes químicos, os frescos e os nutritivos está aumentando (SILLS-LEVY, 1989). Como consequência, observa-se o crescimento do consumo de produtos refrigerados (REINECCIUS, 1989) e do interesse por novas tecnologias que aumentem o tempo de vida útil destes produtos, e também forneçam segurança microbiológica contra patógenos que se desenvolvem à temperatura de refrigeração, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Aeromonas hydrophila* (LECHOWICH, 1988; MOTLAGH et al., 1991). A utilização de atmosfera modificada para embalar carnes, por exemplo, cresceu muito nos últimos anos, assim como estudos de novos métodos de conservação biológica, baseados em microrganismos antagonistas e seus metabólitos (STILES e HASTINGS, 1991; McMULLEN e STILES, 1996; SCHILLINGER et al., 1996). Microrganismos antagonistas, como bactérias lácticas, que correspondem à microbiota dominante em carnes embaladas à vácuo ou em atmosfera modificada, são capazes de aumentar o tempo de vida útil do produto e de garantir a segurança do alimento com a inibição de microrganismos deteriorantes ou patogênicos (STILES e HASTING, 1991; McMULLEN e STILES, 1996). Devido à essas vantagens, como também à sua tradicional utilização na produção de

alimentos fermentados, as bactérias láticas vem sendo intensamente estudadas, permitindo a detecção da produção de substâncias promotoras de antibiose como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e principalmente bacteriocinas (MOTLAGH et al., 1991; DAVIDSON e HOOVER, 1993).

Com a emergência de patógenos alimentares psicrotróficos devido ao aumento do consumo de produtos refrigerados e o desejo dos consumidores por alimentos “naturais”, as bactérias láticas e seus metabólitos tornam-se excelentes bioconservantes (DAVIDSON e HOOVER, 1993).

Bacteriocinas de bactérias láticas, como a nisina, foram caracterizadas como potentes conservantes biológicos, sendo as responsáveis pelo controle do crescimento de bactérias patogênicas e bactérias deteriorantes nos alimentos. A nisina é a única bacteriocina com aplicação prática em alimentos industrializados. Muitas outras bacteriocinas produzidas por bactérias láticas estão sendo ainda caracterizadas (HECHARD et al., 1992; BRINK et al., 1994; JOOSTEN et al., 1996; KAISER e MONTVILLE, 1996; FRANZ et al., 1996).

Como as bactérias láticas aparecem naturalmente em quase todos os alimentos fermentados, suas bacteriocinas possivelmente serão facilmente aceitáveis como aditivos pelas autoridades e principalmente, pelos consumidores (GONZÁLEZ et al., 1996).

Recentemente, DE MARTINIS e FRANCO (1998) isolaram no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ USP uma cepa de *Lactobacillus sake* 2a, original de linguiça suína frescal comercial, produtora de bacteriocina capaz de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura e também em linguiça. Tendo em vista a importância da utilização de bacteriocinas como conservantes naturais de alimentos, pretendeu-se dar continuidade à pesquisa com a purificação e o estudo do modo de ação da bacteriocina produzida pela cultura isolada de *Lactobacillus sake* 2a e caracterizando-a quanto às suas propriedades físico-químicas.

2. OBJETIVOS.

- Caracterização da bacteriocina 2a quanto ao espectro de atividade, efeito bactericida ou bacteriostático e resistência térmica;
- Purificação da bacteriocina 2a produzida por *Lactobacillus sake* 2a;
- Estudo do modo de ação da bacteriocina 2a.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

3.1. Peptídios antimicrobianos.

Peptídios antimicrobianos são produzidos na natureza por bactérias, fungos, insetos, anfíbios, vertebrados e humanos. Foram encontrados e caracterizados até o momento cerca de 400 antimicrobianos diferentes. Há um grande interesse no estudo desses peptídios devido ao seu potencial terapêutico como agentes antimicrobianos e anti-câncer. A maioria dos peptídios tem como alvo a membrana citoplasmática das células. São catiônicos sob condições fisiológicas e assumem estrutura α hélice ou em alguns casos β folha as quais são importantes para a ação (CHEN et al., 1997).

As proteínas e os peptídios antimicrobianos ribossomicamente sintetizados e secretados por bactérias são denominados bacteriocinas (KAISER e MONTVILLE, 1993; NES, et al., 1996; CINTAS et al., 1997).

O estudo das bacteriocinas começou em 1925, com a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Os estudos estavam centrados apenas nos microrganismos Gram negativos, entretanto estas bactérias tinham associação negativa aos alimentos, ou seja, a sua presença não era desejável. Felizmente, o trabalho com colicinas permitiu o desenvolvimento de métodos de detecção e isolamento de outras classes de bacteriocinas (LEWUS, 1991).

3.2. Bacteriocinas de bactérias láticas

Bactérias láticas são cocos ou bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, fermentadores, produtores de ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos e que apresentam metabolismo e características fisiológicas semelhantes (AXELSSON, 1993).

Muitas espécies de bactérias láticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, tem apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo bactérias do mesmo gênero e/ou patógenos (McMULLEN e STILES, 1996).

Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos fermentados, acredita-se que as bactérias láticas proporcionam efeitos benéficos à saúde. Esta crença fortaleceu o “marketing” de muitos alimentos contendo culturas vivas de bactérias láticas, incluindo leite não fermentado, leite fermentado, iogurte, culturas secas, bebidas e doces. Esses alimentos contendo bactérias promotoras de benefícios a saúde são denominados de alimentos probióticos (RICHARDSON, 1996).

Nos últimos anos, além da utilização de bactérias láticas como probióticos, estuda-se também sua aplicação como conservantes em alimentos. Contudo, devido à grande importância econômica das bactérias láticas para a indústria de fermentação, os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, levando à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (DAVIDSON e HOOVER, 1993). A importância econômica das bactérias láticas na preservação de alimentos continua estimulando a exploração de bacteriocinas para o uso como conservantes de alimentos (LEWUS et al. 1991; BAREFOOT e NETTLES, 1993).

Até 1995, mais de 100 bacteriocinas de bactérias láticas já foram identificadas (HUIS int VELD, 1995). Elas são, em geral, pequenas

proteínas catiônicas, heterogêneas, hidrofóbicas, apresentando de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas, e que variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e as suas propriedades bioquímicas (KAISER e MONTVILLE, 1996; VERHEUL et al., 1997).

Segundo BRUNO e MONTVILLE (1993) e EIJSINK et al. (1998), as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas exibindo propriedades antimicrobianas contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor.

Algumas propriedades que caracterizam as bacteriocinas são mencionadas abaixo:

- podem apresentar efeito bactericida ou bacteriostático;
- apresentam pequeno ou amplo espectro de atuação;
- sua produção é mediada por plasmídio ou cromossomo;
- reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação na bactéria sensível;
- apresentam modo de ação similar, desestabilizando a força motriz protônica da membrana da célula sensível.

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina melhor caracterizada atualmente. Descoberta nos anos 20, é classificada como um lantibiótico por apresentar aminoácidos modificados como lantionina e β metil lantionina na molécula. A nisina é um peptídio com 34 aminoácidos, peso molecular de 3500 Da (monômero) que inibe a multiplicação de bactérias Gram positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*. É a única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização em alimentos (STEVENS et al., 1991; GARCERÁ et al., 1993; BAREFOOT e NETTLES, 1993; VERHEUL et al., 1997).

3.2.1. Classificação.

Segundo KLAENHAMMER (1993) as bacteriocinas de bactérias lácticas podem ser divididas em 4 classes, de acordo com as propriedades estruturais e físico-químicas. As bacteriocinas da classe I e II são as mais conhecidas, apresentando peso molecular inferior a 10 kDa e termoestabilidade. As classes III e IV não são bem conhecidas, mas apresentam peso molecular superior a 30 kDa, são termolábeis e podem ser proteínas hidrofílicas ou complexos de proteínas compostos por proteínas, fosfolípidios e/ou carboidratos (Tabela 1).

De acordo com o espectro de ação, bacteriocinas podem ser divididas em dois grupos (KLAENHAMMER, 1988). Um grupo inclui as bacteriocinas com espectro de ação estreito, ativas contra bactérias intimamente relacionadas pertencentes ao mesmo gênero, como diplocina, lactocina B, lactocina 27 e helveticina J ou contra outros gêneros bacterianos, como lactacina F. O segundo grupo consiste de bacteriocinas com espectro de ação relativamente amplo, como nisina, pediocina e leuconocina S. Nenhuma bacteriocina produzida por bactéria Gram positiva foi ativa contra bactéria Gram negativa. Isso pode ser explicado pelo seu modo de ação.

Tabela 1. Classificação das bacteriocinas.

Grupo	Características	Bacteriocinas (grupo representativo)
I	Lantibióticos, peptídios pequenos (<5KDa) contendo lantionina e β metil lantionina.	Nisina, lacticina 481, carnocina UI49, lactocina S.
II	Peptídios pequenos, termoestáveis e sintetizados na forma de precursores os quais saem processados depois da adesão de dois resíduos de glicina. São ativos contra <i>Listeria</i> spp e apresentam a sequência YGNGV comum na parte N-terminal da molécula.	Pediocina PA-1, sakacinas A e P, curvacina A, leucocina A.
IIb	Sistema de dois componentes, dois peptídios diferentes necessários para a formação de um complexo ativo.	Lactococcinas G e F, lactacina F.
IIc	Peptídios que requerem a presença de resíduos de cisteína na forma reduzida para atividade biológica da molécula.	Lactococcina B.
III	Moléculas grandes sensíveis ao calor.	Helveticinas J e V-1829, acidofilucina A, lactacinas A e B.
IV	Moléculas complexas constituídas por proteínas e uma ou mais moléculas como lipídios ou carboidratos.	Plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27, pediocina SJ 1.

Fonte: CHIKINDAS e MONTVILLE (b).

3.2.2. Biossíntese.

Os aspectos bioquímicos e genéticos envolvidos na biossíntese de bacteriocinas das classes I e II tem sido extensivamente investigados devido a sua conhecida atividade letal contra patógenos alimentares (ABEE et al., 1995; JACK et al., 1995).

A síntese de bacteriocinas envolve quatro diferentes genes. Esses genes são: o gene responsável pela produção do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina; o gene responsável pela produção da proteína que confere imunidade à célula produtora; o gene da produção das proteínas do transporte ABC que externalizam a bacteriocina e por fim, o gene que codifica uma proteína acessória, não pertencente ao transporte ABC, mas necessária para a excreção da bacteriocina. A função específica dessa proteína acessória não é conhecida (NES et al., 1996).

As bacteriocinas são sintetizadas primeiramente na forma de pré-peptídios ou pré-bacteriocinas biologicamente inativos. Esses pré-peptídios contêm uma sequência de 18 a 27 aminoácidos, apresentando 2 glicinas na região N-terminal. A função dessa sequência de aminoácidos é evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte de proteínas que envolve as proteínas do transporte ABC e uma proteína acessória (NES et al., 1996). Segundo MOLL et al. (1999), as duas glicinas presentes na sequência de aminoácidos são as responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, a sequência de aminoácidos é removida e a bacteriocina é excretada da célula (ENNAHAR et al., 2000). A Figura 1 mostra um esquema da produção de bacteriocinas da classe IIa.

Figura 1. Esquema da biossíntese, produção, excreção e imunidade das bacteriocinas da classe IIa (ENNAHAR et al., 2000).

Várias condições ambientais, incluindo pH, temperatura, aeração, concentração de açúcar, capacidade tamponante do meio e o tempo de incubação afetam a produção das bacteriocinas (LEWUS, 1991).

Segundo DESMAZEAUD (1997), a biossíntese das bacteriocinas é realizada no final da fase exponencial de crescimento bacteriano. Estas moléculas são excretadas no meio de cultura, podendo permanecer aderidas na célula de algumas bactérias, como é o caso da nisina. O fato da nisina iniciar sua síntese somente depois que metade da biomassa está formada sugere que sua biossíntese seja mediada por um sistema de multienzimas, que transforma uma pré-nisina ribossomal, composta de 57 aminoácidos, em nisina ativa, com 34 resíduos.

A maior produção de plantaricina S por *Lactobacillus plantarum* é obtida em fermentador com pH não regulado em meio MRS contendo 4% de NaCl, durante a fase logarítmica do crescimento bacteriano. Algumas

bacteriocinas apresentam comportamento diferente. Por exemplo, nessas mesmas condições, a plantaricina T é produzida somente na fase estacionária de crescimento (JIMENEZ-DIAZ et al., 1990).

A maior concentração de lactocina 705, produzida por *Lactobacillus casei* é obtida em meio MRS suplementado com Tween 80, glicose, triptona, extrato de levedura e numa faixa de pH 6,5 a 7,5 (VIGNOLO et al., 1995).

BRINK et al. (1994) observaram que a produção de acidocina B, bacteriocina produzida por *Lactobacillus acidophilus* M46, era oito vezes maior em caldo MRS cinco vezes concentrado em pH 5,5 do que em caldo MRS normal, sem controle do pH. A produção de acidocina B dependeu menos do crescimento bacteriano do que da presença de açúcar, aminoácidos e vitaminas, que foram essenciais para a biossíntese.

Segundo MORTVEDT-ABILDGAARD et al. (1995), a quantidade de lactocina S, bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake*, ativa no meio de cultura, depende da fase de crescimento da bactéria, do pH, da aeração do meio de cultura e da presença de etanol. Os autores observaram a maior atividade de bacteriocina no início da fase estacionária de crescimento da cultura em temperatura de 30°C. Quando *Lactobacillus sake* foi cultivado em fermentador em pH 5, houve produção de 2.000 a 3.000 unidades de bacteriocina por ml, o que representa um aumento de oito a dez vezes em relação à cultura fermentada sem controle de pH. A fermentação em pH 6 produziu menos do que 10% de bacteriocina. A adição de 1% de etanol aumentou de duas a quatro vezes a produção de lactocina S.

FRANZ et al. (1996) observaram que a composição do meio de cultura, especialmente a concentração de peptona e extrato de levedura, influenciou a produção de enterocina 900. Não houve produção de bacteriocina na ausência desses elementos no meio de cultura.

VIGNOLO (1995) concluiu que a produção máxima de bacteriocina pode ser obtida suplementando o meio de cultura com fatores

estimulantes do crescimento como açúcares, vitaminas e nitrogênio, como também controlando o pH.

3.2.2.1. Sistema de auto-indução da produção de bacteriocina.

Algumas bactérias lácticas apresentam sistema de auto-indução da produção de bacteriocina, mas como esse sistema é ativado ainda é uma questão sem respostas (ENNAHAR et al., 2000).

O lantibiótico nisina induz o seu próprio gene de expressão (De VOS, 1995). Esse caminho de auto indução é uma comunicação entre as células onde o peptídeo antimicrobiano serve como molécula sinalizadora (BOURRET et al., 1991; van der MEER et al., 1993).

As bacteriocinas da Classe II possuem um sistema de produção composto pelos três componentes mostrados na Figura 1: o fator de indução (Induction factor), o sensor histidina quinase (histidine protein kinase) e um regulador de respostas (response regulator) (KUIPERS et al., 1998; BOURRET et al., 1991; NES et al., 1996; KLEEREBEZEN et al., 1997).

Dois modelos idealizados podem explicar o mecanismo da síntese de bacteriocinas. No primeiro modelo, o sistema de auto-indução da produção de bacteriocina é iniciado pelo acúmulo de fator de indução que é produzido lentamente e em pequenas quantidades durante a multiplicação celular (EIJSSINK et al., 1996; NILSEN et al., 1998). O segundo modelo assume que a concentração do fator de indução durante a multiplicação celular permanece abaixo da necessária para auto-indução e que alterações de fatores extrínsecos como nutricionais ou físico químicos podem provocar um temporário aumento na produção do fator de indução e este aumento provocaria a auto-indução (AXELSSON et al., 1995; HÜHNE et al., 1996). O fator de indução se ligaria no sensor histidina quinase, causaria fosforilação

do resíduo de histidina e subseqüentemente fosforilação do regulador de resposta. Este, agora fosforilado, induziria a produção de bacteriocina e de fator de indução. Entretanto, esses modelos ainda não foram comprovados cientificamente (NES et al., 1996).

3.2.2.2. Sistema de imunidade do produtor de bacteriocina.

As bactérias produtoras de bacteriocina desenvolveram um sistema de proteção contra as suas próprias bacteriocinas. Esse sistema é denominado de imunidade. Cada bacteriocina apresenta a sua própria proteína de imunidade e esta é expressa concomitantemente com a bacteriocina. As proteínas de imunidade apresentam 51 a 150 aminoácidos e surpreendentemente, não apresentam homologia significativa entre si, enquanto as bacteriocinas apresentam 38 a 55% de similaridade (ABEE et al., 1995; AYMERICH et al., 1996). Essas proteínas permanecem intracelular e se ligam a proteínas de membrana da célula produtora impedindo a atuação da bacteriocina (Figura 1) (QUADRI et al., 1995; ENNAHAR, 2000).

3.2.3. Modo de ação.

Os estudos sobre o mecanismo de alguns lantibióticos e pequenos peptídeos termoestáveis revelam que a ação das bacteriocinas ocorre a nível de membrana citoplasmática (MONTVILLE e CHEN, 1998). As bacteriocinas são bactericidas ou bacteriostáticas, dependendo da sua concentração. Atuam permeabilizando as membranas de células sensíveis através da formação de poros, causando desbalanço iônico e efluxo de íons

fosfato. A consequência da formação de poros é a dissipação da força motriz protônica, que é envolvida diretamente com a síntese de ATP, fosforilação e transporte de proteínas e síntese e rotação dos flagelos (BRUNO e MONTVILLE, 1993; NICHOLLS e FERGUSON, 1992).

De acordo com a teoria de Mitchell (MONTVILLE e BRUNO, 1994), as bactérias mantêm um gradiente eletroquímico de prótons na membrana citoplasmática. Esse gradiente é responsável pela formação da força motriz protônica (PMF). A PMF é composta por um componente elétrico, o potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e um componente químico, o gradiente de pH (ΔpH), onde $\text{PMF} = \Delta\Psi - z\Delta\text{pH}$. A constante z converte o gradiente de pH a mV e equivale a 59 mV a 25°C (HAROLD, 1986).

Para a determinação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e do gradiente de pH (ΔpH) nas células, pode-se utilizar *probes* fluorescentes como [DiSC5(6)] e BCECF, respectivamente. O *probe* [DiSC5(6)] acumula-se dentro da bicamada lipídica das membranas celulares. Essa agregação do *probe* no interior da membrana causa uma diminuição da sua fluorescência. A perda do potencial de membrana faz com que o *probe* seja desagregado da membrana e assim ocorre o aumento de fluorescência. A valinomicina é utilizada nesses experimentos para confirmar a dissipação de $\Delta\Psi$, pois essa equilibra a concentração de íons potássio através da membrana, dissipando o seu potencial (Molecular probe).

BCECF é um *probe* derivado da carboxifluoresceína que aumenta a sua retenção no interior das células devido a presença de quatro cargas negativas a pH 7 e 8. Esse componente permeabiliza a membrana devido a presença de um ester em sua composição. A fluorescência do *probe* é dramaticamente reduzida em pH ácido. A nigericina é utilizada nesses experimentos para confirmar a dissipação de ΔpH , pois essa equilibra a concentração de íons K^+/H^+ através da membrana, dissipando o seu gradiente de pH (Molecular probe).

Nigericina e valinomicina são ionoforos usados para controlar os componentes da PMF pelo aumento da permeabilidade da membrana

celular. A nigericina dissipa gradientes de pH pela troca de íons K^+ por íons H^+ (HAROLD, 1986). Valinomicina, adicionada às células com potencial de membrana estabilizado, media a entrada de íons K^+ com consequente dissipação do potencial de membrana, embora o fluxo de K^+ é também influenciado por outra bomba de K^+ na membrana.

Com a dissipação da força motriz protônica, 98,9% de ATP é hidrolisado na tentativa de manutenção da mesma. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula através dos poros formados (BENNIK et al., 1998). Esse distúrbio primário talvez gere outras desordens, como lise celular (GARCERA et al., 1993).

A primeira fase na formação de poros pela bacteriocina envolve as interações eletrostáticas entre as cargas positivas e os resíduos polares da bacteriocina com os fosfolipídios aniônicos presentes na bicamada lipídica da membrana alvo (CHIKINDAS et al., 1993; ABEE et al., 1995). Nesta fase, a bacteriocina é sensível, por exemplo, à enzimas proteolíticas. A segunda fase é irreversível e envolve mudanças letais em cepas sensíveis à bacteriocina (DESMAZEAUD, 1997).

Estudos detalhados das bacteriocinas da classe I, que contém aminoácidos modificados (lantioninas), demonstram que esses componentes atuam no potencial de membrana independente da presença de um receptor (SAHL et al., 1987). A nisina não requer um receptor de membrana mas é mais ativa quando a membrana está energizada. Moléculas de ligação como lipídios II, presentes nas membranas de bactérias alvo, podem servir como receptores de membrana nas bactérias sensíveis (BREUKINK et al., 1999), aumentando a condutividade e a estabilidade de poros feitos por lantibióticos.

As bacteriocinas da classe IIa, que não contém aminoácidos modificados, interagem com receptores para haver a inserção na membrana citoplasmática dependendo do gradiente elétrico (KAISER e MONTVILLE, 1994). Entretanto, recentemente foi demonstrado que a bacteriocina pediocina PA-1 pode funcionar na ausência de um receptor de proteína. As bacteriocinas da classe IIa apresentam uma sequência comum de

aminoácidos YGNGV (Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina) (KLAENHAMMER, 1993; QUADRI et al., 1995), que pode ser responsável pela aderência às células sensíveis (MOLL et al., 1999; ENNAHAR et al., 2000).

Dois mecanismos alternativos foram propostos para descrever os passos detalhados envolvendo a permeabilidade da membrana por peptídios líticos com características anfipáticas (Figura 2). Esses mecanismos diferem quanto a forma de inserção da bacteriocina na membrana da célula alvo.

Figura 2. Modelos de formação de poros em membrana citoplasmática de células sensíveis à bacteriocina: “Wedge-like” (A), “Barrel-stave” (B).

No modelo “wedge-like” (Figura 2A), a formação de poro é causada por uma atuação local da bacteriocina na bicamada lipídica. Por ação da força motriz protônica (PMF), a porção C-terminal da bacteriocina é

puxada para dentro da membrana, inserindo-se profundamente, sendo possível sua total translocação através da membrana. A bacteriocina não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana (BRUNO e MONTVILLE, 1993).

No modelo “barrel stave” (Figura 2B), a bacteriocina insere-se na bicamada lipídica e os monômeros inseridos agregam-se lateralmente para formar o poro. Estudos utilizando *probes* fluorescentes mostram que a parte C-terminal da molécula da nisina penetra na porção hidrofóbica da membrana citoplasmática (MARTIN et al., 1996). Outros estudos indicam que a parte C-terminal é responsável pela ligação da molécula na membrana das células sensíveis e a penetração na camada lipídica é realizada pela parte N-terminal.

Segundo MOLL et al. (1999), bacteriocinas da classe I formam poros instáveis de acordo com o modelo “wedge-like”, enquanto bacteriocinas da Classe II aumentam a permeabilidade da membrana pela formação de um poro segundo o modelo “barrel stave”.

Experimento “in vitro”, observando a ação da nisina A em lipossomos e proteolipossomos, mostrou que a sua atividade depende da composição fosfolipídica. A quantidade de cargas negativas dos lipídios é importante para a sensibilidade das células à nisina. Sendo assim, é provável que as membranas de bactérias Gram negativas funcionem como barreiras para os antibióticos (RUHR e SAHL, 1985). Segundo DESMAZEAUD (1997), além das diferenças estruturais na membrana citoplasmática, bactérias Gram negativas possuem membrana externa, que constitui uma barreira física, dificultando a ligação das bacteriocinas na membrana plasmática. O acesso da bacteriocina à membrana citoplasmática é a chave para a atividade.

As Lactococcinas A e B, membros do grupo de pequenos peptídeos termoestáveis, também alteram a permeabilidade da membrana, mas de maneira diferente da nisina, já que sua ação e especificidade são mediadas por receptores. Entretanto, essas bacteriocinas formam poros na

membrana citoplasmática das células sensíveis na ausência da força motriz protônica (ABEE et al., 1994).

Lactacina F, uma bacteriocina da classe dos peptídios formadores de poro, causa imediata perda de K^+ celular, despolarização da membrana citoplasmática e hidrólise de ATP em *Enterococcus faecalis* (ABEE et al., 1994).

GONZÁLEZ et al. (1996) mostraram que a plantaricina C, uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* LL441, apresentou como alvo primário a membrana plasmática de células sensíveis, formando poros e permitindo assim a livre passagem de solutos do interior da célula para o ambiente.

A bacteriocina J46, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* formou poros na membrana citoplasmática das células na fase logarítmica, enquanto que as células na fase estacionária não foram afetadas (BARRENA-GONZALEZ et al., 1996).

3.2.4. Aspectos legais do uso de bacteriocinas.

Bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas tem atraído muito a atenção nos últimos anos devido a seu uso como conservantes de produtos fermentados. O motivo principal é o uso comercial do lantibiótico nisina, produzido por algumas cepas de *Lactococcus lactis*.

Estudos toxicológicos realizados com nisina demonstraram que a sua ingestão não tem efeitos tóxicos ao organismo humano, tendo sido reportada uma DL_{50} de 6950 mg/Kg, similar ao sal, quando administrada oralmente (MORENO, 1995). A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos do Codex Alimentarius, da FAO, como GRAS (Generally Recognized As Safe) e de uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo

de esporos e formação de toxina por *Clostridium botulinum* em queijos fundidos pasteurizados. Seu uso está aprovado em mais de 50 países (DELVES-BROUGHTON et al., 1996; MORENO, 1995). No Brasil, a nisina foi aprovada pela Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde (Portaria nº 6, 1990) para ser utilizada em preparados à base de queijos fundidos e em queijos fundidos numa dose máxima de 12,5 mg/Kg. A mesma dose de nisina foi liberada pelo DETEN (Departamento de Técnicas Normativas) do Ministério da Saúde para requeijão (Portaria nº 34/1992) e para queijo pasteurizado (Portaria nº 29/1996) (ABIA, 1996). Em 1998, a Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura e do Abastecimento, aprovou o uso de nisina em solução de 200 ppm (0,02%) para o emprego em superfícies externas de salsichas. A Tabela 2 apresenta alguns países que permitem o uso de nisina.

Tabela 2. Exemplos de países que permitem o uso de nisina.

Países	Alimento onde é permitido o uso de nisina	Nível máximo (UI/g)
Argentina	queijo processado	500
Austrália	queijo, queijo processado, tomates enlatados	sem limite
Bélgica	queijo	100
Brasil	queijo, vegetais enlatados, salsichas	500
EUA	queijo processado e pasteurizado	10000
França	queijo processado	sem limite
Holanda	queijo industrializado, queijo processado, queijo ralado	800
Inglaterra	Queijo, alimentos enlatados, creme	sem limite
Itália	Queijo	500
México	Sem descrição	500
Peru	Sem descrição	sem limite
Rússia	queijo processado dietético, vegetais enlatados	8000

Fonte: CHIKINDAS e MONTVILLE (b)

Nos Estados Unidos, a nisina tem sido utilizada na produção de queijos, inibindo a germinação de esporos de *Clostridium* e possível produção de toxina, como também inativando microrganismos termorresistentes deteriorantes em alimentos enlatados e aumentando o tempo de vida de prateleira de leite e derivados (STEVENS et al., 1991). DELVES-BROUGHTON (1990) mencionou a utilização de nisina em carnes, assim como a sua adição em bebidas alcóolicas como cerveja, vinho e aguardente de frutas para controlar o crescimento de bactérias deteriorantes.

As bacteriocinas são geralmente inativadas por enzimas proteolíticas, incluindo as de origem pancreática (tripsina e α -quimiotripsina). A sensibilidade das bacteriocinas de *Lactococcus* à degradação por enzimas proteolíticas é bastante interessante quanto à segurança alimentar, uma vez que a ingestão de bacteriocinas não promove alterações na ecologia do trato gastrointestinal, não apresentando dessa forma, os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos. Contudo, estudos toxicológicos são necessários para a aprovação do uso dos novos tipos de bacteriocinas em alimentos (MORENO, 1995).

De acordo com os regulamentos do FDA, antimicrobianos naturais usados como conservantes de alimentos tem que ser produzidos por microrganismos GRAS. Como muitas espécies de bactérias lácticas tem o status "GRAS", essas tem sido extensamente estudadas para a produção de bacteriocinas. O FDA e o Food Safety and Inspection Service (FSIS) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos confirmam a segurança, a eficiência e o uso de novos conservantes, incluindo as bacteriocinas (POST, 1996).

Assumido-se que bactérias lácticas ocorrem naturalmente em muitos alimentos fermentados, suas bacteriocinas serão facilmente aceitas pelas autoridades da saúde e pelos consumidores (GONZALEZ, et al. 1996). Bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium* tem sido empregadas em alimentos por séculos, especialmente em leite e produtos de carne (PARENTE e RICCIARDI,

1999). Além da atividade antimicrobiana do ácido láctico, H_2O_2 e diacetil, essas bactérias também produzem bacteriocinas. Essas bacteriocinas inibem crescimento de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium*.

3.2.5. Diferenças entre bacteriocinas de bactérias lácticas e antibióticos.

Tecnicamente, antibióticos são metabólitos secundários sintetizados por enzimas, que apresentam aplicação clínica. No caso das bacteriocinas, estas são proteínas ribossomicamente sintetizadas, produzidas na fase log de crescimento microbiano, não apresentam até o momento aplicação clínica e não apresentam nenhuma alteração da microbiota do trato digestivo, pois estas são digeridas por enzimas como tripsina e pepsina encontradas no trato digestivo. Se as bacteriocinas forem consideradas antibióticos, não poderão ser usadas em alimentos, pois o uso de antibióticos em alimentos é ilegal (HOOVER e STEENSON, 1993).

Antibióticos e bacteriocinas tem diferentes mecanismos de ação. Quando a nisina é combinada com alguns antibióticos, pode ocorrer sinergismo antimicrobiano. Os mecanismos de resistência à nisina e aos antibióticos são diferentes. Células resistentes à antibióticos são sensíveis à nisina e células resistentes à nisina são sensíveis à antibióticos (MONTVILLE, comunicação pessoal).

A Tabela 3 apresenta as principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.

Tabela. 3. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.

Características	Antibióticos	Bacteriocinas de bactérias láticas
Modo de produção	Sintetizados por enzimas	Síntese Ribossomal
Fase de produção	Metabolismo secundário	Metabolismo primário
Mecanismo de ação	Diversos	Membrana citoplasmática
Aplicação clínica	Sim	Não
Resistência microbiana	Foram encontradas cepas resistentes	Foram encontradas cepas resistentes
Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano	Não são digeridos	São digeridas
Espectro	Amplo principalmente	Limitado principalmente
Microrganismo produtor	Bolores principalmente	Bactéria láticas

3.2.6. Purificação.

Um dos primeiros passos para a purificação das bacteriocinas é a sua concentração a partir de sobrenadantes de cultura. O vácuo tem sido usado para a concentração de bacteriocinas, mas com esse processo, componentes presentes no sobrenadante de cultura também são concentrados. Outros métodos, como precipitação por sulfato de amônio, por ácidos inorgânicos (HASTING et al, 1991), ou por ácidos orgânicos (UPRETI e HINS DILL, 1973) podem concentrar as bacteriocinas e eliminar componentes indesejáveis. Esses procedimentos são geralmente os passos

iniciais a serem tomados em uma purificação, pois podem ser aplicados a grandes volumes de cultura.

Para a segunda etapa da purificação, os métodos de escolha são alguns tipos de cromatografia como exclusão por tamanho (filtração em gel), adsorção (troca iônica) e/ou interação hidrofóbica (fase reversa) Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) tem sido usada para atingir alta pureza nas amostras (VENENA et al., 1997). Cromatografia de afinidade (SUÁREZ et al, 1997) e métodos de separação de proteínas pelo ponto isoelétrico (isoelectric focusing) (VENENA et al., 1997) podem alcançar resultados excelentes em termos de rendimento e purificação, mas não podem ser aplicados para a purificação em grande escala.

Protocolos baseados na adsorção e desorção de bacteriocinas das células produtoras tem sido desenvolvidos para a purificação em grande escala. Bacteriocinas podem ser adsorvidas às células produtoras a pH 6–6,5, seguido de desorção a pH 2 e solução de NaCl 1mM (BHUNIA et al., 1991; METIVIER et al., 2000). Esse procedimento foi efetivo para pediocina ACh, nisina, sakacina A e leuconocina Lcm1 (YANG et al., 1992).

Outros componentes como sílica podem ser usados para adsorver bacteriocinas presentes nos caldos fermentados (JANES et al., 1998).

Em 1981, BORDIER desenvolveu um procedimento de purificação baseado na recuperação de proteínas por Triton X 114 e adsorção/desorção utilizando uma resina de troca-iônica. Após a adição de 2% do detergente Triton X-114 no sobrenadante de cultura, divercina V41 foi acumulada na fase de detergente, em seguida adsorvida em resina de troca iônica, lavada com NaCl 0,7mol/l e recuperada com 95% de pureza. Esse procedimento também foi utilizado por METIVIER et al. (2000) na purificação de bacteriocinas de *Carnobacterium divergens*.

Todas as etapas de um processo de purificação devem ser monitoradas quanto à atividade e à pureza das amostras. A eletroforese SDS-PAGE é comumente empregada para essa finalidade. Segundo SHAGGER e von JAGOW (1987), gel de poliacrilamida 16,5% utilizando

tricina foi o melhor gel para a separação de proteínas de 1 a 100kDa por eletroforese.

3.2.7. Espectro de atividade.

O espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias láticas é limitado às bactérias Gram positivas. No entanto as bactérias Gram negativas quando tratadas de modo a alterar membrana externa (adição de EDTA por exemplo) também podem ser susceptíveis. As bactérias láticas produzem dois tipos de bacteriocinas. O primeiro tipo afeta somente as espécies intimamente relacionadas, enquanto que o segundo atua contra várias bactérias Gram positivas (KLAENHAMMER, 1988).

A nisina, como outras bacteriocinas, possui atividade antimicrobiana contra um número limitado de bactérias, não inibindo bactérias Gram negativas, bolores e leveduras (DELVES-BROUGHTON, 1990). Algumas espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* e também *Listeria monocytogenes* são inibidas pela nisina. No caso de *Listeria*, a atividade antimicrobiana das bacteriocinas pode ser consequência das inúmeras semelhanças com as bactérias láticas, o que levou WILKINSON e JONES (1977) sugerirem que o gênero *Listeria* fosse incluído na família *Lactobacillaceae*.

Salivaricina B, bacteriocina produzida por *Lactobacillus salivarius* M7, apresentou espectro de ação bem amplo, inibindo o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus faecalis* e muitos *Lactobacillus* (BRINK et al., 1994). Outra bacteriocina, descrita pelos mesmos autores, produzida por *Lactobacillus acidophilus* M46 e denominada acidocina B inibiu algumas espécies de *Lactobacillus* e *Clostridium sporogenes*.

Segundo FRANZ et al. (1996), a enterocina 900 produzida por *Enterococcus faecium* BFE 900 foi antagonista a *Lactobacillus sake*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus* e *Listeria* spp., incluindo *Listeria monocytogenes*.

3.2.8. Resistência ao calor, à enzimas e à variações de pH.

A acidocina B produzida por *Lactobacillus acidophilus* M46 foi estável a 80°C durante 20 minutos (BRINK et al., 1994). SAMELIS et al. (1994) reportaram que uma cepa de *Lactobacillus sake* produziu uma bacteriocina (sakacina B) estável a 100°C durante 20 minutos. Essa bacteriocina permaneceu ativa depois do tratamento com catalase, mas foi destruída quando tratada com enzimas proteolíticas.

Enterococcus faecium BFE 900, isolado de azeitonas pretas, produziu uma bacteriocina denominada enterocina 900 que era sensível à pepsina, α -quimiotripsina, proteinase K e tripsina. Algumas enzimas não proteolíticas, como catalase e α -amilase, não inativaram a bacteriocina. Enterocina 900 mostrou-se estável à temperatura de 121°C durante 15 minutos e não perdeu sua atividade em valores de pH de 2 a 10, com melhor atividade em pH 6 (FRANZ et al., 1996).

MORTVEDT-ABILDGAARD et al. (1995) observaram que lactocina S, produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake*, aparentemente não afetava as células sensíveis quando os valores de pH estavam acima de 6.

Segundo TRAMER (1964) *apud* DELVES-BROUGHTON, (1990), a nisina manteve a atividade após autoclavagem a 115,6° C quando em pH 2, mas houve uma perda de 40% da atividade em pH 5, perdendo mais de 90% da atividade em pH 6,8.

Bacteriocinas são sensíveis a pelo menos uma enzima proteolítica. Alguns autores distinguem a nisina de outras bacteriocinas devido a α -quimiotripsina ser a única protease que a inativa. Entretanto, esta afirmação deve ser considerada com cautela, pois outras enzimas como pronases e proteinase K são ativas contra nisina. Algumas bacteriocinas como helveticina J, produzida por *Lactobacillus helveticus*, e plantaricina B, produzida por *Lactobacillus plantarum*, são inibidas por outras enzimas como lipases, amilase e fosfolipases. Isto indica que o sítio de atividade de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas é complexo (DESMAZEAUD, 1997).

Várias bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são suficientemente resistentes ao calor para que sua atividade, por exemplo, não seja alterada pela pasteurização. Bacteriocinas de bactérias lácticas são geralmente estáveis a pH ácido e neutro, indicando que essas substâncias são bem adaptadas ao ambiente de produção, com exceção da nisina e lactostrepcinas (DESMAZEAUD, 1997).

3.2.9. Detecção e quantificação de bacteriocinas.

Há muitas técnicas para detectar a produção de bacteriocinas pelas bactérias lácticas. Os métodos utilizados para determinar a atividade das bacteriocinas são derivados dos utilizados para detecção de antibióticos (LEWUS e MONTVILLE, 1991).

A maioria dos métodos é baseada na inibição do crescimento do microrganismo sensível através da difusão das bacteriocinas em meio de cultura sólido ou semi-sólido. Os métodos mais utilizados denominam-se “flip streak”, “spot on the lawn” e “well diffusion”. No método “flip streak” (KEKESSY e PIGUET, 1970), a cepa produtora de bacteriocina é estriada em ágar, e após a incubação adequada, o organismo indicador, ou seja, o

microrganismo sensível, é estriado perpendicularmente à cepa produtora de bacteriocina no inverso do ágar. No método “spot on the lawn”, a cepa produtora de bacteriocina é inoculada em ágar, incubada e em seguida o microrganismo indicador é semeado numa sobrecamada de ágar (HARRIS et al., 1989). O método mais direto denomina-se “well diffusion”, ou seja, difusão em poços. Neste método, o sobrenadante da cultura produtora de bacteriocina é adicionado à poços perfurados em ágar semeado com o microrganismo indicador (LEWUS e MONTVILLE, 1991).

Métodos de diluição crítica são utilizados para quantificar a atividade da bacteriocina através da determinação de “unidades arbitrárias”. O título da diluição da bacteriocina é definido como a recíproca da maior diluição de bacteriocina capaz de inibir a cepa indicadora (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997).

LEWUS e MONTVILLE (1991) utilizaram três técnicas e dois meios de cultura para estudar a produção e a sensibilidade de bacteriocina produzida por 22 cepas de bactéria láctica. Os autores relataram que a técnica “spot on the lawn” foi mais reprodutível, rápida e de fácil interpretação, quando comparada aos métodos de antagonismo simultâneo “flip streak” e a de difusão em poços. O método “flip streak” não apresentou praticidade, enquanto o método de difusão em poços apresentou um grande número de resultados negativos. Como notado anteriormente, o meio MRS não foi satisfatório para a utilização em técnicas de detecção de bacteriocinas devido ao alto nível de ácido produzido pelo metabolismo da glicose, levando à formação de zonas de inibição em todas as colônias. Isto foi evitado substituindo-se o meio MRS por ágar tripticase de soja suplementado com 0,5% de extrato de levedura.

Além de excluir o efeito inibitório causado pela produção de ácido láctico através da utilização de meio de cultura sem açúcar, nos estudos das bacteriocinas também é importante excluir o efeito do peróxido de hidrogênio, que é obtido pela utilização de enzima catalase. Outra maneira de inibir a ação do peróxido é fazer a incubação em anaerobiose (LEWUS, 1991; SCHILLINGER e LÜCKE, 1989).

Quanto à medida da atividade das bacteriocinas, não existem padrões aceitos de maneira unânime. Apenas a nisina possui uma unidade internacionalmente reconhecida: uma Grama de nisina comercial contém 25 mg de nisina pura e, por definição, contém 10^6 unidades internacionais (UI). A atividade de uma bacteriocina pode ser estimada a partir do tamanho das zonas de inibição produzidas em teste de difusão. A atividade é relatada como o raio ou o diâmetro da zona de inibição (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997).

O termo “unidades arbitrárias” (UA) é geralmente o mais utilizado em medidas quantitativas da atividade de bacteriocinas. Geralmente, UAs são determinadas através do teste de diluições seriadas da amostra na proporção de 1:2. A recíproca da mais alta diluição capaz de produzir inibição é definida como o número de UA. Esse número pode ser dividido pelo volume da amostra, expressando-se o resultado como UA/ml (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997).

Há grande variação entre os pesquisadores nos ensaios para a determinação de UA quanto à escolha do organismo indicador, da técnica de detecção, do meio de cultura, etc., tornando impossível a comparação das unidades arbitrárias relatadas. Entretanto, com a utilização de uma concentração conhecida de nisina sob as mesmas condições experimentais, obtém-se uma razão aproximada entre UA e a equivalente UI de nisina (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997).

3.3. Aplicação de bacteriocinas no controle do desenvolvimento microbiano em alimentos.

3.3.1. Controle de *Listeria monocytogenes*.

Embora bacteriocinas apresentem espectro de ação relativamente estreito se comparado a alguns conservadores químicos, estas podem ser usadas como parte da tecnologia de obstáculos e assim trabalhar sinergisticamente com outras substâncias, aumentando a atividade inibidora contra uma grande variedade de microrganismos.

Uma importante aplicação das bacteriocinas seria no controle do patógeno *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram positivo, não esporogênico, anaeróbio facultativo, que apresenta mobilidade em temperaturas de 20-25° C, embora a temperatura ideal de crescimento seja 30-37° C. Pode sobreviver numa faixa de temperatura de 1-45° C, tornando-se um risco para segurança de alimentos refrigerados (LEWUS, 1991).

É um microrganismo patogênico conhecido pelos microbiologistas há muito tempo, na área de veterinária, porém, tornou-se um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos na década de 80, devido a diversos surtos de listeriose humana, epidemiologicamente ligados à alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Listeria monocytogenes está amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada em plantas processadoras de alimentos, principalmente as processadoras de carne, como também nas mãos dos processadores e como biofilme aderido aos equipamentos (MURIANA, 1996).

A comprovação da transmissão de *Listeria monocytogenes* por alimentos apresenta um importante papel na etiologia das listerioses humanas, o que tem causado grande preocupação nas indústrias

alimentícias. A síndrome clínica associada à listeriose é semelhante à causada pelo vírus influenza, podendo evoluir para meningo-encefalite, septicemia e endocardite, podendo ainda causar aborto e outras complicações em mulheres grávidas (RODRIGUEZ et al., 1994).

Listeriose ocorre com certa frequência em indivíduos recém nascidos, mulheres grávidas, seus fetos, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Nestes pacientes, a listeriose alcança taxa de mortalidade de 13 a 34%. Devido a esta alta taxa, o custo de cada caso de listeriose é maior e envolve mais pessoas do que qualquer outro patógeno veiculado por alimentos. Nos Estados Unidos, *Listeria* sp está associada à cerca de 39% dos casos de morte decorrentes de doenças veiculadas por alimentos (RODRIGUEZ et al., 1994). A incidência da doença tem aumentado devido ao aumento do consumo de produtos refrigerados.

3.3.2. Controle de outros microrganismos.

Além da inibição de *Listeria monocytogenes*, as bacteriocinas de bactérias lácticas podem inibir a multiplicação de outros microrganismos. THOMAS e WIMPENNY (1996) mostraram que nisina atua sinergisticamente com NaCl quando usada contra determinadas cepas de *Staphylococcus aureus*. A nisina e outras bacteriocinas de bactérias Gram positivas, quando usadas em combinação com certos componentes, podem atuar contra bactérias Gram negativas. STEVENS et al. (1991) observaram que nisina, usada em combinação com determinados agentes quelantes, como EDTA, foi capaz de inibir *Salmonella*.

Além de ser adicionada `a alimentos na forma livre, a nisina pode ser adsorvida em várias superfícies diferentes, permitindo assim o seu uso em embalagens. Com o controle da liberação da bacteriocina

imobilizada nas embalagens, pode-se prolongar o seu efeito e aumentar o tempo de vida útil do produto (BOWER et al., 1995a; BOWER et al., 1995b).

3.3.3. Utilização de bacteriocinas em carnes.

Carne é um excelente meio para o crescimento bacteriano. Em ambiente aeróbio, a microbiota psicrotrófica de carnes resfriadas é predominantemente composta de bactérias Gram negativas causadoras de putrefação, enquanto que em ambiente anaeróbio, como embalagens à vácuo ou em atmosfera modificada com alto nível de dióxido de carbono, a microflora psicrotrófica é composta de bactérias láticas não putrefativas (STILES e HASTING, 1991).

Na indústria da carne, as bactérias láticas são muito utilizadas como culturas iniciadoras de fermentação, contribuindo no sabor e na conservação dos produtos. Em relação à lingüiça, a matéria prima já está naturalmente contaminada e um importante papel das bactérias láticas é inibir a flora natural competidora, incluindo bactérias deteriorantes e ocasionalmente patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (LEWUS et al., 1991). Na maioria dos casos, a formação de ácidos acético e lático pelo metabolismo de carboidratos, resultando em diminuição de pH, é o responsável pelo efeito antagonista. Entretanto, em muitos alimentos, níveis altos de ácidos são indesejáveis, pois podem comprometer o sabor (MCMULLEN e STILES, 1996). Nestes alimentos é muito importante que a inibição seja feita através de bacteriocinas. As bactérias láticas produtoras de bacteriocina, isoladas originalmente de carnes e produtos cárneos, são provavelmente as melhores candidatas para melhorar a segurança microbiológica dos alimentos, pois essas são bem adaptadas às condições ambientais da carne e provavelmente sejam mais competitivas que as bactérias láticas de outras origens. É necessário um

grande número de células para que a produção de bacteriocina seja suficiente para inibir o crescimento das cepas sensíveis. Bacteriocinas de *Lactobacillus sake* são muito utilizadas na inibição de *Listeria monocytogenes*, porém a atuação delas em carnes deve ser melhor avaliada, já que as condições de atividade das bacteriocinas em substratos sólidos como carne são diferentes das encontradas em meio líquido, como o meio MRS (SCHILLINGER e LÜCKE, 1989).

As bactérias láticas e suas bacteriocinas em carne tem sido utilizadas com sucesso como antimicrobianos, no controle do crescimento de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (MCMULLEN e STILES, 1996).

Segundo STILES e HASTINGS (1991), a utilização da nisina na conservação de carnes é limitada, pois a nisina não é ativa contra todos os microrganismos deteriorantes e patogênicos associados à carne. Além disso, o microrganismo produtor de nisina, *Lactococcus lactis*, é mesófilo, e portanto não se multiplica em carnes refrigeradas. Mas o principal problema no uso de nisina em carnes é a baixa solubilidade no pH da carne.

A nisina foi mais ativa em alimentos contendo baixa concentração de lipídios comparada com os de alta concentração. Outros componentes no alimento que diminuem a atividade da nisina são os emulsificantes. Estudos recentes indicam que esta diminuição da atividade está relacionada ao modo de ação, já que a nisina atua na membrana citoplasmática, que é fosfolipídica. Não se sabe ainda como os lipídios e os emulsificantes interagem com a nisina e afetam a sua atividade (JUNG et al., 1992).

A baixa atuação da nisina como bioconservante em carnes resultou na pesquisa de outras bactérias láticas produtoras de bacteriocinas que apresentem crescimento em carnes refrigeradas (McMULLEN e STILES, 1996).

SCHILLINGER et al. (1991) observaram o comportamento de *Listeria monocytogenes* em carne moída, notando que o patógeno era inibido por uma cepa de *Lactobacillus sake* Lb 706. A bacteriocina produzida

por esta cepa mostrou-se aparentemente efetiva em carne, entretanto o efeito observado foi menor em carne do que em meio de cultura. A presença de *Lactobacillus sake* Lb 706 na carne de porco utilizada para produção de lingüiça tipo “mettwurst” inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* durante cinco dias após a sua produção, reduzindo em um ciclo logarítmico o número das células de *Listeria monocytogenes* no produto.

STILES e HASTINGS (1991) relataram que a presença de uma cepa de *Lactobacillus sake* produtora de sakacina A inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes* durante estocagem de carne a 8°C por seis dias, enquanto que nas amostras de carne sem adição desse microrganismo, as células de *Listeria* aumentaram em três ciclos logarítmicos. Os autores concluíram que há fatores limitantes na utilização de *Lactobacillus sake* para conservação de carnes, como por exemplo: o efeito inibitório sobre *Listeria monocytogenes* é menor em carne do que em meio de cultura; a bacteriocina produzida é lentamente inativada com o tempo; o espectro de atividade da sakacina A não inclui todos os patógenos ou bactérias deteriorantes em carne.

DE MARTINIS e FRANCO (1998) observaram a inibição de *Listeria monocytogenes* por *L. sake* 2a não apenas em meio de cultura, mas também em lingüiça frescal. As lingüiças mantidas durante quatro semanas refrigeradas a 15 e 8-10°C apresentaram contagem de *Listeria monocytogenes* seis ciclos logarítmicos menor nas amostras co-inoculadas com *L. sake* em relação ao controle inoculado apenas com o patógeno. A inibição ocorreu nas lingüiças com e sem nitrito, não se observando diferença nessa condição por até três semanas de incubação. Na quarta semana houve um aumento de cerca de cem vezes na população de listérias nas amostras sem nitrito. A bacteriocina produzida por *L. sake* 2a apresentou modo de ação bactericida sobre *L. monocytogenes* DP-L1044, quando em meio de cultura mas nos experimentos com produto cárneo observou-se efeito bacteriostático apenas.

Estudos recentes da utilização de bacteriocinas ou bactérias láticas bacteriocinogênicas no controle de microrganismos deteriorantes e

patógenos em carne concluíram que muitas dificuldades devem ser superadas antes que as bacteriocinas e as bactérias láticas possam ser utilizadas comercialmente. Estudos das propriedades químicas, físicas, modo de ação e a relação entre função e estrutura das bacteriocinas são o primeiro passo para a sua utilização como bioconservantes em carnes (STILE e HASTINGS, 1991).

Outra consideração importante é o efeito dos organismos produtores de bacteriocina nas características sensoriais de carnes durante a estocagem. Das bactérias encontradas em carne de porco embaladas em atmosfera modificada, aproximadamente 30% são bactérias láticas produtoras de bacteriocina, entretanto nem todas elas são inócuas, podendo produzir metabólitos que causam alterações indesejáveis de “flavor” em carne estocada em anaerobiose (MCMULLEN e STILES, 1996).

3.4. Resistência de *Listeria monocytogenes* à bacteriocina.

O surgimento de mutantes resistentes à nisina ocorre quando células sensíveis são expostas de nisina. Resistência entre cepas de *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* já foi observada. HARRIS et al. (1991) detectaram uma cepa mutante de *Listeria monocytogenes* capaz de sobreviver em concentrações de 5 a 10 vezes mais altas de nisina em relação à população original.

Há um consenso de que a membrana bacteriana é o sítio de ação da nisina. Assim, provavelmente as cepas mutantes desenvolveram alterações na sua membrana citoplasmática. VERHEUL et al. (1997) isolaram um mutante da cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A 12 vezes mais resistente à nisina do que a cepa original. Comparações da composição química da membrana das cepas resistentes e sensíveis

apresentaram diferenças na quantidade de difosfatidilglicerol, sendo que a cepa resistente à nisina apresentou menor quantidade deste componente. Segundo os autores, a nisina penetra mais profundamente em monocamadas lipídicas de difosfatidilglicerol do que de outros lipídios, donde se conclui que o mecanismo de resistência à nisina em *Listeria monocytogenes* é atribuída à redução do componente difosfatidilglicerol na membrana citoplasmática.

Segundo DE MARTINIS et al. (1997), a utilização de nisina como único conservador em alimento não seria a melhor opção, pois múltiplas exposições de um patógeno à nisina aumentariam significativamente a probabilidade de geração de mutantes resistentes estáveis. Entretanto, a utilização de nisina, em conjunto com outros obstáculos comumente utilizados na conservação de alimentos, reduziria a frequência da ocorrência de resistentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Origem e conservação das cepas utilizadas.

4.1.1. Bactéria láctica produtora de bacteriocina.

Foi utilizada cultura de *Lactobacillus sake* 2a isolada de lingüiça frescal no laboratório de microbiologia da FCF/USP (DE MARTINIS e FRANCO, 1998). Alíquotas de 1ml de cultura foram mantidas a -80°C em caldo MRS formulado para conter 0,5% de glicose (Merck), adicionado de 20% de glicerol. Antes da utilização, as culturas foram reativadas em caldo MRS (Oxoid), com incubação a 30° C por 18 a 24 horas.

4.1.2. Microrganismos.

Alíquotas de 1ml das culturas apresentadas na Tabela 2 foram armazenadas a -80°C em caldo tripticase de soja (Difco) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) e quando necessárias foram reativadas em

TSBYE e em seguida mantidas sob refrigeração em ágar tripticase de soja (TSA, Difco) inclinado, adicionado de 0,6% de extrato de levedura.

Tabela 4. Origem das cepas testadas quanto à sensibilidade à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

Cepas	Origem	Referências
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lingüiça	DE MARTINIS et al. (1998)
<i>Listeria welshimeri</i>	carne de frango	RODRIGUES (1997)
<i>Listeria seeligeri</i>	carne de frango	RODRIGUES (1997)
<i>Listeria innocua</i>	carne de frango	RODRIGUES (1997)
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A		FOEDING et al. (1992)
<i>Staphylococcus aureus</i>	leite cru	SILVA et al. (1998)
<i>E. coli</i> O157:H7	hamburger	O'BRIEN et al. (1993)

4.2. Avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

A sensibilidade dos microrganismos apresentados na Tabela 2 à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a foi avaliada pelo teste de antagonismo simultâneo “spot on the lawn” (LEWUS e MONTVILLE, 1991) e pelo método de difusão em poços (HARRIS et al., 1989).

4.2.1. Teste de antagonismo “spot on the lawn”.

Conforme o teste “spot on the lawn” modificado, proposto por LEWUS e MONTVILLE (1991), 2 µl de uma cultura de *Lactobacillus sake* 2a, obtida em caldo De Man, Rogosa e Sharp a 30° C durante 18 a 24 horas, foram inoculados em placas de Petri contendo ágar tripticase de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). As placas foram incubadas em anaerobiose à 30° C durante 24 horas e em seguida adicionou-se às placas cerca de 8 ml de BHI (Difco) contendo 1% de ágar e 1% de cultura indicadora, obtida em caldo TSBYE a 30° C por 18 horas. A seguir, as placas foram incubadas à 30° C durante 24 horas. O antagonismo foi detectado pela formação de um halo de inibição do crescimento da cultura indicadora ao redor da cultura de *Lactobacillus sake* 2a produtora de bacteriocina.

4.2.2. Técnica de difusão em poços.

Segundo a técnica de difusão em poços preconizada por HARRIS et al. (1989), poços de aproximadamente 5 mm foram perfurados em placas de Petri contendo TSAYE ou BHI adicionado de 1% de ágar, ambos inoculados com 1% de cultura indicadora 18h, incubadas em TSBYE à 30°C. Nestes poços foram adicionados 35 µl de sobrenadante da cultura de *Lactobacillus sake* 2a, produtora de bacteriocina, proveniente de caldo MRS incubado a 30° C durante 18 horas, centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5417C), neutralizado (pH 7,0) com NaOH 10N e esterilizado por filtração em membrana GVWP 01300 0,22 µm (Millipore). O antagonismo foi detectado pela formação de um halo de inibição do

crescimento da cultura indicadora ao redor da cultura de *Lactobacillus sake* 2a produtora de bacteriocina.

4.3. Quantificação da bacteriocina no sobrenadante de cultura de *Lactobacillus sake* 2a.

A quantificação da bacteriocina em sobrenadante de cultura de *Lactobacillus sake* 2a foi realizada utilizando-se a técnica da diluição crítica.

Conforme MAYR-HARTING et al. (1972), o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus sake* 2a, produtora de bacteriocina, proveniente de caldo MRS incubado a 30° C durante 18 horas, foi centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5417C), neutralizado (pH 7,0) com NaOH 10 N e esterilizado por filtração em membrana GVWP 01300 0,22 µm (Millipore). A seguir, o sobrenadante ativo da cultura produtora foi diluído sucessivamente na proporção de 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18 e 1:20 em solução tampão fosfato de sódio 10 mM a pH 7,0, utilizando-se placas de microtitulação. Logo após, 35 µl de cada diluição foram depositados nos poços perfurados no ágar BHI contendo 1% de *Listeria monocytogenes*.

Após 24 horas, os meios foram analisados quanto a formação de halos de inibição. O título da bacteriocina na preparação original, expresso em unidades arbitrárias de bacteriocina por mililitro (UA/ml), foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição.

4.4. Avaliação do efeito do meio de cultura e da temperatura de incubação na multiplicação e produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a.

A cultura de *Lactobacillus sake* 2a, proveniente de caldo MRS incubado a 30° C durante 18 horas, foi inoculada na proporção de 1% em 10 ml de caldo Bacto APT (Difco) ou MRS (Difco) e incubada a 11° C, 25° C, 30° C, 37° C e 42° C durante 24 horas. Após a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm, a produção de bacteriocina foi determinada pelo teste de diluição crítica, utilizando-se *Listeria monocytogenes* como cultura indicadora (MAYR-HARTING et al., 1972). Neste método, os sobrenadantes ativos da cultura produtora foram diluídos e analisados quanto a atividade de bacteriocina conforme mencionado no item 4.3.

4.5. Monitoramento da produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a ao longo da curva de crescimento.

Lactobacillus sake 2a foi inoculado a 1% em erlenmeyer contendo 100ml de caldo MRS (OXOID) e incubado a 30° C durante 24 horas. À intervalos regulares de 1 hora, alíquotas foram retiradas para a determinação da absorbância a 600 nm e avaliação da produção da bacteriocina pelo método de difusão em poços (item 2.3), utilizando-se *Listeria monocytogenes* como cepa indicadora.

4.6. Determinação da resistência térmica da bacteriocina.

Cem μl da cultura de *Lactobacillus sake* 2a foram inoculados em 10 ml de MRS, com incubação a 30° C durante 24 horas. A cultura foi centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5417C) e 1 ml dos sobrenadantes foram divididos em tubos eppendorf. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 60° C por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, 98° C por 5, 10, 15 e 20 minutos e em autoclave a 121° C por 15 minutos. Decorrido o tempo de aquecimento, os tubos foram colocados imediatamente em banho de gelo e a seguir o sobrenadante foi avaliado quanto a atividade da bacteriocina pelo teste de difusão em poços (item 2.2.2) utilizando-se *Listeria monocytogenes* como cepa indicadora.

4.7. Inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A pela bacteriocina 2a.

A relação entre a concentração de bacteriocina 2a e multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A foi determinada. Cento e oitenta μl de uma cultura de 10^3 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* Scott A foram colocados em microplacas (96 poçinhos) e 20 μl de diferentes concentrações de bacteriocina (11, 22, 45, 90, 180 AU/ml) foram adicionados. Essas placas foram incubadas a 30°C por 24h e a multiplicação foi monitorada por um espectrofotômetro leitor de microplacas (MRX TC Revelation, Dymex) a 600nm, com leituras a cada 60 min.

4.8. Determinação da atividade bactericida ou bacteriostática da bacteriocina 2a.

Para determinar se o efeito da bacteriocina em células de *Listeria monocytogenes* Scott A era bactericida com lise ou não das células ou bacteriostático, 20ml de caldo TSBYE foram inoculados com 200 µl de uma cultura de *Listeria monocytogenes* obtida em caldo TSBYE incubado à 30°C, padronizada para apresentar leitura de absorvância entre 0,8 e 1,0, a 600nm. Após 6 horas de incubação a 30°C, adicionou-se a esta cultura sobrenadante ativo de *Lactobacillus sake* 2a, obtido como mencionado no item 2.3, para uma concentração final de $4,57 \times 10^2$ UA/ml de bacteriocina. A intervalos de 2 horas, durante 12 horas e após 24 horas, alíquotas dessa cultura foram retiradas para determinação da absorvância a 600nm (multiplicação e integridade celular) e para contagem de células viáveis de *Listeria monocytogenes* Scott A, realizada utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade. O controle consistiu de 20 ml de caldo TSBYE inoculado com 200 µl da cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A sem adição de sobrenadante de *Lactobacillus sake* 2a.

4.9. Determinação da ação da bacteriocina nas fases de crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Cinco erlenmeyers com 20 ml de caldo TSBYE foram inoculados com 1% de cultura de *Listeria monocytogenes* em fase estacionária de crescimento, obtida em TSBYE à 30° C durante 18 horas.

Os erlenmeyers foram inoculados com sobrenadante ativo de *Lactobacillus sake* 2a numa concentração final de $1,52 \times 10^2$ UA/ml em

diferentes tempos, correspondentes à diferentes fases de crescimento celular de *Listeria monocytogenes* e incubados a 30° C durante 24 horas.

Os tempos de inoculação de sobrenadante ativo de *Lactobacillus sake* 2a nos erlenmeyers foram:

Erlenmeyer 1: controle (sem adição de sobrenadante ativo à cultura de *Listeria monocytogenes*)

Erlenmeyer 2: adição após 3 horas de incubação da cultura de *L. monocytogenes*.

Erlenmeyer 3: adição após 5 horas de incubação da cultura de *L. monocytogenes*.

Erlenmeyer 4: adição após 7 horas de incubação da cultura de *L. monocytogenes*.

Nos tempos de 3, 5 e 7 horas, a cultura de *Listeria monocytogenes* estava em diferentes pontos da fase exponencial de crescimento.

A intervalos de 2 horas, durante 12 horas, alíquotas foram retiradas para determinação da absorbância a 600nm.

4.10. Indução da produção de bacteriocina 2a.

Uma série de tubos de ensaio contendo 4 ml de caldo MRS foram inoculados com 1% de cultura de *Lactobacillus sake* 2a, a qual havia perdido a capacidade produtora de bacteriocina, em fase estacionária de crescimento, obtida em MRS a 30° C. Foram adicionados a esses tubos diferentes componentes na tentativa de induzir a produção de bacteriocina. Após incubação a 30°C por 18h, os tubos foram centrifugados e os

sobrenadantes das culturas dos diferentes tratamentos foram testados quanto a presença de bacteriocina, utilizando-se a técnica de difusão em ágar. Os diferentes tratamentos e os controles do experimento foram os seguintes;

- ✓ Tratamento 1: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a
- ✓ Tratamento 2: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a + 10 µl de solução de bacteriocina ($4,5 \times 10^2$ UA/ml)
- ✓ Tratamento 3: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A (10^7 UFC/ml)
- ✓ Tratamento 4: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A + 10 µl de solução de bacteriocina
- ✓ Tratamento 5: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A inativa (100°C por 15 minutos)
- ✓ Tratamento 6: caldo MRS + 1% *Lactobacillus sake* 2a + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A inativa (100°C por 15 minutos)+ 10 µl de solução de bacteriocina
- ✓ Controle 1. caldo MRS + 10 µl de solução de bacteriocina
- ✓ Controle 2. caldo MRS + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A
- ✓ Controle 3. caldo MRS + 10 µl de cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A inativa (100°C por 15 minutos)

4.11. Purificação da bacteriocina.

4.11.1 Determinação da concentração de bacteriocina e proteína total.

O monitoramento da atividade da bacteriocina 2a foi realizado utilizando-se o método de difusão em ágar, descrito no item 2.2.2.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BioRad), utilizando-se a técnica de detecção para concentrações baixas de proteínas, descrito pelo fabricante. Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão. O teste foi realizado em microplacas e a concentração de proteínas foi determinada usando um espectrofotômetro leitor de microplacas MRX TC Revelation (Dymex) a 570 nm

4.11.2.Extração ácida.

Seis litros de caldo MRS foram inoculados com 1% (v/v) de uma cultura 18 h de *Lactobacillus sake* 2a obtida em caldo MRS. Depois de 16 a 18h a 30°C, a cultura foi aquecida a 70°C por 30 min para inativar as proteases e as células, e o pH foi ajustado para 5,5 com NaOH 2M (Yang et al. 1992). A cultura foi centrifugada a 11,000 x g por 40 min. O sobrenadante foi coletado para determinar a quantidade de bacteriocina não adsorvida nas células. O precipitado foi lavado duas vezes com tampão 2-(N-morfolino)-etanosulfonato (MES) 5 mM pH 6.5 e suspenso em 300 ml de solução NaCl 100 mM ajustado a pH 2 com ácido fosfórico 5%. Depois de 24h a 4°C, a amostra foi centrifugada a 11,000 x g por 40 min e o sobrenadante foi dialisado em água destilada durante 24h, utilizando-se membrana com poros de 2 kDa. O sobrenadante dialisado foi testado quanto a atividade de

bacteriocina. Não foi detectada bacteriocina 2a após extração com ácido fosfórico 5%. Dessa forma, sabendo-se que as células funcionam como uma resina de troca iônica, utilizou-se extração com 300 ml de solução de NaCl 1M. Depois de 24h a 4°C, a amostra foi centrifugada a 11,000 x g por 40 min e o sobrenadante foi dialisado em água destilada durante 24h, utilizando-se membrana com poros de 2 kDa. O sobrenadante dialisado foi testado quanto a atividade de bacteriocina, e em seguida concentrado (centrífuga à Vácuo, Speedvac).

4.11.3. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

Após extração ácida, a amostra concentrada (30ml) foi aplicada em coluna de troca iônica catiônica (Mono S HR 5/5 column; volume de 1 ml: Pharmacia Biotech) a 4°C e analisadas por FPLC (Pharmacia Biotech). A coluna foi equilibrada em tampão MES 50 mM pH 6.5 e a bacteriocina foi eluída com NaCl em um gradiente de concentração de 0 a 1M, a uma velocidade de 0,5 ml/min. Trinta e duas frações foram coletadas e testadas quanto a atividade da bacteriocina. As frações coletadas da coluna que apresentaram atividade antagonística foram reunidas e aplicadas novamente na coluna Mono S, utilizando-se um gradiente de NaCl até 0,5 M.

4.11.4. HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Frações apresentando as concentrações mais altas de bacteriocina foram misturadas, dialisadas, concentradas, suspensas em 100 µl de água para HPLC (Sigma) e analisadas por HPLC (Varian 9012)

utilizando uma coluna Zorbax Rx C18, 9.4 mm x 25 cm. A coluna foi equilibrada com solvente A (0,05% de ácido fórmico) a uma velocidade de 1ml/min. A bacteriocina foi eluída linearmente aumentando-se a concentração do solvente B (acetonitrile 100%). Nos primeiros 70 min, o gradiente foi 0-60% de solvente B; a seguir foi aplicado solvente B num gradiente de 60-80% por 10min; e por fim aplicou-se durante 10 min, 80-100% de solvente B. As frações foram coletadas e testadas quanto a atividade de bacteriocina.

4.11.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida -tricina.

Amostras provenientes de cada etapa da purificação foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (acrilamida 16,5 %, 10 x 10 cm) contendo tricina, conforme descrito por SHAGGER e von JAGOW (1987). Uma corrente elétrica de 30V foi aplicada a esse gel nos primeiros 30 min, e então foram aplicados 100 V por mais 2 h. Os géis foram corados com prata (Bio RAD laboratories), de acordo com KAISER e MONTVILLE (1996). Foram utilizados dois padrões de peso molecular, um pré corado apresentando proteínas de 6,4 a 201 kDa (Kaleidoscope Prestained standard, Bio Rad) e outro com pesos moleculares de 1,42 a 26,6 kDa (Bio Rad).

A natureza antimicrobiana da banda corada foi verificada utilizando-se um método de detecção semelhante a aquele descrito por BHUNIA et al. (1987). Depois do passo inicial de fixação, o gel foi cortado ao meio. Ambas as partes continham os mesmos marcadores e as mesmas amostras. Uma das partes do gel foi corada. A outra metade foi lavada em água deionizada durante 24 h e uma camada de ágar semeada com *Listeria monocytogenes* Scott A foi depositado sobre o gel. A placa foi incubada por 18h a 30°C.

A formação de um halo de inibição do crescimento da cultura indicadora sensível indicou a posição correta da banda de bacteriocina quando comparada com o gel corado.

4.12. Determinação do Mecanismo de ação.

4.12.1. Determinação das alterações dos níveis de ATP intracelular e extracelular.

Os níveis de ATP total e externo foram determinados pela medida de bioluminescência da amostra utilizando um método descrito por GUIHARD et al. (1993) e CHEN e MONTVILLE (1995). Para as medidas de luminescência utilizou-se o kit de detecção de ATP (Adenosine 5'triphosphate (ATP) bioluminescent assay kit, Sigma). Esse kit é baseado na reação de luciferina e luciferase e foi usado de acordo com procedimentos recomendados pelo fabricante. Os níveis de ATP foram calculados e expressos em nanomoles por miligramas de células (peso seco). Os experimentos foram realizados em um luminômetro (Lumac/3M Biocounter M2010). Os níveis de ATP interno foram calculados subtraindo-se o nível de ATP externo do nível de ATP total.

Uma cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A em caldo TSBYE na fase log de crescimento apresentando aproximadamente 0,7 de absorbância a 660 nm foi centrifugada e o precipitado foi suspenso em 2ml de tampão 2-(N-morfolino)-etanosulfonato (MES) 50mM pH 6.5 contendo 1% de glicose e KCl 10 mM (células energizadas). Essa suspensão foi utilizada para determinar as alterações dos níveis de ATP interno e externo causadas pela bacteriocina 2a em relação ao tempo.

Para a medida de ATP total, 20 µl da suspensão de células energizadas foram adicionados de 80 µl de dimetilsulfoxido, homogeneizados por 30s em agitador vortex e diluídos 50 vezes através da adição de 4,9 ml de água deionizada refrigerada.

Para a determinação de ATP externo, 20 µl da suspensão de células energizadas foram adicionados de 5ml de tampão MES 50mM pH 6,5. As determinações dos níveis de ATP total e externo foram realizadas ao mesmo tempo. Cem µl da amostra preparada para a medida dos níveis de ATP total e externo foram colocados separadamente em dois tubos de ensaio de 5ml contendo 100 µl do reagente do Kit (Sigma) para determinar as alterações dos níveis de ATP. Após 3 min em temperatura ambiente, a luminescência proveniente das amostras foi medida utilizando-se um luminômetro (Lumac/3M Biocounter M2010). A medida de luminescência foi repetida a cada 3 min até que o nível de ATP total atingisse um platô. Imediatamente a seguir, à 200 µl da suspensão de células energizadas adicionou-se 200 µl de bacteriocina para concentração final de 900 UA/ml e os níveis de ATP total e externo dessa suspensão foram medidos nos tempos 15 (representando o tempo zero da adição de bacteriocina 2a), 17, 27 e 37 minutos.

A relação entre a intensidade de luz e a concentração de ATP foi determinada através de uma curva de calibração feita com o padrão de ATP presente no Kit Sigma.

Para a determinação do peso seco das células de *Listeria monocytogenes* Scott A, cinco ml de cultura celular apresentando leitura de absorbância de 0,665 a um comprimento de onda de 660 nm foram centrifugadas, lavadas e suspensas em salina (0.9 %). Um ml da suspensão das células em salina 0,9% foi colocado em recipiente de alumínio e colocado em estufa a 100°C por 18 h. O mesmo procedimento foi realizado para 1 ml de salina 0,9%. Os recipientes de alumínio foram pesados antes e depois da incubação para determinar a perda de água. O peso seco das células foi calculado pela equação: $PSC = (P1 - P2) - (P3 - P4)$, onde PSC é o peso seco das células; P1 e P2 são peso inicial e final do recipiente de

alumínio contendo suspensão de células em salina 0,9%, respectivamente e P3 e P4 são peso inicial e peso final do recipiente de alumínio contendo salina 0,9%, respectivamente. Os experimentos foram repetidos 4 vezes e a média dos valores foram utilizadas para os cálculos.

4.12.2. Determinação de $\Delta\Psi$ (potencial de membrana) na presença de bacteriocina 2a.

A dissipação de $\Delta\Psi$ pela bacteriocina 2a em *Listeria monocytogenes* Scott A foi medida utilizando-se o *probe* fluorescente iodeto de 3, 3 dipropiltiocarbocianina [DiSC3(5)] (Molecular Probes), seguindo procedimento descrito por BENNIK et al., (1998). As células de *Listeria monocytogenes* Scott A foram cultivadas em 50 ml de caldo TSBYE a 30°C até apresentar uma leitura de absorvância de 0,6 a um comprimento de onda de 660 nm. Após centrifugação, as células foram lavadas duas vezes com tampão K-HEPES 50mM (2N Hidroxietil-piperazina 2 N ácido etano sulfônico) pH 7 e suspensas em 1/100 do volume inicial. Dez μ l dessa suspensão de *Listeria monocytogenes* Scott A contendo aproximadamente 10^5 UFC/ml, foram transferidos para cubetas contendo 2ml de tampão K-HEPES 50 mM pH 7, 5 μ l de DiSC3(5), 20 μ l de glicose 20% (para energizar as células) e 2 μ l de nigericina 1,5nM (Sigma). A seguir, foram adicionados 20 μ l de bacteriocina 2a para obter concentração final 18 UA/ml. A fluorescência foi monitorada continuamente por 300s a 22°C, empregando-se espectrofotômetro (Perkin Elmer Luminescence Spectrophotometer) em comprimento de onda de 643 e 666 nm para excitação e emissão, respectivamente, com uma variância de 10 nm. Dois controles positivos contendo 20 μ l de valinomicina 1,5nM ou 73 UA/ml de nisina (Nisaplin, Aplin & Barret Ltd.) foram usados em substituição à bacteriocina.

4.12.3. Determinação de Δ pH na presença de bacteriocina 2a.

A dissipação de Δ pH em células de *Listeria monocytogenes* Scott A pela bacteriocina 2a foi medida com *probes* fluorescentes 2,7-bis-(2carboxietil) 5(6) carboxifluoresceína (BCECF) (Molecular Probes) seguindo o procedimento descrito por MOLENAAR et al. (1991). Uma cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A em 100 ml de caldo TSBYE apresentando leitura óptica de 0.6 a 660 nm foi lavada duas vezes com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6, e suspensa em 2,5 ml do mesmo tampão. Duas alíquotas de 200 μ l de células concentradas foram centrifugadas e suspensas em 20 μ l tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6 adicionando 1 μ l de BCECF em cada tubo. Adicionou-se a cada um dos tubos, 1ml de HCl 0,5M, mantendo-os a temperatura ambiente por 5 min. Para neutralizar o ácido, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6. As células foram centrifugadas, escolhendo-se o tubo com o precipitado mais amarelo correspondente à concentração mais alta de BCECF. As células do precipitado foram lavadas 4 vezes com tampão fosfato de potássio 50 mM pH6 e suspensas em 200 μ l do mesmo tampão.

O efeito da bacteriocina 2a no Δ pH foi monitorado adicionando várias concentrações de bacteriocina (1,1; 2,2; 4,5; 9 e 18 AU/ml). O ensaio foi realizado a 22°C em cubeta com 2 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5.5 e 3,3 μ l de suspensão de *Listeria monocytogenes* Scott A contendo o *probe* BCECF, 50 μ l de glicose 20% para energizar as células e 2 μ l de valinomicina 1,5 nM. A seguir foram adicionados 20 μ l de bacteriocina nas concentrações finais de 1,1, 2,2, 4,5, 9 ou 18 UA/ml. Dois controles positivos contendo 10 μ l de uma solução de nigericina 1,5nM ou 73 UA/ml de nisina foram utilizados em substituição à bacteriocina. A fluorescência foi monitorada por 300s, utilizando-se espectrofotômetro (Perkin Elmer Luminescence Spectrophotometer) em comprimento de onda de 502 e 525 nm para excitação e emissão, respectivamente, e com variância de 5 nm.

4.12.4. Determinação da ação sobre lipossomos.

4.12.4.1. Extração de lipídios.

Células de *Listeria monocytogenes* Scott A foram cultivadas a 35°C em BHI contendo tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5 até leitura óptica de 0.7 a 660nm, centrifugadas e lavadas. O precipitado foi suspenso em 4 ml de solução 0.1M HCl e transferido para tubos contendo 6 g de pérolas de vidro, 10 ml de metanol e 10 ml de cloroformio. Os tubos foram agitados por 1 min em intervalos de 10 min, durante 1 h. A fase de cloroformio foi separada, neutralizada e seca sob pressão de N₂. Os lipídios foram suspensos em solução de cloroformio e metanol 9:1.

4.12.4.2. Formação dos lipossomos.

Oitocentos µl da solução de lipídios (item 4.12.4.1) foram submetidos a pressão de nitrogênio gasoso por 2 min e por 2 horas adicionais em concentrador a vácuo (Speedvac) sem aquecimento para a completa evaporação dos solventes. Em seguida, adicionou-se 19 mg de octil BD glucopiranosidio (Sigma) e 0.4 ml de solução de carboxifluoresceína-CF (sigma) dissolvida em tampão MES 50mM pH 6.5. A mistura foi agitada por 1 h e transferida para uma coluna de filtração contendo 1g de Sephadex G50 (Sigma). A coluna foi equilibrada com 40 ml de tampão MES 50mM pH 6.5. Os lipossomos foram eluídos com 10 ml de tampão MES 50mM pH 6,5.

4.12.4.3. Determinação do efluxo de carboxifluoresceína dos lipossomos.

O efeito de diferentes concentrações de bacteriocina 2a (concentração final de 28, 60 e 114 AU/ml) nos lipossomos contendo CF foi determinado pela intensidade de fluorescência da suspensão de lipídios. Para verificar o encapsulamento de CF pelos lipossomos, detergente Triton X-100 10% em água destilada foi adicionado à suspensão de lipídios. O aumento de fluorescência após adição do detergente indicou a retenção de CF dentro dos lipossomos. O experimento foi realizado a 22°C em cubetas com 2 ml de MES 50 mM pH 6,5, 5µl da suspensão de lipossomos e 20µl de bacteriocina 2a. O efluxo de CF foi monitorado pelo aumento da intensidade de fluorescência a 516 nm com excitação a 490 nm. As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofômetro (Perkin Elmer Luminescence Spectrophotometer) como descrito por WINKOWSKI et al. (1996). Como controle negativo, empregou-se amostra contendo os lipossomos em tampão MES 50mM pH 6,5.

Os resultados foram expressos em porcentagem de efluxo de CF calculada pela equação: $\% \text{ efluxo} = (f_t - f_o) / (f_y - f_o)$, onde f_t era a fluorescência no tempo t , f_o era a fluorescência do controle no tempo t , e f_y era a fluorescência da amostra depois da adição de Triton 100 (NILSON et al., 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comparação de dois métodos de avaliação da sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

Listeria monocytogenes, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua* e *Listeria seeligeri* foram sensíveis à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a tanto pelo método “spot on the lawn” quanto pelo método de difusão em poços, enquanto que *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 foram resistentes. Os dois métodos foram igualmente eficientes para se observar a sensibilidade ou a resistência das cepas testadas (Tabela 5).

Tabela 5. Tamanho dos halos de inibição, utilizando os métodos “spot on the lawn” e difusão em poços para determinação da sensibilidade à bacteriocina 2a produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

Cepas testadas	Tamanho do halo de inibição (mm)	
	“spot on the lawn”	difusão em poços
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	4
<i>Listeria welshimeri</i>	1	1
<i>Listeria seeligeri</i>	1	2
<i>Listeria innocua</i>	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0	0

O método de difusão em poços apresentou vantagem no tempo de leitura, que foi de 24 horas, enquanto o método “spot on the lawn” necessitou de 48 horas para observação dos resultados.

5.2. Efeito da neutralização do pH na sensibilidade de diferentes microrganismos à bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

Utilizando-se o método de difusão em poços, analisou-se sobrenadante ativo de *L. sake* 2a com pH neutralizado ou não neutralizado, quanto à formação de halos de inibição das cepas listadas na Tabela 6. Como mostra a tabela referida, não houve diferença na presença de halos, indicando que a inibição dos microrganismos testados não foi devida à presença de ácidos produzidos por *L. sake* 2a.

Tabela 6. Tamanho dos halos de inibição causados pelos sobrenadantes de *L. sake* 2a neutralizados e não neutralizados.

Cepas Testadas	Tamanho do halo (mm)*	
	não neutralizado	Neutralizado
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	4
<i>Listeria welshimeri</i>	2	2
<i>Listeria seeligeri</i>	2	2
<i>Listeria innocua</i>	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0	0

* determinado pelo método de difusão em poços segundo HARRIS et al., 1989.

Resultados idênticos foram encontrados por SCHILLINGER e LÜCKE (1989), quando utilizaram o método de difusão em poços para comparar os halos de inibição dos sobrenadantes ativos de *Lactobacillus sake* Lb 706, neutralizados ou não, contra *Lactobacillus sake* Lb 790.

5.3. Avaliação do efeito do meio de cultura e da temperatura de incubação na multiplicação e produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a.

Lactobacillus sake 2a produziu bacteriocina nos dois caldos testados, APT e MRS, mas o tamanho dos halos era maior nas culturas obtidas em caldo MRS, indicando maior produção de bacteriocina. As temperaturas de 25 e 30°C foram as melhores tanto para crescimento celular como para produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a em ambos meios (Figuras 3 e 4). À 42 °C, o crescimento bacteriano foi pequeno e a

produção de bacteriocina foi nula. Após 24h, a produção de bacteriocina a 11° C foi de 57 UA/ml no meio APT e de 342 UA/ml no meio MRS. Após 24 horas à 25°C e 30°C, *Lactobacillus sake* 2a inoculado em caldo MRS produziu 457 UA/ml de bacteriocina e apresentou 1,545 e 1,490 de absorbância, respectivamente, enquanto que no caldo APT a produção de bacteriocina à 25° C e 30° C foi de 114 UA/ml, apresentando 0,960 e 0,754 de absorbância, respectivamente (Tabela 7). Estes dados mostram que as melhores condições para a multiplicação de *Lactobacillus sake* 2a são obtidos quando o microrganismo é cultivado em caldo MRS a 30° C por 18 a 24 horas. Essas condições são também as melhores para a produção de bacteriocina.

Tabela 7. Produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a em dois meios de cultura à diferentes temperaturas.

Meio	Temperatura. (°C)	Absorbância (600nm)	Produção de bacteriocina (UA/ml)
MRS	11	0,380	342
	25	1,490	457
	30	1,545	457
	37	0,300	57
	42	0,110	0
APT	11	0,172	57
	25	0,754	114
	30	0,960	114
	37	0,258	0
	42	0,095	0

Figura 3. Multiplicação celular de *Lactobacillus sake* 2a medido em absorbância nos meios APT e MRS em diferentes temperaturas.

Figura 4. Produção de bacteriocina 2a por *Lactobacillus sake* 2a nos meios APT e MRS em diferentes temperaturas.

Resultados semelhantes foram reportados por YANG e RAY (1994), HIRSCH (1951), BISWAS et al. (1991), DE VUYST e VANDAMME (1992), que observaram que as condições ótimas para o crescimento celular bacteriano eram ótimas também para a produção das bacteriocinas pediocina AcH, nisina, leuconocina Lcm 1 e sakacina A.

Vários autores demonstraram que a composição do meio de cultura e as condições laboratoriais tem influência na produção de bacteriocina. Quanto à quantidade de bacteriocina produzida por *L. sake* 2a em caldo MRS à 30°C, MORTVEDT-ABILDGAARD et al. (1995), observaram que *Lactobacillus sake* L45 produziu 2000 a 3000 UA/ml de bacteriocina. Entretanto, YANG e RAY (1994) obtiveram uma produção de 55000 UA/ml de sakacina A em meio tripticase adicionado de glicose e extrato de levedura a 30°C, por *Lactobacillus sake* Lb 706.

De acordo com VIGNOLO et al. (1995), o melhor meio de cultura para a produção de lactocina 705 por *Lactobacillus casei* CRL 705 depois de 24 horas foi o meio MRS, produzindo cerca de 2133 UA/ml de bacteriocina. Quando os meios Elliker, M17 e BHI foram utilizados, houve menor produção de bacteriocina. Entretanto, a adição de Tween 80 à esses meios causou aumento significativo na produção de lactocina 705. Quando o meio MRS foi testado sem Tween 80, a produção de bacteriocina foi nula. Ao testar meio MRS sem peptona, a produção bacteriana foi a mesma do meio contendo peptona. O fato do Tween 80 exercer um efeito surfactante na membrana celular bacteriana, interferindo na sua permeabilidade e acelerando a difusão de lactocina 705, talvez seja uma explicação para o aumento da produção da bacteriocina nos meios onde esse composto é adicionado.

Já em relação à produção de enterocina 900, FRANZ et al. (1996) observaram que *Enterococcus faecium* BFE 900 não produziu bacteriocina na ausência de peptona e extrato de levedura.

Segundo TARELLI et al. (1994), a produção de bacteriocina e a multiplicação de *Enterococcus faecium* 7C5 foram maiores no meio M17 do que em APT, ambos incubados a 37°C. Os autores sugeriram que a menor

produção de bacteriocina no meio APT foi devida a sua baixa estabilidade em pH 5,0, correspondente ao pH final do meio.

5.4. Quantificação da bacteriocina no sobrenadante da cultura de *Lactobacillus sake* 2a.

Como mostra a Figura 5, a produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a em caldo MRS a 30° C durante 24 horas foi de 457 UA/ml. Esse valor foi determinado pela relação existente entre a recíproca da maior diluição que apresentou halo (1/16) e o volume de amostra inoculada (0,035 ml).

Figura 5. Foto de placa mostrando atividade de bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a contra *Listeria monocytogenes* Scott A como microrganismo indicador (método de difusão em poços).

5.5. Monitoramento da produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a ao longo da curva de crescimento.

O crescimento celular e a produção de bacteriocina por *Lactobacillus sake* 2a em caldo MRS, incubado a 30°C durante 24 horas, são apresentados na Figura 6. Verificou-se que a produção de bacteriocina iniciou-se no início da fase logarítmica (4 h), quando a massa celular atingiu 0,102 de absorbância a 600nm e $9,2 \times 10^6$ UFC/ml. De acordo com o tamanho do halo de inibição contra *Listeria monocytogenes*, a produção de bacteriocina atingiu o seu valor máximo em 7 horas de incubação a 30°C, quando a cultura apresentava 0,625 de absorbância a 600nm e $5,6 \times 10^7$ UFC/ml. Após 7 horas, a quantidade de bacteriocina produzida permaneceu constante, embora o crescimento microbiano continuasse aumentando até atingir o máximo em torno de 18 horas.

Figura 6. Multiplicação de *Lactobacillus sake* 2a e produção de bacteriocina em caldo MRS a 30°C durante 24 horas.

Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes aos reportados por outros autores a respeito de outras bacteriocinas. Assim, MORTVEDT-ABILDGAARD et al. (1995) observaram que a produção de lactocina S em meio de cultura dependeu da fase de crescimento de *Lactobacillus sake* L45. A maior produção de lactocina S (2000 a 3000 UA/ml) ocorreu no início da fase estacionária em meio MRS incubado a 30°C.

SAMELIS et al. (1994) relataram que a excreção de sakacina B por *Lactobacillus sake* 251 em meio MRS a 25°C foi de 10 UA/ml durante a fase logarítmica, e 40 UA/ml no início da fase estacionária.

Em relação à produção de enterocina 900, a maior produção (3000 UA/ml) foi obtida na fase logarítmica do crescimento de *Enterococcus faecium* BFE 900 em meio MRS incubado a 30°C (FRANZ et al., 1996).

BRINK et al., 1994, observaram que *Lactobacillus acidophilus* M46 produziu a maior quantidade de acidocina B durante a fase logarítmica de crescimento em meio MRS a 37°C.

5.6. Determinação da resistência térmica da bacteriocina.

Conforme apresentado na Tabela 8, verifica-se que a atividade da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a após tratamento térmico a temperatura de 60°C durante 5, 10, 15, 30 e 60 minutos; 100°C por 5, 10, 15 e 20 minutos e 121°C por 15 minutos, determinada pelo método de difusão em poços, permaneceu estável.

Tabela 8. Resistência térmica da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	halo de inibição(mm)*
60	5	3-4
	10	3-4
	15	3-4
	30	3-4
	60	3-4
100	5	3-4
	10	3-4
	15	3-4
	20	3-4
121	15	3-4

*determinado pelo método difusão em poços, segundo HARRIS et al., 1989.

Os resultados encontrados na literatura indicam que a resistência térmica das bacteriocinas é variável. Assim LEWUS (1991) observou que todas as bacteriocinas testadas foram mais sensíveis ao aquecimento a 100° C do que a 60° C. O tamanho do halo de inibição causado pela plantaricina BN, produzida por *L. plantarum*, reduziu-se de 50% depois do aquecimento a 60° C por 15 minutos e a 100° C por 10 minutos. A bavaricina MN, produzida por *L. bavaricus*, teve o tamanho de halo de inibição reduzido em 66% quando aquecida a 60° C por 10 minutos e em 50% quando aquecido a 100° C por 5 minutos. Já para pediocina A, produzida por *P. pentosaceus*, houve redução de 33% no tamanho do halo de inibição devido ao aquecimento a 60° C por 10 minutos. E, por último, a leuconocina S não foi afetada pelo aquecimento a 60° C, mantendo-se ativa mesmo após aquecimento a 100° C por 5 minutos.

A acidocina B, produzida por *Lactobacillus acidophilus* M46, foi estável a 80°C durante 20 minutos (BRINK et al., 1994). SAMELIS et al. (1994) reportaram que *Lactobacillus sake* 251 produziu uma bacteriocina (sakacina B) estável a 100° C durante 20 minutos. De modo similar, enterocina 900 produzida por *Enterococcus faecium* BFE 900, mostrou-se estável à temperatura de 121°C durante 15 minutos (FRANZ et al. 1996).

5.7. Determinação da influência da concentração de bacteriocina 2a na multiplicação em *Listeria monocytogenes* Scott A.

Após 24h, a densidade óptica da cultura de *Listeria monocytogenes* Scott A adicionada de 18 UA/ml, correspondente á concentração mais elevada de bacteriocina testada, foi 70% mais baixa que a apresentada pela cultura sem bacteriocina. Quando foram usados 11 UA/ml, uma redução foi de 50%. Como mostra na Figura 7, a inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A foi diretamente proporcional a concentração de bacteriocina adicionada.

Figura 7. Redução da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A por concentrações diferentes de bacteriocina 2a.

5.8. Determinação da atividade bactericida ou bacteriostática da bacteriocina.

Os efeitos da adição de sobrenadante ativo de *Lactobacillus sake* 2a apresentando concentração de $4,57 \times 10^2$ UA/ml de bacteriocina 2a à uma cultura de 6 horas de *Listeria monocytogenes* Scott A (fase logarítmica de crescimento) em TSBYE a 30°C podem ser verificados na Figura 8.

Figura 8. Multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A (medido em log UFC/ml e absorvância a 600 nm) em caldo TSBYE adicionado ou não de bacteriocina 2a produzida por *Lactobacillus sake* 2a (a seta indica o momento de adição da bacteriocina).

Os resultados mostram redução das células viáveis de *Listeria monocytogenes* Scott A após a adição da bacteriocina, indicando um provável efeito bactericida. Com 12 horas de incubação, o controle e o teste apresentaram $2,9 \times 10^8$ e $4,0 \times 10^5$ UFC/ml, respectivamente, indicando, portanto, uma redução de três ciclos logarítmicos.

A leitura de absorvância a 660 nm permaneceu constante nas primeiras 12 horas após a adição de bacteriocina, indicando a não ocorrência de lise celular. Nesse tempo, o controle apresentou 1,052 de absorvância (600nm), enquanto que o teste apresentou 0,059. Com 24 horas de incubação, o controle apresentou 1,147 e o teste 0,470. Este

aumento celular a partir de 12 horas pode ser explicado pela multiplicação das células que não foram inativadas pela bacteriocina.

Por meio desses resultados e daqueles apresentados na Figura 7, pode-se concluir que a redução do número de células de *Listeria monocytogenes* Scott A depende da quantidade de células presentes no meio e da quantidade de bacteriocina adicionada, ou seja, fixando-se a quantidade de bacteriocina e variando a concentração de *Listeria monocytogenes* Scott A, a maior redução do número de células será verificada onde a concentração celular for menor.

O efeito bactericida da bacteriocina produzida por *L. sake* 2a é semelhante ao reportado por várias outras bacteriocinas como a bacteriocina J46, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46 (BARRENA-GONZALEZ, 1996), nisina, pediocina PA-1, leucocina S, lactacina F (BRUNO e MONTVILLE, 1993) e bavaricina MN (KAISER e MONTVILLE, 1996).

5.9. Determinação da ação da bacteriocina nas fases de crescimento de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Na Figura 9 encontram-se os resultados referentes ao efeito da adição de sobrenadantes ativos de *Lactobacillus sake* 2a em diferentes fases de crescimento celular de *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE a 30°C.

Com a adição de bacteriocina após três horas de incubação, a redução celular, medida pela absorbância, foi de 1,110 para 0,118 após 12 horas de incubação. As leituras de absorbância, medidas com 5 e 7 horas, foram 1,110 para o controle e 0,102 e 0,740 para os testes 2 e 3, respectivamente. A maior redução encontrada foi no teste 2, ou seja, quando se adicionou bacteriocina no início da fase logarítmica (Figura 9).

Quando o inóculo de *Listeria monocytogenes* Scott A é alto, nem todas as células são danificadas pela bacteriocina. Dessa forma, a inibição pela bacteriocina é temporária, pois as células não danificadas continuam a se multiplicar normalmente.

Resultados semelhantes foram encontrados por MORENO (1995) que estudou o efeito da adição de sobrenadantes ativos de *L. lactis* subsp. *lactis* ITAL 383 ($3,2 \times 10^3$ UA/ml), *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 ($1,6 \times 10^3$ UA/ml) e *L. lactis* subsp. *lactis* CNRZ 150 ($1,6 \times 10^3$ UA/ml) em diferentes fases do crescimento de *Listeria innocua* LIN 11. A autora observou que as células em fase logarítmica apresentaram maior sensibilidade às bacteriocinas.

Figura 9. Efeito da adição de bacteriocina em diferentes fases da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A (as setas indicam o momento da adição de 152 AU/ml de bacteriocina).

5.10. Indução da produção de bacteriocina 2a.

Diversos componentes foram adicionados a uma cultura de *Lactobacillus sake* 2a que havia perdido a capacidade produtora de bacteriocina na tentativa de induzir a produção da mesma (Tabela 9). Essa tabela mostra que a indução da produção de bacteriocina 2a ocorria apenas quando se adicionava 10 µl da própria bacteriocina à cultura do *L. sake* 2a. Para investigar a possível indução da produção de bacteriocina devido a condições ecológicas desfavoráveis, a indução foi também estudada em cultura de *L. sake* 2a adicionadas de células de *Listeria monocytogenes* Scott A vivas e inativadas. Verificou-se que somente quando a bacteriocina 2a estava presente nas culturas mistas ocorreu a indução de sua síntese.

Tabela 9. Indução da produção de bacteriocina por componentes adicionados ao meio de cultura MRS.

Diferentes combinações de componentes adicionados ao meio MRS	Teste de atividade da bacteriocina (difusão em agar)
<i>L.sake</i> 2a	-
<i>L.sake</i> 2a + Bacteriocina 2a	+
<i>L.sake</i> 2a + <i>L. monocytogenes</i> Scott A	-
<i>L.sake</i> 2a + <i>L. monocytogenes</i> Scott A + Bacteriocina 2a	+
<i>L.sake</i> 2a + <i>La monocytogenes</i> Scott A inativada	-
<i>L.sake</i> 2a + <i>L. monocytogenes</i> Scott A inativada + Bacteriocina 2a	+
Bacteriocina 2a	-
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	-
<i>L. monocytogenes</i> Scott A inativada	-

* 3 a 4 mmn

KUIPERS et al. (1995) demonstraram que nisina pode regular a sua produção atuando como um componente extracelular capaz de induzir a sua própria síntese. No mesmo ano, SAUCIER e seus colaboradores reportaram que a produção de bacteriocina por *Carnobacterium piscicola* LV 17 era regulada pela sua própria bacteriocina. Entretanto, QUADRI (1994) reportou que os genes envolvidos na produção das carnobacteriocinas codificavam para vários peptídios semelhantes às bacteriocinas e com funções desconhecidas.

Em 2000, FRANZ et al.(b) detectaram o gene codificador do fator de indução de produção de carnobacteriocina A produzida por *Carnobacterium piscicola* LV 17A. Esse fator de indução, denominado cbaX, é um peptídio de 24 aminoácidos apresentando características semelhantes às bacteriocinas, como natureza catiônica e hidrofobicidade.

Outros peptídios de indução, como plantaricina A (26 aminoácidos), EntF (25 aminoácidos) e IP-673 (19 aminoácidos), indutores da produção de plantaricina EF e JK, enterocinas A e B e sakacina P, respectivamente, foram reportados (FRANZ et al., 2000(b); NILSEN et al., 1998; FRANZ et al., 2000(a)). Além disso, ANDERSEN et al. (1998), relataram que a plantaricina A pode atuar como fator de indução e também apresenta atividade antagonista contra alguns tipos de microrganismos.

5.11. Purificação da bacteriocina 2a.

Bacteriocina 2a foi purificada através da adição de NaCl às células de *L. sake* 2a seguido de diálise e aplicação em coluna de troca iônica (Mono S) e cromatografia de fase reversa. As características da bacteriocina em cada uma dessas etapas do processo de purificação estão apresentadas na Tabela 10.

Para evitar várias etapas de pré-purificação que poderiam causar a perda de atividade da amostra, utilizou-se o método baseado em absorção e desorção de bacteriocinas nas células produtoras. De acordo com YANG et al. (1992), algumas bacteriocinas são adsorvidas nas membranas dos produtores dependendo do pH, com máximo de adsorção ocorrendo em pH 6,0. Reduzindo-se o pH para 2,0, ocorre uma desorção de 93 a 100% da bacteriocina ligada a membrana celular dos produtores. A extração a pH alcalino não foi feita devido a conhecida perda de atividade de nisina, pediocina e outras bacteriocinas de bactérias lácticas (BHUNIA et al., 1991). De acordo com JACK e TAGG (1992), bacteriocinas associadas a células são desassociadas em condições acídicas indicando que as células de bactérias Gram positivas devem atuar como resina de troca iônica. Bacteriocinas da Classe II como sakacina A, pediocina AcH e Leuconocina Lcm1 tem sido purificadas através dessa metodologia (YANG et al., 1992).

O método de extração da bacteriocina 2a das células produtoras aumentou a atividade específica da amostra de 4000 vezes enquanto que outros métodos realizados em estudos preliminares, como precipitação com etanol, precipitação com acetona e interação hidrofóbica com amberlite (Pharmacia), aumentaram em 450, 450 e 1800 vezes a atividade específica da amostra, respectivamente. Precipitação com sulfato de amônio e separação de proteínas pela diferença de pI utilizando Rotofor (Bio Rad) não foram satisfatórios para a extração, devido à recuperação difícil das bacteriocinas após a utilização desses métodos (dados não apresentados).

Não foi detectada atividade de bacteriocina 2a após a extração utilizando ácido fosfórico 5%. Dessa forma, sabendo que as células trabalham como uma resina de troca iônica, utilizou-se extração com NaCl 1M. O fator de purificação para essa primeira etapa foi de 4,7.

Tabela 10. Purificação de bacteriocina 2a.

Amostra	Volume (ml)	UA/ml	Atividade total (UA)	mg/ml proteína	Proteína total (mg)	Atividade específica	Fator de purificação	Rendimento (%)
Sobrenadante	6000	2.28×10^2	1.36×10^6	0.236	1416	960	1	100
Extração com sal	300	2.28×10^2	6.84×10^4	0.05	15	4560	4.7	5
Mono S ¹	9	7.3×10^3	6.57×10^4	0.147	1.3	50530	52.6	4.8
Mono S ²	3	1.4×10^4	4.2×10^4	0.197	0.59	71186	74.1	3

¹ A bacteriocina foi eluída com gradiente de NaCl até 1M

² A bacteriocina foi eluída com gradiente de NaCl até 0,5M

A coluna cromatográfica Mono S contém resina hidrofílica e catiônica. Essa resina é formada de partículas extremamente pequenas, com tamanho de 10 μm , aumentando a sua capacidade de retenção de proteínas. As frações coletadas da coluna que apresentaram atividade de bacteriocina foram reunidas e aplicadas novamente na coluna Mono S, utilizando-se agora um gradiente de sal até 0,5 M, pois a bacteriocina era eluída numa concentração de NaCl de aproximadamente 0,3M. A terceira etapa foi realizada para diminuir a quantidade de interferentes. A atividade específica foi aumentada de 71186 vezes após a terceira etapa de purificação e o rendimento obtido foi de 3%. Três das 4 frações coletadas da coluna apresentando atividade foram reunidas, dialisadas e concentradas a 100 μl . A seguir, esses 100 μl foram aplicados em coluna de HPLC para maior purificação. A bacteriocina foi eluída com acetonitrila 30% e após a passagem na coluna em HPLC, a amostra foi enviada para o laboratório de bioquímica da Michigan State University, MI, USA para um futuro sequenciamento dos aminoácidos que formam a bacteriocina 2a.

Outros autores relataram resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo. Na purificação da carnocina U149, a atividade específica aumentou de 67000 vezes e o rendimento foi de 3%. Já o rendimento e a atividade específica da purificação de lactocina S foram 3% e 9×10^5 , respectivamente, enquanto que para lactococcina A foram 16% e $2,4 \times 10^5$, respectivamente. (MORTVEDT et al., 1991; HOLO et al., 1991).

Segundo CAROLISSEN-MACKAY et al. (1997), os parâmetros de avaliação de processos de purificação de proteínas, como fator de purificação, atividade específica e rendimento, variam extremamente mesmo para proteínas semelhantes. Dessa forma é muito difícil fazer a comparação de protocolos de purificação. Entretanto, várias bacteriocinas da Classe II tem sido purificadas através de protocolo semelhante ao utilizado para a purificação de bacteriocina 2a. Assim, lactococcina A (HOLO et al., 1991), curvaticina FS47 (GARVER e MURIANA, 1994), bavaricina A (LARSEN E NORRUNG, 1993), bacteriocina produzida por *Pediococcus acidilactici* UL5 (DABA et al., 1994), plantaricina C (GONZALEZ et al., 1994), acidocina A

(KANATANI et al., 1995), bacteriocina produzida por *Lactobacillus acidophilus* 30SC (OH et al., 2000) foram purificadas através de precipitação com sulfato de amônio ou adsorção/desorção nas células dos produtores, aplicação em coluna de troca iônica e coluna de interação hidrofóbica.

Para verificar a pureza e o tamanho da bacteriocina, uma alíquota da fração correspondente ao máximo da concentração de bacteriocina foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina. A substituição de glicina por tricina permite melhor resolução de proteínas de baixo peso molecular na faixa de 5 e 20 kDa, com concentração relativamente baixa de acrilamida. A acrilamida é o composto responsável pela porosidade do gel. Quanto maior sua concentração, menor é o tamanho dos poros no gel e melhor é a separação das proteínas. SCHAGGER e von JAGOW (1987) reportaram que eletroforese em gel com 16,5% de acrilamida proporcionou a melhor resolução das proteínas de baixo peso molecular. O gel foi submetido a uma corrente elétrica baixa de 30 V nos 30 minutos iniciais para que as proteínas pudessem se orientar no gel e conseqüentemente melhorar a sua separação das proteínas.

Depois da eletroforese, uma das metades do gel foi corado com prata e a outra metade foi testada quanto a inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A. A metade do gel testada para a atividade de bacteriocina foi lavada com H₂O deionizada por 24 horas a 4°C para a eliminação do composto denaturador de proteínas (SDS), presente no gel, e assim recuperar a atividade da bacteriocina.

Na eletroforese, uma única banda foi revelada correspondendo a um peso molecular estimado de 3 a 6 kDa. Essa banda apresentou atividade contra *Listeria monocytogenes* Scott A (Figura 10).

Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida-tricina. Gel corado com prata (A). Gel com sobrecamada de ágar contendo *Listeria monocytogenes* Scott A (B). (1) banda de bacteriocina 2a, (2) marcador de peso molecular (1,42-26,6 kDa). (3) marcador de peso molecular pré-corado (6,4-201 kDa). (1*) banda de bacteriocina apresentando atividade antagonística.

5.12. A influência de bacteriocina 2a nos níveis de ATP intracelular e extracelular.

A atuação da bacteriocina 2a nos níveis de ATP interno e externo de *Listeria monocytogenes* Scott A pode ser vista na Figura 11. O nível de ATP interno inicial detectado foi de 45 nmol/mg. O ATP interno diminuiu para 8 e 10 nmol/mg 37 min após a adição de 1250 IU/ml de nisina e 900 UA/ml de bacteriocina 2a, respectivamente. A quantidade de ATP interno foi inversamente proporcional ao tempo de exposição à bacteriocina 2a. O ATP externo permaneceu constante ao longo dos 37 minutos, indicando que não houve perda de ATP através da membrana,

provavelmente porque o tamanho do poro formado não foi grande suficiente para a passagem das moléculas de ATP que são carregadas negativamente e tem peso molecular de 507. O fato do nível de ATP interno ter sido reduzido sem que houvesse a saída de ATP pela membrana citoplasmática sugere que o ATP interno foi hidrolisado dentro das células sensíveis à bacteriocina para a manutenção da força motriz protônica, conforme sugerido anteriormente por MOLL et al. 1999.

Figura 11. Variação dos níveis de ATP total e externo nas células de *Listeria monocytogenes* Scott A em função da ação da bacteriocina 2a e nisina.

Nos estudos da atuação de pediocina PA-1 nos níveis de ATP das células de *Listeria monocytogenes* Scott A, CHEN e MONTVILLE (1995) também constataram que os níveis de ATP das células diminuiu pela hidrólise que ocorreu na tentativa de manutenção da força motriz protônica.

A possibilidade da redução dos níveis de ATP interno pela falta de íons potássio foi descartada, pois esses autores observaram redução de apenas 25% dos íons fosfato da célula pela ação da bacteriocina, enquanto o nível de ATP interno diminuiu de 90%.

Enterocina P (HERRANZ et al., in press), produzida por *Enterococcus faecium* P13 e a mundticina (BENNIK et al., 1998), produzida por *Enterococcus mundtii* também diminuíram a concentração interna de ATP sem alterar a concentração externa nas células de *Enterococcus faecium* T136 e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. A lactacina 3147 causou o mesmo efeito nas concentrações de ATP quando adicionada às células de *Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus subtilis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (McAULIFFE et al., 1998). Entretanto, plantaricina C causou diminuição de ATP interno e aumento de ATP externo nas células de *Lactobacillus sake* e *Lactobacillus fermentum* indicando a formação de um poro grande o suficiente para a passagem de ATP. Para permitir a passagem de uma molécula grande como ATP, provavelmente várias moléculas de plantaricina C agem juntas para formar o poro pelo qual solutos hidrofílicos podem passar (GONZALEZ et al., 1996).

CHEN e MONTVILLE (1995) também relataram que o tamanho do poro formado durante a ação de pediocina PA1 deveria ser dependente da concentração da bacteriocina.

A adição de nisina às células sensíveis como *Listeria monocytogenes* causa efluxo parcial de ATP através da membrana (RUHR e SAHL, 1985). Pode-se concluir que o tamanho do poro formado pela nisina deve ser maior do que o formado pelas bacteriocinas da Classe II (GONZALEZ et al., 1996).

5.13. Depleção do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) pela bacteriocina 2a.

A influência de bacteriocina 2a no potencial de membrana ($\Delta\Psi$), componente da força motriz protônica (PMF), em células de *Listeria monocytogenes* Scott A pode ser vista na Figura 12. O efeito de 18 UA/ml de bacteriocina 2a no $\Delta\Psi$, quantitativamente determinado utilizando o probe fluorescente DisC3(5), indicou uma diminuição do potencial de membrana de *Listeria monocytogenes* Scott A, detectado pelo aumento de intensidade de fluorescência.

Figura 12. Efeito da bacteriocina 2a no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) nas células de *Listeria monocytogenes* Scott A.

O aumento da fluorescência causado pela adição de bacteriocina 2a às células de *Listeria monocytogenes* foi maior que os

valores encontrados quando adicionou-se valinomicina. Resultados semelhantes foram encontrados por HERRANZ et al. (in press), ao adicionarem 218 UA/ml de enterocina P às células de *E. faecium* T136. Segundo os autores, esses resultados indicam que o aumento da fluorescência causado pela difusão do probe através da membrana pode ser mediada não somente pela diminuição do potencial de membrana ($\Delta\Psi$), mas também por rupturas nas membranas celulares causados pela adição de bacteriocina 2a.

Segundo KAISER e MONTVILLE (1996), 6 $\mu\text{g/ml}$ de bavaricina MN causou 79% de redução do potencial de membrana nas células de *Listeria monocytogenes* Scott A. Já a mundticina (0,14 $\mu\text{g/ml}$) causou dissipação completa do potencial de membrana nas células de *Listeria monocytogenes* (BENNIK et al., 1998).

A adição de 102 UA/ml de lactacina F às células energizadas de *L. delbrueckii* ATCC4797 causou redução significativa do potencial de membrana e dissipação completa do gradiente de pH.

Para determinar se a bacteriocina lactacina 3147, produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147, atua na membrana citoplasmática de microrganismos sensíveis, McAULIFFE et al. (1998), também utilizaram o probe DiSC3(5). A adição de lactocina 3147 às células de *Lactobacillus lactis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis* causou imediata dissipação do potencial de membrana, enquanto plantaricina C causou dissipação parcial de potencial de membrana nas células de *Lactobacillus sake* e *Lactobacillus fermentum*. A dissipação aumentou com o aumento da concentração de plantaricina C (GONZALEZ et al., 1996). Os autores observaram que plantaricina C não foi tão efetiva na dissipação do potencial de membrana como valinomicina.

5.14. Depleção do gradiente de pH (Δ pH) pela bacteriocina 2a.

A influência da bacteriocina 2a na gradiente de pH (Δ pH) nas células de *Listeria monocytogenes* Scott A está apresentada na Figura 13. Conforme pode-se verificar, a bacteriocina 2a causou a depleção de Δ pH, sendo que essa depleção foi inversamente proporcional à concentração de bacteriocina 2a. As mudanças de pH intracelular causadas pela adição de várias concentrações de bacteriocina 2a (1.1, 2.2, 4.5 e 9 UA/ml) em células de *Listeria monocytogenes* Scott A estão apresentadas na Figura 14.

Figura 13. Efeito da bacteriocina 2a no gradiente de pH (Δ pH) nas células de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Figura 14. Efeito da concentração de bacteriocina 2a na redução de gradiente de pH (Δ pH) nas células de *Listeria monocytogenes* ScottA.

Resultados semelhantes foram encontrados para bavaricina MN (KAISER e MONTVILLE, 1996), nisina (BRUNO et al., 1992) e mundticina (BENNIK et al., 1998) que também dissiparam o gradiente de pH (Δ pH) das células de *Listeria monocytogenes*. Entretanto, lactocina 3147 causou um aumento do pH interno nas células de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. Segundo os autores, esses resultados podem ser um efeito secundário da diminuição intracelular dos níveis de ATP, na tentativa de

manter a força motriz protônica. Resultados semelhantes foram encontrados para enterocina P (HERRANZ et al., in press) e para lactococcina G (MOLL et al., 1998).

Diferente do lantibiótico nisina, que totalmente dissipa tanto $\Delta\Psi$ como ΔpH , bacteriocinas da Classe II provocam dissipação total de ΔpH , mas somente dissipação parcial de $\Delta\Psi$ (BHUNIA et al. 1991; BRUNO e MONTVILLE, 1993; ENNAHAR et al. 2000).

5.14. A influência de bacteriocina 2a na permeabilidade dos lipossomos à carboxifluoresceína (CF).

A permeabilidade dos lipossomos de lipídios de membrana de *Listeria monocytogenes* Scott A à CF em função da concentração de bacteriocina 2a está apresentada na Figura 15. Quando 114 UA/ml de bacteriocina 2a foram adicionadas à suspensão de lipossomos, a passagem de CF foi quase 100%. Entretanto, 28 e 60 UA/ml de bacteriocina 2a provocaram a passagem de 3 e 30% de CF através da membrana, respectivamente. A permeabilidade do lipossomo a CF aumentou com o aumento da concentração de bacteriocina e do tempo.

Figura 15. Efeito da concentração de bacteriocina 2a no efluxo de carboxifluoresceína dos lipossomos de lipídios de membrana de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Bacteriocina 2a forma poros nos lipossomos provocando a passagem de CF para o exterior da célula, indicando que a bacteriocina 2a não precisa de um receptor na membrana para formar o poro.

Resultados indicam que a bacteriocina 2a interage com as membranas das células de *Listeria monocytogenes* Scott A. Esta interação pode ser afetada pela composição dos lipídios de membrana conforme já relatado por KAISER e MONTVILLE (1996) para bavaricina MN.

BREUKINK et al (1999) relataram que uma molécula presente nas membranas de células sensíveis, denominada lipídio II, tem alta afinidade pela bacteriocina nisina, o que facilita sua ligação à membrana e a formação do poro. Esses autores também afirmam que a diferença de atividade da nisina em diferentes células sensíveis é devida a quantidade de lipídio II presente na membrana da célula sensível.

Pediocina PA-1 (CHEN et al., 1997) e enterocina P (HERRANZ et al., in press) também causaram um efluxo gradual de carboxifluoresceína de células de *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecium* T136, respectivamente. O efluxo de CF também foi dependente do tempo e da concentração tanto para pediocina quanto para enterocina P.

CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos nesse estudo, as seguintes conclusões podem ser destacadas em relação à bacteriocina 2a produzida por *Lactobacillus sake* 2a:

- Apresentou efeito antagonista contra *Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* e *Listeria innocua*, mas não apresentou atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7.
- Manteve-se estável à temperatura de 121°C por 15 minutos e o efeito contra *Listeria monocytogenes* Scott A foi bactericida.
- Utilizando-se a extração de proteínas aderidas às células de *Lactobacillus sake* 2a, seguida por passagem em coluna de troca iônica-Mono S, foi possível purificar a bacteriocina 2a 71186 e obter um rendimento de 3%.
- Atuou formando poros na membrana citoplasmática de *Listeria monocytogenes* Scott A, não necessitando de um receptor proteico específico.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T., KLAENHAMMER, T.R., LETELLIER, L. Kinetic studies of action of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.60, n.10, p.1006-1013, 1994.
- ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, Amesterdam, v.28, n.2, p.169-185, 1995.
- ANDERSEN, E.L., BAO DIEP, D., NES, I.F., EIJSINK, V.G.H., NISSENMEYER, J. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.64, n.6, 1998.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DA ALIMENTAÇÃO (ABIA). *Compêndio da Legislação de Alimentos: Revisão 6*. São Paulo, v.1, 1996, p. 3.31.
- AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. (eds) *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993, p.1-63.
- AXELSSON, L.T., HOLCK, A. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 177, p. 2125-2137, 1995.

* De acordo com a NBR023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1994.

- BAREFOOT, S.F., NETTLES, C.G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J Dairy Sci.*, Savoy, v.76, n.8, p.2366-2379, 1993.
- BARRENA-GONZALEZ, C., HUOT, E., PETITDEMANGE, H. Mode of action of bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *J. Food Prot.*, Ames, v.59, n.9, p.955-962, 1996.
- BENNIK, M.H.J., VERHEUL, A., ABEE, T., NAAKTGEBOREN-STOFFELS, G., GORRIS, L.G.M., SMID, E.J. Interactions of nisin and pediocin PA-1 with closely related lactic acid bacteria that manifest over 100 fold differences in bacteriocin sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, p.3628-3636, 1997.
- BENNIK, M. H. J., VANLOO, B., BRASSEUR, R., GORRIS, L.G.M.E, SMID, E.J. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, p.47-58, 1998.
- BHUNIA, A.K., JONSHON, M.C., BAY, B. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.*, Amsterdam, v.2, p. 319-322, 1987.
- BHUNIA, A.K., JOHSON, M.C., KALCHAYANAND, N. Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.60, p.25-33, 1991.
- BISWAS, S.R., RAY, P., JOHNSON, M.C., RAY, B. Influence of growth condition on the production of bacteriocin, pediocin ACH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, p.1265-1267, 1991.
- BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X114 solution. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.25, p.1604-1607, 1981.
- BOURRET, R.B., BORKOVICH, K.A., SIMON, M.I. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *An. Ver. Biochem.* v.60, p.401-441, 1991.
- BOWER, C.K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M.A. Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. *J. Ind. Microbiol.*, Amsterdam, v.15, p.227-233, 1995. (a)
- BOWER, C.K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M.A. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.61, p.992-997, 1995. (b)

- BREUKINK, E., WIEDEMANN, I., VAN KRAAIJ, C., KUIPERS, O.P., SAHL, H.G., KRIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Sci.*, London, v.228, p.2361-2364, 1999.
- BRINK, B., MINEKUS, M., VOSSEN, J.M.B.M., LEER, R.J., HUIS IN'T VELD, J.H.J. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.77, p.140-148, 1994.
- BRUNO, M.E.C., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.58, p.2255-2259, 1992.
- BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.
- CAROLISSEN-MACKAY, V., ARENDSE, G., HASTINGS, J.W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food. Microbiol.*, Amsterdam, v.34, p.1-16, 1997.
- CHEN, Y., LUDESCHER, R.D., MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.12, p.4770-4777, 1997.
- CHEN, Y., MONTVILLE, T.J. Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.79, p.684-690, 1995.
- CHEN, Y., SHAPIRA, R., EISENSTEIN, M., MONTVILLE, T.J. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.2, p.524-531, 1997.
- CHIKINDAS, M.L., GARCIA-GARCERA, M.I., DRIESSEN A.J.M., LEDEBOER, A.M., NISSEN-MEYER, J., NES I.F., ABEE, T., KONINGS, W.V., VENENA, G.N. Pediocin PA-1 a bacteriocin from *Pedococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.59, p.3577-3584, 1993.
- CHIKINDAS, M.L., MONTVILLE, T.J. Bacteriocins: perspectives for application as food preservatives.[IN PRESS].

- CINTAS, L.M., CASAUS, P., HAVARSTEIN, L.S., HERNÁNDEZ, P.E., NES, I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.11, p.4321-4330, 1997.
- DAVIDSON, P.M., HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A (eds) Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, 1993. p.127-159.
- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, Chicago, v. 44, n.11, p.100-117, 1990.
- DELVES-BROUGHTON, J., BLACKBURN, P., EVANS, R.J., HUGENHOLTZ. Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. Dordrecht, v.69, p.193-202, 1996.
- DE MARTINIS, E.C.P., CRANDALL, A.D., MAZZOTTA, A.S., MONTVILLE, T.J. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, Ames, v.60, p.420-423, 1997.
- DE MARTINIS, E.C.P., FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.42, n.1-2, p.119-126, 1998.
- DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the higienic quality of products. *Tecnol. Láctea latinoamericana*, n.8, p.38-43, 1997.
- DE VOS, W.M., KUIPERS, O.P., VAN DER MEYER, SIEZEN, R.J. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v. 17, p.427-337, 1995.
- DE VUYST, L.D., VANDAMME, E.J. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.138, p.571-578, 1992.
- EIJSINK, V.G.H., BRURBERG, M.B., MIDDELLHOVEN, P.H., NES, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, Washington, v.178, n.8, p.2232-2237, 1996.
- EIJSINK, V.G.H., SKEIE, M., MIDDELLHOVEN, P.H., BRURBERG, M.B., NES, I.F. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.64, p.3275-3281, 1998.

- ENNAHAR S., SASHIHARA T., SONOMOTO K., ISHIZAKI A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, Amsterdam, v.24, n.1. p.85-106, 2000.
- FOEGEDING, P.M., THOMAS, A.B., PILKINGTON, D.H., KLAENHAMMER, T.R. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.58, p.884-890, 1992.
- FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu. 1996. p.46-50, 144.
- FRANZ, C.M.A.P., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W.H. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.29, p.255-270, 1996.
- FRANZ, C.M.A.P., STILES, M.E., VAN BELKUM, M.J. Simple method to identify bacteriocin induction peptides and to auto-induce bacteriocin production at low cell density. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.186, p.181-185, 2000. (a)
- FRANZ, C. M.A.P., VAN BELKUM, M.J., WOROBO, R.W., VEDERAS, J.C., STILES, M.E. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiol.*, Reading, v.146, p.621-631, 2000. (b)
- GARCERÁ, M.J.G., ELFERINK, M.G.L., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v.212, p.417-422, 1993.
- GARVER, K.I., MURIANA, P.M. Purification and parcial aminoacid sequence of curvacin FS47, a heat stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.60, p.2191-2195, 1994.
- GONZALEZ, B., ARCA, P., MAYO, B., SUAREZ, J.E. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origen. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.60, p.2158-2163, 1994.
- GONZÁLEZ, B., GLAASKER, E., KUNJI, E.R.S., DRIESSEN, A.J.M., SUÁREZ, J.E., KONINGS, W.N. Bactericidal mode of action of plantaricin C. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, n.8, p.2701-2709, 1996.

- GUIHARD, G., BENEDETTI, H., BESNARD, M., LETELLIER, L. Phosphate efflux through the channels formed by colicins and phage T5 is responsible for the fall in the cytoplasmic ATP. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.268, p.17775-17780, 1993.
- HAROLD, F.M. **The vital force**: a study of bioenergetics. New York: W.H. Freeman and Co., 1986. 577p.
- HARRIS, L.J., DAESCHEL, M.A., STILES, M.E., KLAENHAMMER, T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, Ames, v.52, n.6, p.384-387, 1989.
- HARRIS, L.J., FLEMING, H.P., KLAENHAMMER, T.R. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, and UAL500 to nisin. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.11, p.836-840, 1991.
- HASTING, J.W., SAILER, M., JOHSON, K., ROY, K.L., VEDERAS, J.C., STILES, M.E. Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.*, Washington, v.173, p.7491-7500, 1991.
- HECHARD, Y., DERIJARD, B., LETELLIER, F., CENATIEMPO, Y. Characterization and purification of mesentericin Y105, a anti-listeria bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.138, p. 2725-2731, 1992.
- HERRANZ, C., CHEN, Y., CHUNG, H.J, CINTAS, L.M., HERNANDEZ, P.E., MONTVILLE, T.J., CHIKINDAS, M.L. Enterocin P selectively dissipates the membrane potencial of *E. faecium* T136 cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.67, n.4, p.1689-1692, 2001.
- HIRSCH, A. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.5, p.20-25, 1951.
- HOLCK, A., AXELSSON, L., BIRKELAND, S., AUKRUST, T., BLOM, H. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* LB706. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.138, p.2715-2720, 1992.
- HOLLO, H., NILSSEN, O., NES, I. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.*, Washington, v.173, n.12, 1991.
- HÜHNE, K., AXELSSON, L., HOLCK, A., KRÖCKEL, L. Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lactobacillus sake* strains. *Microbiol.*, Reading, v.142, p.1437-1448, 1996.

- JACK, R.W., TAGG, J.R. Factors affecting production of the group A *Streptococcus* bacteriocin SA-FF22. *J. Microbiol*, Seoul, v.30, p.132-138, 1992.
- JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.
- JANES, M.E., NANNAPANENI, R., PROCTOR, A., JOHSON, M.G. Rice hull ash and silicic acids adsorbents for concentration of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.64, n.11, p. 4403-4409, 1998.
- JIMENEZ-DÍAZ, R., PIARD, J.C., RUIZ-BARBA, J. L., DESMAZEUAUD, M.J. Isolation of a bacteriocin producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, Amsterdam, v.87, p.91, 1990.
- JOOSTEN, H.M.L.J., NUÑEZ, M., DEVREESE, B., BEEUMEN, J., MARUGG, J.D. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, n.11, p.4220-4223, 1996.
- JUNG, D.S., BODYFELT, F., DAESCHEL, M.A. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.75, p.387-393, 1992.
- KAISER, A. L., MONTVILLE, T. J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.75, p.536-540, 1993.
- KAISER, A.L., MONTVILLE, T.J. Purification of bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, n.11, p.4529-4535, 1996.
- KANATANI, K., OSHIMURA, M., SANO, K. Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.61, p.1061-1067, 1995.
- KEKESSY, D.A, PIGUET, J.D. New method for detecting bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.20, p.282-283, 1970.
- KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, Paris, v.70, p.337-349, 1988.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, Amsterdam, n.12, p.39-85, 1993.

- KLEREBEZEN, M., QUADRI, L.E.N., KUIPERS, O.P., VOS, W.M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal transduction systems in gram positive bacteria. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v. 24, p. 895-904, 1997.
- KUIPERS, O.P., de RUYTER, P.G.G.A., BEERTHUYZEN, M. , De VOS, W.M. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v.64, p.15-21, 1998.
- KUIPERS, O.P., BEERTHUYZEN, M., deRUYTER, P.G.G.A., LUESINK, E. J., DE VOS, W.M. Autoregulation of nisin biosynthesis in lactococcus lactic by signal transduction. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.270, p.281-290, 1995.
- LARSEN, A.G., NORRUNG, B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Appl. Microbiol. Letts.* v.17, p.132-134, 1993.
- LECHOWICH, R.V. Microbiological challenges of refrigerated foods. *Food Technol.*, Chicago, n.12, p.84-86, 1988.
- LEWUS, C.B. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. New brunswick, 1991. 153p. (Tese de Doutorado- Cook college, Department of Food Science, Rutgers The State University of New Jersey).
- LEWUS, C.B., KAISER, A., MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.
- LEWUS, C.B., MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods*, Amsterdam, v.13, p.145-150, 1991.
- MARTIN, I., RUYSSCHAERT, J.M., SANDERS, D., GIFFARD, C.J. Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem.* Oxford, v.239, p.156-164, 1996.
- McAULIFFE, O., RYAN, M. P., ROSS, P., HILL, C., BREEUWER, P., ABEE, T. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potencial. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.64, n.2, 1998.
- McCLURE, P.J., ROBERTS, T.A., OGURU, P.O. Comparison of effects of sodium chloride, pH and temperature on growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.9, p.95-99, 1989.

- McMULLEN, L.M., STILES, M.E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, Ames, suppl., p.64-71, 1996.
- MÉTIVIER, A., BOYAVAL, P., DUFFES, F., DOUSSET, X., COMPOINT, J.P., MARION, D. Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocin-like bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.30, p.42-46, 2000.
- MOLENAAR, D., ABEE, T., KONINGS, W.N. Continuous measurements of the cytoplasmic pH in *Lactobacillus lactis* with a fluorescence indicator. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1115, p.75-83, 1991.
- MOLL, G.N., KONINGS, W.N., DRIESSEN, A.J.M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.76, p.185-198, 1999.
- MONTVILLE, T.J., BRUNO, M.E.C. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.24, p.53-74, 1994.
- MONTVILLE, T.J., CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v.50, p.511-519, 1998.
- MONTVILLE, T.J., WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J., ed. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM Press, 1997. p.557-577.
- MORENO, I. Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de Lactococos e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal. São Paulo, 1995. (Tese de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).
- MORTVEDT-ABILDGAARD, C.I., NISSEN-MEYER, J., SLETTEN, K., NES, I.F. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, p.1829-1834, 1991.
- MORTVEDT-ABILDGAARD, C.I., NISSEN-MEYER, J., JELLE, B., GRENOV, B., SKAUGEN, M., NES, I.F. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.61, n.1, p.175-179, 1995.
- MOTLAGH, A.M., JOHNSON, M.C., RAY, B. Viability loss of foodborne by starter culture metabolites. *J. Food Prot.*, Ames, v.54, n.11, p.873-878, 1991.

- MURIANA, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Prot.*, Ames, suppl., p.54-63, 1996.
- NES, I.F., DIEP, D.P., HAVARSTEIN, L.S., BRURBERG, M.B., EIJSINK, V., HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.60, p.113-128, 1996.
- NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J. Chemiosmotic energy transduction. In Nicholls, D. G, Ferguson, S. J. (eds) *Bioenergetics 2*. Academic Press, London, 1992, p 1-20.
- NILSEN, T., NES, I.F., HOLO, H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.*, Washington, v.180, p.1848-1854, 1998.
- NILSSON, L., CHEN, Y., CHIKINDAS, M.L., HUSS, H.H., GRAM, L., MONTVILLE, T.J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.66, n.2, p.769-774, 2000.
- OH, S., KIM, S.H., WOROBO, R.W. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.83, n.12, p.2747-52, 2000.
- PARENTE, E., RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v.52, p. 628-638, 1999.
- POST, R.C. Regulatory perspective of USDA on the use of antimicrobial and inhibitors in foods. *J. Food Prot. Suppl.*, Ames, p.78-81.
- QUADRI, L.E.N., SAILER, M., ROY, K.L., VEDERAS, J.C., STILES, M.E. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.269, p.12204-12211, 1994.
- QUADRI, L.E.N., SAILER, M., TEREbiznik, M.R., ROY, K.L., VEDERAS, J.C., STILES, M.E. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of the canobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.*, Washington, v.177, p.1144-1151, 1995.
- REINECCIUS, G.A. Flavor and nutritional concerns relating to the quality of refrigerated foods. *Food Technol.*, Chicago, n.1, p.84-89, 1989.
- RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. *Nutr. and Food Sci.*, London, n.4, p.27-33, 1996.

- RODRIGUES, D. A. Aplicação dos princípios do sistema de análise de perigos e pontos críticos no controle de *Listeria monocytogenes* no processamento industrial de nuggets de frango empanados e congelados. São Paulo, 1999 (Tese de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- RODRIGUEZ, J.M., SOBRINO, O.J., MOREIRA, W.L., FERNÁNDEZ, M.F., CINTAS, L.M., CASAUS, P., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. *Meat Sci.*, Barking, v.38, p.17-26, 1994.
- RUHR, E., SAHL, H.G. Mode of action of peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potencial of whole cells and on cytoplasmic and artificial and artificial membrane vesicles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.27, p.841-845, 1985.
- SAUCIER, L., POON, A., STILES, M.E. Induction of bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* LV17. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.78, p.684-690, 1995.
- SAHL, H.G., KORDEL, M., BENZ, R. Voltage-dependent depolarization of bacterial menbranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.*, Berlin, v.149, p.120-124, 1987.
- SAHL, H.G., JACK, R.W., BIERBAUM, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v.230, p.827-853, 1995.
- SAMELIS, J., ROLLER, S., METAXOPOULOS, J. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Grek dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.76, p.475-486, 1994.
- SCHILLINGER, U., GEISEN, R., HOLZAPFEL, W.H. Potencial of antagonistic and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. & Technol.*, Cambridge, v.7, n.5, p.158-164, 1996.
- SCHILLINGER, U., KAYA, M., LUCKE, F. Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.70, p.473-478, 1991.
- SCHILLINGER, U., LUCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.55, n.8, p.1901-1906, 1989.
- SHAGGER, H., VON JAGOW, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.*, Orlando, v.166, p.368-379, 1987.

- SILLS-LEVY, E. U.S. Food trends leading to the year 2000. *Food Technol.*, Chicago, n.4, p.128-132, 1989.
- SILVA, W.P., DESTRO, M.T., LANDGRAF, M. FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Braz. J. Microbiol.*, Rio de Janeiro, v.31, p.103-106, 2000.
- STEVENS, K.A., SHELDON, B.W., KLAPES, N.A., KLAENHAMMER, T.R. nisin treatment for inactivation of Salmonella and others gram negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.12, p.3613-3615, 1991.
- STILES, M.E., HASTINGS, J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potencial for use in meat preservation. *Trends Food Sci. & Technol.*, Cambridge, n.10, p.247-251, 1991.
- SUÁREZ, A.M., AZCONA, J.I., RODRÍGUEZ, J.M., SANZ, B., HERNÁNDEZ, P.E. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.12, p.4990-4992, 1997.
- TARELLI, G.T., CARMINATI, D., GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy Enterococci. *Food Microbiol.*, London, v.11, p.243-252, 1994.
- THOMAS, L.V., WIMPENNY, J.W. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, p.2006-2012, 1996.
- TRAMER, J. The inhibitory action of nisin on *Bacillus stearo thermophilus*. In "Microbial Inhibitions in Foods", ed. N. Molin, 1964, p.25. Apud DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, Chicago, v.44, n.11, p.100-117, 1990.
- UPRETI, G.C., HINNSDILL, R.D. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, Washington, v.4, p.487-494, 1973.
- VENENA, K., CHIKINDAS, M. L., SEEGER, J. F. M. L., HAANDRIKMAN, A.J., LEENHOUTS, K.J., VENENA, G., KOK, J. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, p.305-309, 1997.

- VERHEUL, A., RUSSELL, N.J., HOF, R.V., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.9, p.3451-3457, 1997.
- VAN der MER, J.R., POLMAN, J., BEERTHUYZEN, M.N., SIEZEN, R.J., KUIPERS, O, deVOS, W.M. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes nisP, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and nisR, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J. Bacteriol.*, Washington, v.175, p.2578-2588, 1993.
- VIGNOLO, G.M., KAIRUZ, M.N., HOLGADO, A.A.P.R., OLIVER, G. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.78, p.5-10, 1995.
- YANG, R., JOHNSON, M., RAY, B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.58, n.11, p.3355-3359, 1992.
- YANG, R., RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, London, v.11, p.281-291, 1994.
- WILKINSON, B. J., JONES, D. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, Colchester, v.98, p.399-421, 1977.
- WINKOWSKI, K., LUDESCHER, R., MONTVILLE, T. J. Physicochemical characterization of the nisin-membrane interaction with liposomes derived from *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.62, p.323-327, 1996.